



Universidad de Granada

***Modelos experimentales de terapia génica para
HIGM1 con vectores lentivirales transcripcionalmente
regulados***

Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina (D11.56.1)

Pablo Fernández Rubio

Granada, 2016

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Pablo Fernández Rubio
ISBN: 978-84-9163-006-7
URI: <http://hdl.handle.net/10481/44399>



Universidad de Granada

El doctorando **D. Pablo Fernández Rubio** y el director de la tesis **Dr. D. Ignacio Jesús Molina Pineda de las Infantas**, Catedrático de Inmunología de la Universidad de Granada garantizamos, al firmar esta tesis doctoral titulada: **“Modelos experimentales de terapia génica para HIGM1 con vectores lentivirales transcripcionalmente regulados”**, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la tesis y hasta donde su conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 1 de junio de 2016

Director/es de la Tesis

Fdo.:

Doctorando

Fdo.:

Agradecimientos

Han sido casi seis años desde que empecé esta aventura y no puedo creer que llegue a su fin. A lo largo de este tiempo he conocido a mucha gente de la que he aprendido más de lo que podía imaginar. Sin lugar a dudas no estaría aquí de no haber sido por todos ellos. En primer lugar quiero agradecerle a mi director, Ignacio, y a todos los componentes de mi grupo de investigación todo cuanto me han enseñado en este tiempo y la ayuda que me han prestado, especialmente a Karina, que tuvo la paciencia de hacerse cargo de un recién llegado. Esta tesis no habría cobrado forma de no haber seguido las indicaciones y sugerencias que me ofrecieron. Quisiera expresar también mi profundo agradecimiento por el apoyo que he recibido de todo el grupo de inmunología. A Maricarmen y Ana que me aconsejaron mil cosas y me ayudaron siempre que las necesité. A Enrique que quiso ver lo mejor de mí como persona e investigador. A mi compañera y amiga “londinense”, Raquel, ¡qué buenos ratos pasamos Lourdes, Belén, tú y yo en esa ciudad de ensueño! A Salva con el que he compartido largas horas de laboratorio hasta las mil, ¡casi nos cobran alquiler! A María José por ser tan buena compañera y tener una contagiosa actitud positiva. A Juan Diego, Antonio Toscano y Pilar por hacerme la vida más fácil al explicarme trucos y maneras con los protocolos cuando no tenían por qué. A Paco Martín por ayudarnos a ver una salida cuando parecía que no la había. No sería justo que me olvidase de la gente de anatomía, del banco de células madre, de los supertécnicos Gustavo y Ana y de la gente de Mariano, como Virginia, muchas gracias a todos. Tampoco quiero dejar de mencionar a Adrian y a su gente de Londres, ¿se puede aprender más en menos tiempo? Creo que no y es culpa de un grupo extraordinario de profesionales de cien nacionalidades distintas.

Para terminar quiero dedicarle esta tesis a mi familia y a todos los amigos que nos tendieron la mano cuando peor lo estábamos pasando. Mamá, me ha costado pero parece que por fin llegamos a la meta. Humberto, no hay que rendirse nunca, ánimo. Mi Belén, esta dedicatoria iba a ser en principio para ti porque has estado siempre ahí y porque te lo debía, espero que comprendas el cambio de última hora. Papá, siento mucho que no estés aquí hoy, espero que al menos me veas defender mi trabajo desde ahí arriba. No ha merecido la pena, la verdad, lamento no haberte ayudado más y mejor cuando peor estabas por luchar por esta tesis, espero que puedas perdonarme. Por eso te la dedico fundamentalmente a ti, por lo que ambos sacrificamos para llegar a este día. Te quiero.

*“How often have I said to you that
when you have eliminated the impossible,
whatever remains, however improbable, must be the truth?”*

Sir Arthur Conan Doyle (1890)

Índice

Índice

- Summary (p.1)

- 1. Introducción (p.8)

- 1.1 Inmunodeficiencias primarias (p.8)

- 1.1.1 El Síndrome de Híper-IgM (p.9)

- 1.1.2 Genes CD40LG /Cd40lg y su mRNA (p.13)

- 1.1.3 Proteína CD154 o CD40L (p.16)

- 1.1.4 Regulación de la expresión de CD40LG/Cd40lg (p.19)

- 1.1.5 Proteína CD40 y otros receptores de CD154 (p.23)

- 1.1.6 Naturaleza física de la interacción CD40-CD154 (p.24)

- 1.2 Terapia génica e inmunodeficiencias primarias (p.28)

- 1.2.1 Las IDP: buenas candidatas para la terapia génica (p.31)

- 1.2.2 Estrategias terapéuticas para la corrección génica (p.34)

- 1.2.2.1 Terapia génica sustitutiva: Adición de genes terapéuticos (p.35)

- 1.2.2.2 Terapia génica reparadora: Edición del genoma (p.37)

- 1.2.3 Vectores virales integrativos: retrovirus y lentivirus (p.39)

- 1.2.3.1 Plásmido empaquetador (p.43)

- 1.2.3.2 Plásmido de transferencia (p.45)

- 1.2.3.3 Plásmido de la envoltura viral o pseudotipado (p.47)

- 1.2.4 Efectos adversos de la terapia génica (p.48)

Índice

- 1.2.5 Bioseguridad: estrategias para neutralizar efectos adversos en la terapia génica por adición de genes terapéuticos (p.54)
- 1.2.6 Terapia génica, vectores integrativos y linfocitos (p.62)
 - 1.2.6.1 Restricciones de la transducción de células T y B mediante LVs (p.64)
- 1.2.7 Terapia génica para HIGM1: una alternativa terapéutica (p.67)
- 2. Objectives (p.74)**
- 3. Materiales y métodos (p.75)**
 - 3.1 Bacterias, transformaciones y materiales para cultivo bacteriano (p.75)
 - 3.2 Purificación plasmídica por Miniprep, Midiprep y Maxiprep (p.76)
 - 3.3 Geles, electroforesis, extracciones de DNA de geles de agarosa y procesos de ligación (p.78)
 - 3.4 Construcción de los plásmidos y producción de vectores lentivirales (p.79)
 - 3.5 Líneas Celulares y Medios de Cultivo (p.83)
 - 3.6 Título de los vectores Lentivirales y Transducción Celular 85
 - 3.7 Extracción de DNA genómico y cálculo del número de inserciones/célula (p.86)
 - 3.8 Estimulación celular, Anticuerpos y Citometrías de Flujo (p.89)
 - 3.9 Ensayos de proliferación celular (p.90)
 - 3.10 Extracción de mRNA total, RT-PCR y PCR (p.92)

- 4. Resultados (p.94)

- 4.1 Construcción de los plásmidos de transferencia (p.94)
 - 4.1.1 Plásmidos de transferencia lentivirales portadores del transgén Cd40lg (p.94)
 - 4.1.2 Plásmidos de transferencia lentivirales portadores de CD40LG (p.96)
- 4.2 Efecto de la transducción de líneas celulares T con los vectores pCD40LG-CD40LG y pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP (p.100)
 - 4.2.1 La transducción de células Jurkat CD154⁻ con vectores lentivirales SIN pCD40LG-CD40LG y pSFFV-CD40LG dan lugar a una expresión discreta de la proteína en la superficie celular (p.100)
- 4.3 Efecto de la transducción de líneas celulares T con los vectores bicistrónicos pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP y pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP (p.103)
 - 4.3.1 Los fibroblastos 293T transducidos con los vectores bicistrónicos pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP y pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP muestran altos niveles de fluorescencia independientemente del promotor que dirija el cassette de expresión (p.104)
 - 4.3.2 El transgén eGFP muestra una expresión proteínica muy potente en células Jurkat transducidas con las construcciones bicistrónicas (p.107)
 - 4.3.3 Las células Jurkat transducidas con el vector pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP expresan CD154 intracitoplasmático tras su estimulación (p.109)

Índice

- 4.4 La transducción eficiente de linfocitos primarios de pacientes de HIGM1 no logra la reconstitución de los niveles de expresión de CD154 dependientes de activación (p.111)
- 4.5 Altos niveles de mRNA de CD40LG no aseguran la expresión de la proteína en la superficie celular de linfocitos T transducidos con los vectores lentivirales (p.114)
- 4.6. Modelo murino de HIGM1 (p.118)
 - 4.6.1 El vector pCd40lg-Cd40lg muestra una expresión regulada y dependiente de activación en células BW5147 (CD154⁻) 118
 - 4.6.2 Expresión funcional del transgén contenido en el vector lentiviral regulado pCd40lg-Cd40lg (p.122)
- 4.7 La expresión del vector regulado pCd40lg-Cd40lg está restringida al linaje hematopoyético, a diferencia del vector constitutivo pSFFV-Cd40lg (p.126)
- **5. Discusión (p.131)**
- **6. Conclusions (p.150)**
- **7. Bibliografía (p.151)**
- **Anexo Artículo Científico de Calidad (p.192)**

Summary

Summary

Primary Immunodeficiencies (PIDs) belong to a heterogeneous group of diseases arising from mutations in more than 300 different genes (Zhang *et al.*, 2013; Ghosh *et al.*, 2015). PIDs usually feature defective development and/or functions in immunological cells, and, therefore, patients are prone to suffer from opportunistic, recurrent and severe infections. Concomitant alterations in some PIDs are immunological dysregulation, autoimmunity as well as lymphoproliferative disorders. The most severe PIDs are known as severe combined immunodeficiencies (SCID), where defective development of T cells and anomalous function of B cells can be found. Treatment is often limited to palliative therapies, essentially based on administration of prophylactic antibiotics or immunoglobulins replacement. The only effective and curative treatment is bone marrow transplantation from a HLA-matched donor (Notarangelo *et al.*, 2010). However, suitable donors are not always available and the odds of success dramatically decrease when bone marrow progenitors come from non HLA-matched donors (Notarangelo *et al.*, 2010). Because of this, the appearance of gene therapy in the biomedical field appears as an important therapeutic contribution to these patients.

The hyper IgM syndromes (HIGM), formerly named dysgammaglobulinemia (Rosen *et al.*, 1961), are a group of primary immunodeficiencies featuring defective signaling of the CD40 pathway in B lymphocytes. As a result of this, HIGM patients show low levels of IgG and IgA in serum, whereas those for IgM are high or normal (Winkelstein *et al.*, 2003), thus making the X-linked hyper IgM syndrome (HIGM1, OMIM number 308230) patients highly susceptible to opportunistic infections (Etzioni and Ochs, 2004). HIGM1 is most common among HIGM syndromes (65-70% of all cases), and

Summary

arises from mutations in the gene coding for the CD154 molecule or CD40 Ligand (Allen *et al.*, 1993). *CD40LG* is located in the long arm of the X chromosome (Xq26-27).

The severity of the HIGM1 and the fact that CD154 transient expression on the surface of activated T CD4⁺ lymphocytes is strictly regulated (Lane *et al.*, 1992; Castle *et al.*, 1993) highlight the functional importance of signals triggered following coupling of CD154 with its ligand, CD40, constitutively expressed on B cells. This interaction is critical for the immunobiology of B lymphocytes, including immunoglobulin isotype switching (Foy *et al.*, 1996), cell proliferation and survival from apoptosis. Functional CD154 is assembled as homotrimers (*Protein Data Bank* #1 ALY). Its spatial structure is similar to those of TNF α and LT α proteins (Figure 1.3). Although CD154 is mainly yielded as a type II transmembrane protein it can also be expressed on the cellular surface as a heteromultimeric complex (Hsu *et al.*, 1997) or as two other shorter soluble isoforms (Mazzei *et al.*, 1995).

The aforementioned fine regulation of the transient expression of CD154 on T cells, which is achieved by strict molecular mechanisms, has hindered the development of gene therapy for HIGM1, as unregulated expression of the therapeutic transgene resulted in a lymphoproliferative syndrome in animal models (Brown *et al.*, 1998; Sacco *et al.*, 2000). Gene therapy consists on a reinfusion process of modified autologous cells to achieve the proper expression of a defective gene, usually by means of the insertion of a cDNA sequence into the host genome to correct the disease phenotype. The first gene therapy assays for PIDs were carried out with oncoretroviral vectors (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000), which are versatile tools to deliver nucleic acids. The retroviral vectors more commonly used are based on the Moloney Leukemia Virus (MLV). MLV

genes are replaced by an expression *cassette* to produce gammaretroviral vectors unable to replicate themselves after the insertion into the host genome (Self-Inactivating Vectors, SIN). Nevertheless, retroviral vectors have some important disadvantages as therapeutic tools compared to lentiviral vectors, which are based on the HIV retrovirus. For instance, whereas gammaretrovirus cannot transduce non-dividing cells (Roe *et al.*, 1993), lentivirus can (Lewis *et al.*, 1994). More importantly, gammaretrovirus tend to insert themselves near CpG islands and transcriptional start sites, especially of those of genes involved in cancer development (Laufs *et al.*, 2003), a setback that is overcome by lentiviral vectors (Suerth *et al.*, 2012). If we consider that the first oncoretroviral vectors carried a transgene driven by a strong promoter to ensure efficient gene expression, it is easy to understand why the transactivation of protooncogenes such as LMO2 and the subsequent insertional mutagenesis was a likely consequence of the use of gammaretroviral vectors in the early gene therapy clinical trials (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003b; Check *et al.*, 2005).

Prompted by this, we developed a tissue-specific, activation-inducible second generation lentiviral vector (pCD40L-CD40L) carrying a normal *CD40LG* cDNA controlled by its endogenous promoter as a first step towards regulated gene therapy for HIGM1 (Romero *et al.*, 2011). This lentiviral vector increases the biosafety of the protocol, since it has been assembled as a result of a split genome second generation strategy (where 293T packaging cells are co-transfected with the therapeutic plasmid, a packaging plasmid and an envelope plasmid). This strategy dramatically reduces the probability of spontaneous production of replicant-competent lentivirus (RCL) after insertion of the transgene into the host genome. Furthermore, the gene therapy strategy where the transgene is driven by its endogenous promoter instead of a strong one, allows obtention of physiological expression as it has been previously demonstrated in other PID

Summary

models and clinical trials such as those of the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) (Dupré *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2005; Aiuti *et al.*, 2013; Hacein *et al.*, 2015). Furthermore, it also decreases the possibility of gene transactivation if the insertion site is in the vicinity of a proto-oncogene.

The regulated lentiviral vector pCD40L-CD40L was able to restore a physiological expression of CD154 *in vitro* in cell lines derived from HIGM1 patients (Figure 1.10) (Romero *et al.*, 2011). However, we were concerned by the relatively low levels of CD154 surface expression achieved by the regulated vector. The goal of our work was to assess the causes of this inefficient CD154 expression in human cells and to determine whether or not a regulated gene expression can be achieved in other species, such is the case of mice. Therefore, the CD154⁻ Jurkat cell line and CD4⁺ allospecific long-term primary T cells derived from HIGM1 patients were transduced with the regulated vector pCD40L-CD40L and the constitutive vector pSFFV-CD40L. In spite of efficient cell transduction and vigorous mRNA transcription with both regulated and constitutive vectors (assessed by quantitative PCR, Figure 4.7B), the levels of CD154 surface expression achieved by the regulated vector were relatively low on CD154-deficient Jurkat cells and HIGM1 T cells, as determined by flow cytometry (Figures 4.8A and 4.12A).

One of the primary T cell lines derived from HIGM1 patients (PH2) presents a mutation which predicts the transcription skipping of exon 3. PCR amplification of retrotranscribed RNA from PH2 cells yielded two bands of apparent molecular size that did not match those of T lymphocytes derived from a normal individual (N1) or stimulated Jurkat cells transduced with the regulated vector pCD40L-CD40L (Figure 4.12B). Interestingly, when PH2 cells were transduced with the regulated vector pCD40L-CD40L a third band appeared as an

amplification product that was of the expected size. DNA sequencing (Figure 4.12C) revealed that the shorter band lacked exon 3, and therefore was consistent with the mutation of this patient. The other two bands matched the *CD40LG* sequence, indicating that transcription of the missing exon had been successful, although the upper band, also expressed on untransduced cells, showed altered electrophoretic mobility.

To gain further insight into the mechanisms underlying this inefficient expression, we constructed bicistronic vectors where the reporter eGFP gene was placed downstream of the therapeutic gene either under the control of the endogenous CD40L or the SFFV constitutive promoters. Only cells transduced with the constitutive vector pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP showed surface expression, in spite that all cells were transduced with the regulated bicistronic vector pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP, as determined by the eGFP expression (Figures 4.10A and 4.13). We detected, however, a significant presence of intracellular CD154 protein in activated Jurkat cells transduced with the regulated vector (Figure 4.11). The fact that these proteins are not efficiently translocated to the surface is yet another hurdle for gene therapy of HIGM1 patients.

To assess whether or not the regulated CD154 expression pattern of human cells transduced with our lentiviral constructions was restricted to human HIGM1 models, we designed and constructed a regulated lentiviral vector carrying the murine cDNA for CD154, *Cd40lg*, driven by a fragment of its endogenous promoter (pCd40lg-Cd40lg), as well as a constitutive vector (pSFFV-Cd40lg). We chose the CD4⁺ BW5147 cell line as our *in vitro* model because it does not have surface expression of CD154, not even after stimulation. These cells were efficiently transduced with the regulated or the constitutive vectors, but only those transduced with the regulated vector pCd40lg-Cd40lg were able to accomplish a

Summary

tissue-specific, transient and activation-dependent expression of CD154 (Figure 4.17 and 4.18), which emulated the results obtained in our model of human cells transduced with the regulated vector pCD40LG-CD40LG. However, in spite of the high number of integrations per cell (5,9 cc) and the vigorous expression of mRNA, the levels of surface CD154 expression on activated BW5147 cells transduced with pCD40LG-CD40LG and the subpopulation expressing it were relatively low (20%). To explore whether or not the degree of surface expression of transduced cells directly correlated with the number of vector insertions per cell, the positive population resulting from stimulating BW5147 transduced with the regulated vector pCd40lg-Cd40lg was subjected to immunoselection by cell sorting. Expansion of sorted cells originated a population where the number of vector integrations per cells rose to 9.7 and the percentage of CD154⁺ cells after stimulation increased to 48%.

We also decided to assess whether the CD154 expressed on transduced BW5147 cells was functional. In particular, coupling of CD40 with its ligand CD40L triggers signals that promote B cell proliferation (Spriggs *et al.*, 1992). We could verify this property after co-culturing transduced BW5147 cells purified spleen B cells (Figures 4.19 and 4.20). Stimulated and non-stimulated BW5147 cells transduced with the constitutive vector pSFFV-Cd40lg induced strong proliferation of B cells. Remarkably, BW5147 cells transduced with the pCd40lg-Cd40lg regulated vector triggered a robust B cell proliferation, whereas co-culture of B cells with unstimulated transduced cells did not achieve cell proliferation above the basal levels observed with untransduced cells.

Finally we determined that the CD40L expression achieved by the pCd40lg-Cd40lg regulated vector was tissue-specific, since no CD154 protein levels were detected by flow cytometry on transduced non-hematopoietic cells C2C12 (murine myoblasts), LL2LLc (murine lung carcinoma) and 293T (human

embryonic kidney cells) (Figure 4.21) despite of its effective transduction (Table 4.2). Conversely, a vigorous expression of CD40L was achieved when these cell lines were transduced the constitutive vector.

Taking together, our data obtained in a gene therapy model for HIGM1 confirms the advantages of attempting regulated expression of the transgene, a strategy that was successfully used previously in other monogenic PIDs such as WAS (Martín *et al.*, 2005; Aiuti *et al.*, 2013). We clearly were able to restore CD154 expression in a tissue-specific, transient and activation-dependent manner in murine (Fernández-Rubio *et al.*, 2015) and human *in vitro* models of HIGM1. However, we detected relatively low levels of CD154 on the surface of activated CD4⁺ lymphocytes transduced with the regulated vectors. This is probably due to interactions between the native and endogenous transcripts, which might hamper the assembly of functional CD154 trimers and/or their translocation to the cell membrane. These are serious obstacles (Seyama *et al.*, 1999) that make it very difficult the development of clinical applications in the near future. We should improve the design of our protocols to endow them with better resources to overcome these hurdles. We found, however, that achieving a regulated and physiological expression of a transgene whose expression is driven by the endogenous promoter is not restricted to the human setting. This observation may be of importance for the development of applications of genetic technologies in other species in cases where strict mechanisms of gene regulation might be required.

Introducción

1. Introducción

1.1 Inmunodeficiencias primarias

Las inmunodeficiencias primarias (PID) son un grupo heterogéneo de enfermedades que resultan de las mutaciones acontecidas en un grupo de unos 300 genes (Zhang *et al.*, 2013; Ghosh *et al.*, 2015) y que se caracterizan por causar defectos de distinta graduación en el desarrollo y/o función de las células inmunológicas. La marca característica de las PID es una susceptibilidad, generalmente creciente, a infecciones oportunistas, recurrentes y severas, aunque las hay también que se distinguen por causar una desregulación inmunológica, autoinmunidad y susceptibilidad a tumores linfoproliferativos entre los síntomas principales de su presentación clínica. Las formas más severas de PID son las denominadas inmunodeficiencias combinadas severas (SCID), que provocan un desarrollo defectuoso de las células T y un funcionamiento anormal de las células B.

Las opciones terapéuticas son muy limitadas y se basa en una terapia paliativa que consiste en la administración de antibióticos profilácticos y el reemplazamiento de inmunoglobulinas. La única alternativa curativa es el trasplante de médula ósea alogénica para obtener células troncales hematopoyéticas (Notarangelo *et al.*, 2010). Con un donante HLA idéntico se consigue entre un 70% (cuando es no relacionado) y un 90% (si es relacionado) de supervivencia a largo plazo (Antoine *et al.*, 2003), pero cuando no está disponible un donante así, la toxicidad asociada a los agentes quimioterápicos citorreductores y la enfermedad de injerto contra hospedador pueden llevar a una mortalidad significativa. En el caso de la inmunodeficiencia combinada severa por déficit en

Introducción

adenosín deaminasa (ADA-SCID) un trasplante alogénico haploidéntico no relacionado conlleva una mortalidad del 70% y del 50% cuando es relacionado, aunque en este último caso se piensa que la limitada tasa de supervivencia se debe sobre todo a los tratamientos condicionantes previos (Gaspar *et al.*, 2009). Es por ello que la introducción de la terapia génica ha supuesto una importante aportación terapéutica para estos pacientes.

1.1.1 El Síndrome de Híper-IgM

Más en concreto, las inmunodeficiencias primarias humanas son un complejo grupo de enfermedades, cuya etiología es la mutación en un gen no redundante que da lugar a una profunda incapacidad del Sistema Inmunológico para desarrollar una respuesta efectiva tras el encuentro con el antígeno.

Hasta la fecha se han caracterizado molecularmente cerca de 150 inmunodeficiencias primarias y su número sigue creciendo paulatinamente con el paso de los años (Booth *et al.*, 2011). Sobre todo durante la última década se han obtenido grandes progresos en el entendimiento de las bases moleculares de estas enfermedades (Notarangelo *et al.*, 2009).

La consecuencia para el paciente es la presentación de severas infecciones de repetición, alteraciones en el desarrollo estaturó-ponderal, una mayor susceptibilidad a la aparición de tumores, así como la frecuente presencia de manifestaciones por autoinmunidad (Fischer *et al.*, 2004; Notarangelo *et al.*, 2009; Notarangelo *et al.*, 2010).

Particularmente, los síndromes de híper-IgM con déficit de IgG (HIGM), originalmente denominadas disgamaglobulinemias (Rosen *et al.*, 1961), son un grupo de enfermedades con carácter de inmunodeficiencias primarias y que se distinguen por una señalización defectuosa vía CD40 en los linfocitos B. Como consecuencia, los pacientes de HIGM presentan niveles séricos bajos de IgG e IgA y altos o normales de IgM. Esta situación les otorga una elevada susceptibilidad a infecciones recurrentes.

El más común de estos síndromes, presente en el 65-70% de los casos de HIGM, es el ligado al cromosoma X (HIGM1, nº OMIM 308230) que se debe a diferentes mutaciones en el gen codificante del ligando del CD40, es decir, el CD40L o CD154 (Allen *et al.*, 1993). Dicho gen, el *CD40LG* humano, se encuentra en el brazo largo del cromosoma X (Xq26-27).

La molécula CD154 se expresa de manera regulada en linfocitos T CD4⁺ activados (Lane *et al.*, 1992; Castle *et al.*, 1993) y es indispensable para las interacciones entre células T-B por su unión al CD40, que se expresa de manera constitutiva en linfocitos B, lo que compromete de manera sustancial el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas desde IgM a IgG, IgA o IgE (Foy *et al.*, 1996). Es por ello que los pacientes con

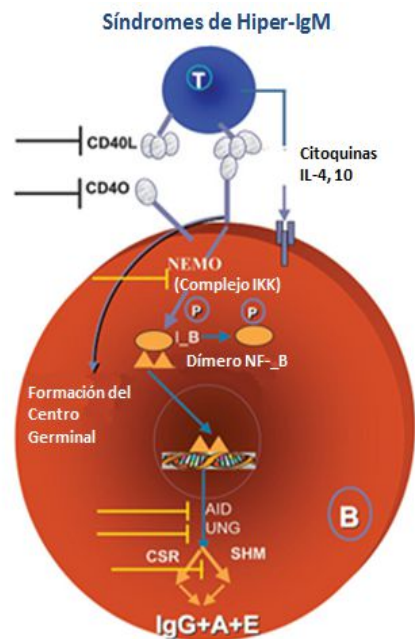


Figura 1.1 Representación esquemática de los diversos defectos moleculares conocidos que provocan síndromes de Hiper-IgM. Se incluyen aquellos que atañen a los genes: *CD40LG*, *CD40*, *AID*, *UNG* y *NEMO*. Adaptado de (Etzioni and Ochs, 2004; Ghosh *et al.*, 2015).

Introducción

HIMG1 tienen ausencia de IgG, IgA e IgE, mientras que los valores de IgM se encuentran habitualmente aumentados (Winkelstein *et al.*, 2003). Además de estas funciones, CD40L tiene una participación en la maduración de las células presentadoras de antígeno y en la estimulación de las funciones efectoras de los macrófagos, así como en el proceso de cebado del antígeno a los linfocitos T (Jain *et al.*, 1999). Por tanto, los pacientes con HIMG1 sufren también alteraciones en las funciones efectoras de linfocitos T y macrófagos, que añadidas a la incapacidad para efectuar el cambio de isotipo, lleva a los pacientes a sufrir infecciones de repetición producidas por bacterias, virus, hongos y parásitos. Además de ello, y al igual que otras inmunodeficiencias primarias, también son frecuentes las alteraciones autoinmunitarias y la aparición de tumores (Etzioni and Ochs, 2004).

Como se ha comentado previamente, es de especial interés comprender la enorme importancia funcional de las moléculas CD40 y CD154, cuya interacción resulta fundamental para el desarrollo de una respuesta inmunológica normal y eficiente, merced a la cascada de señales que desencadena en las células B (y aunque de forma menos conocida también en las células T) y que permite, entre otras cosas, que el organismo pueda estructurar la respuesta inmunológica adaptativa. Pero un defecto en la expresión de CD154 no se limita a afectar exclusivamente al cambio de isotipo de las inmunoglobulinas o a la generación de hipermutaciones somáticas en las mismas, sino que afecta a una amplia gama de funciones biológicas dentro del sistema inmunológico, tal y como se puede apreciar en la Tabla 1.1.

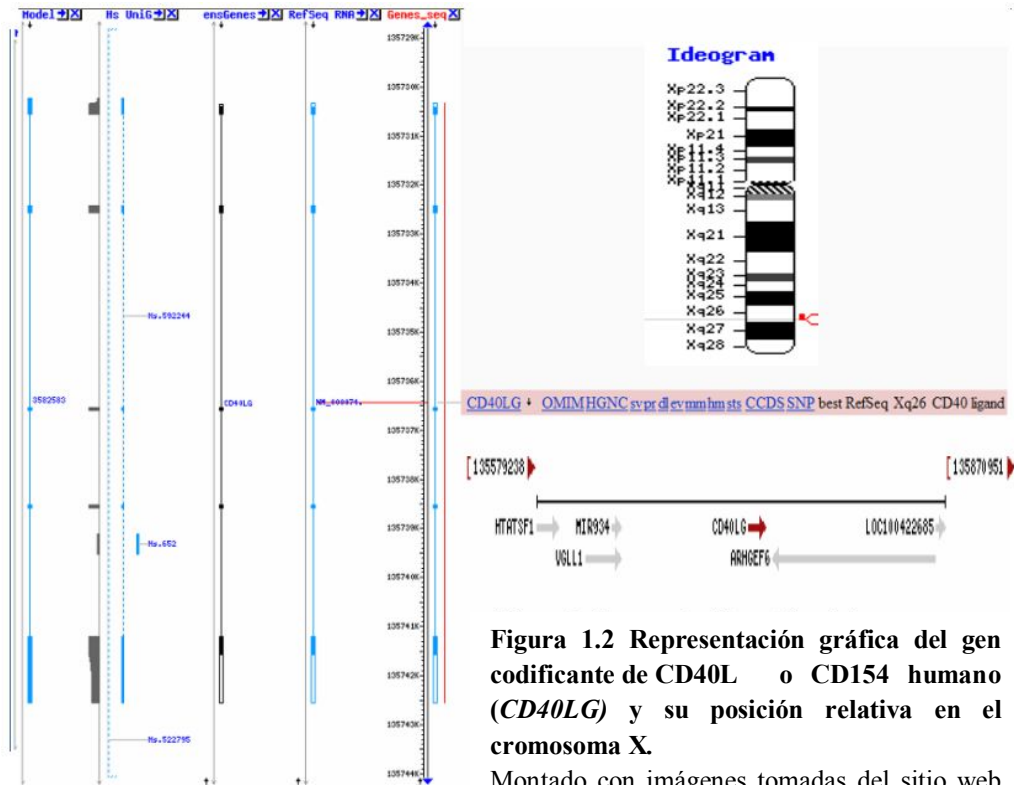


Figura 1.2 Representación gráfica del gen codificante de CD40L o CD154 humano (*CD40LG*) y su posición relativa en el cromosoma X.

Montado con imágenes tomadas del sitio web de NCBI.

No obstante, las mutaciones en *CD40LG* no son las únicas, aunque sí las más frecuentes, que pueden generar un fenotipo correspondiente al síndrome de hiper-IgM, lo que deviene, como ya se ha dicho, en la existencia de otros síndromes pertenecientes al grupo de HIGM (Tabla 1.2). Así, podemos encontrarnos con mutaciones en al menos 4 genes expresados en células B que desembocan en distintas formas de HIGM. El ejemplo más evidente son las mutaciones que afectan a CD40, que causa una forma autosómica y poco frecuente de la enfermedad y que tiene una clínica muy similar a la producida por deficiencia en CD154 (Ferrari *et al.*, 2001). Por otro lado, mutaciones en la citidina desaminasa inducida por activación (AID) (Revy *et al.*, 2000) y en la uracilo glicosilasa (UNG) (Imai *et al.*, 2003), ambas expresadas en los linfocitos B

Introducción

foliculares, también conducen a un proceso defectuoso en el cambio de clase y en la inducción de hipermutaciones somáticas de las inmunoglobulinas.

Finalmente, hay que nombrar al gen codificante del factor nuclear kB (NEMO), que está ligado al cromosoma X también. Las diferentes mutaciones hasta ahora detectadas en este gen dan lugar, según parece, a displasia ectodérmica hipohidrótica y a inmunodeficiencia (Jain *et al.*, 2001).

1.1.2 Genes CD40LG /Cd40lg y su mRNA

El cDNA del gen *CD40LG* humano fue aislado a partir de una genoteca de células T de sangre humana usando una sonda de la secuencia nucleotídica del *Cd40lg* murino (Hollenbaugh *et al.*, 1992). La secuencia humana codifica un polipéptido de 261 aminoácidos: 22 citoplasmáticos, 24 transmembrana y 255 extracelulares con 5 cisteínas (*Genbank* nº Z15017, X67878, S49392 y L07414).

El gen de *CD40LG* humano (*Genbank*, *Gene ID*: 959) está localizado en el cromosoma X, posición Xq26.3-Xq27.1 donde ocupa entre 12 y 13 Kb de DNA cromosómico y tiene 5 exones. El exón 1 codifica las regiones intracitoplasmática y transmembrana, y una pequeña porción de la extracelular, mientras que los otros 4 exones codifican el resto de la secuencia extracelular. En esta secuencia también hay un promotor 5' de 2000 pares de bases.

Por su parte, el cDNA codificante de CD40L murino fue aislado de la línea celular murina EL-4 (Armitage *et al.*, 1992) a partir de su mRNA. Dicha secuencia predice un polipéptido de 260 aminoácidos: 22 aminoácidos de dominio citoplasmático, 24 de dominio transmembrana y 214 de dominio extracelular con cuatro cisteínas (*Genbank* nº X65453). La proteína CD40L murina es una proteína

de membrana tipo II a la que le falta un péptido señal aminoterminal y que presenta su extremo carboxiterminal extracelularmente.

	Función	Tipo celular	Mediador
Immunología humoral	Activación	Linfocitos B	CD23, CD30, CD80, CD86, Fas, MHC II; IL-6, IL-10, TNF- α , TGB- β
	Apoptosis	Linfocitos B Ag-inespecíficos	Fas-FasL
	Proliferación y Supervivencia	Linfocitos B Ag-específicos	Señal BCR-Ag interrumpe apoptosis vía FAS-FasL IL-2, IL-4 e IL-10
	Producción de Igs	Linfocitos B	IL-2 e IL-10
	Cambio de isotipo de las Igs	Linfocitos B	IgA, IgD(?), IgG, IgM, IgE
	Formación de centros germinales y	Linfocitos B	IL-2 e IL-10, receptores de citoquinas
Immunología celular	Citoquinas proinflamatorias	Linfocitos B, Eosinófilos, Monocitos, Células dendríticas, Células epiteliales, Fibroblastos, Queratinocitos, Células endoteliales, Células del músculo liso	IL-1, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , TGB- β
	Quimioquinas	Monocitos, Células epiteliales, Fibroblastos, Queratinocitos, Células endoteliales	IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-1, ABCD-1, CCR7 y CCR1/5 (disminuido)
	Moléculas de adhesión	Linfocitos B, Células endoteliales, Fibroblastos	LFA-1, ICAM-1, VCAM-1, selectina E, VLA-4
	Metaloproteínas de la matriz	Monocitos, Fibroblastos, Células endoteliales, Células del músculo liso	Colagenasas intersticiales 1 y 3 (MMP-1 y MMP-13), gelatinasa A y B (MMP-2 y MMP-9), estromelisin 1 (MMP-3) y 3 (MMP-11)
	Elementos procoagulantes	Monocitos, Células endoteliales, Células del músculo liso	Factor tisular
	Otras	Monocitos, Células endoteliales, Células dendríticas, Fibroblastos	Cox-2 y óxido nítrico
Funciones en la patogénesis del cáncer	Proliferación y rescate de la apoptosis	Células tumorales con baja expresión de CD40 en superficie	Factor activador de plaquetas (PAF) Activación vía NF- κ B TRAF-2, IKK α , TRAF-6 Regulación gen p53
	Apoptosis	Células tumorales con alta expresión de CD40 en superficie	TNF- α (regulación de vía NF- κ B) Regulación gen p53

Tabla 1.1 Funciones biológicas de la interacción CD40-CD40L.
Adaptado de (Schönbeck and Libby, 2001; Hassan *et al.*, 2015)

Introducción

Enfermedad	HIGM1	HIGM3	ED-ID	HIGM2	HIGM5
Producto génico defectuoso	CD40L	CD40	NEMO/IKB α	AID/AID-C ter def	UNG
Prevalencia (%)	70	10	2-8	1-8	5
Herencia	Ligada al cromosoma X (XL)	Autosómica recesiva (AR)	XL/Autosómica dominante (AD)	AR/AD	AR
Cambio de isotipo Ig	Ausente	Ausente	Ausente en algunos	Ausente	Ausente
Hipermutaciones somáticas	-	-	-	-/+	Defectuosas
Infecciones bacterianas	+++	+++	+++	+++	+++
Infecciones oportunistas	+++	+++	+++	-	-
Hiperplasia linfoide	-	-	-	++/+	+
Autoinmunidad	+	+	-	++/?	?
Colangitis esclerosante	+++	+++	-	-	-
Cáncer	++	?	?	-	-/?
Reemplazo de Igs	+++	+++	+++	+++	+++
Profilaxis contra PJP	+++	+++	-/?	-	-
Trasplante de células troncales	++	++	?	-	-

PJP *Pneumocistis (carini) jiroveci pneumocistis*

Tabla 1.2 Características de los síndromes de Híper IgM. Adaptado de (Etzioni and Ochs, 2004; Qamar *et al.*, 2014)

Tras la identificación de la localización del gen en humano se procedió a generar ratones CD40L *knock out* (Renshaw *et al.*, 1994). El gen murino, *CD40lg* (Genbank, Gene ID: 21947), se encuentra también en el cromosoma X, posición X A5; X 31.21 cM. Cuenta igualmente con 5 exones y 4 intrones, lo que en sí mismo es una anomalía dentro de la estructura de los genes de la familia del TNF, que suelen tener 4 exones y 4 intrones como el FASLG (Takahashi *et al.*, 1994), y puede considerarse como una evidencia de una divergencia evolutiva del gen

codificante para CD154. El primer exón codifica, aparte de la región 5'UTR, los primeros 52 aminoácidos de la proteína, que incluyen los 22 aminoácidos de la cola intracitoplasmática, los 24 de la región transmembrana y los 6 primeros aminoácidos de la región extracelular. Los otros cuatro exones codifican el resto de la secuencia proteica dispuesta extracelularmente y el quinto de los exones también abarca región 3'UTR (Tsitsikov *et al.*, 1994).

Los análisis por *Northern blot* detectan dos especies de mRNA en linfocitos T activados (Spriggs *et al.*, 1992): una de 2,1 Kb y otra de 1,4 Kb que difieren en la longitud del 3'UTR y que se han encontrado en linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y Tγδ⁺. En monocitos, células dendríticas, células B, mastocitos, basófilos, eosinófilos y megacariocitos hay mRNA de 1,7 y 3,7 Kb.

1.1.3 Proteína CD154 o CD40L

CD154, también conocido como CD40L, gp39, T-BAM o TRAP es una glicoproteína de membrana tipo II, homóloga a la familia de factores de necrosis tumoral y que se expresa principalmente en linfocitos T CD4⁺ activados. Se la conoce como gp39 porque en los primeros estudios se observó que tenía una masa aparente de 39 KDa. Sin embargo, en la mayoría de las células su masa es de 32-33 KDa. La secuencia aminoacídica sugiere un esqueleto de sólo 29 KDa, lo que probablemente implica la existencia de modificaciones postraduccionales.

Tanto las moléculas humana, murina y bovina tienen conservado un único sitio de glicosidación N-terminal en la región extracelular (Asn 240 en humano). Comparando las proteínas humana (Swiss nº P2995) y murina (Swiss P27548) se

Introducción

observa que existe un 78% de identidad aminoacídica: 75% en región extracelular, 96% en región transmembrana y 81% en región citoplasmática.

En la secuencia humana, la región similar al TNF (una forma soluble que abarca de la Gly 116 a Leu 261) ha sido resuelta por cristalografía de rayos X a una resolución de 2 Armstrong (Karpusas *et al.*, 1995). La proteína CD154 tiene una estructura de barril beta tipo sándwich conformada por dos láminas beta con una topología de remolino o *jellyroll*. La proteína se organiza en homotrímeros con simetría ternaria (*Protein Data Bank* #1 ALY). La organización 3D es semejante a la del TNF α y las proteínas LT α (Figura 1.3).

Aunque CD154 se produce como proteína transmembrana tipo II también puede ser expresada en la superficie celular como complejo heteromultimérico (Hsu *et al.*, 1997). Existen dos versiones más cortas de CD154 con las que se puede asociar el monómero CD154 de 33 KDa: uno de 31 y otro de 18 KDa (Mazzei *et al.*, 1995). Estas formas cortas y solubles mantienen su capacidad para formar trímeros, unirse a CD40 y transmitir señales biológicas, por lo que CD154 puede funcionar como una interleucina genuina (Graf *et al.*, 1995), lo que no evita que puedan existir diferencias puntuales entre las dos isoformas cortas y la normal.

CD154 se expresa en linfocitos T CD4⁺ maduros activados, pero no así en dichos linfocitos en estado de reposo, algo que ha podido comprobarse tras realizar marcajes con anticuerpos monoclonales. Se puede inducir su expresión en células Th0, Th1 y Th2 y aunque suele restringirse a células CD4⁺ también hay una pequeña población de células T CD8⁺ que lo expresan. Otras células en las que se ha demostrado la expresión de CD154 en mayor o menor proporción son las células T $\gamma\delta^+$ /CD4⁻/CD8⁻, mastocitos, basófilos, eosinófilos, células B,

NK, monocitos/macrófagos y células dendríticas (Carbone *et al.*, 1997; Mach *et al.*, 1997). Igualmente se ha descrito que hay CD154 preformado almacenado en el interior de los trombocitos (Henn *et al.*, 1998).

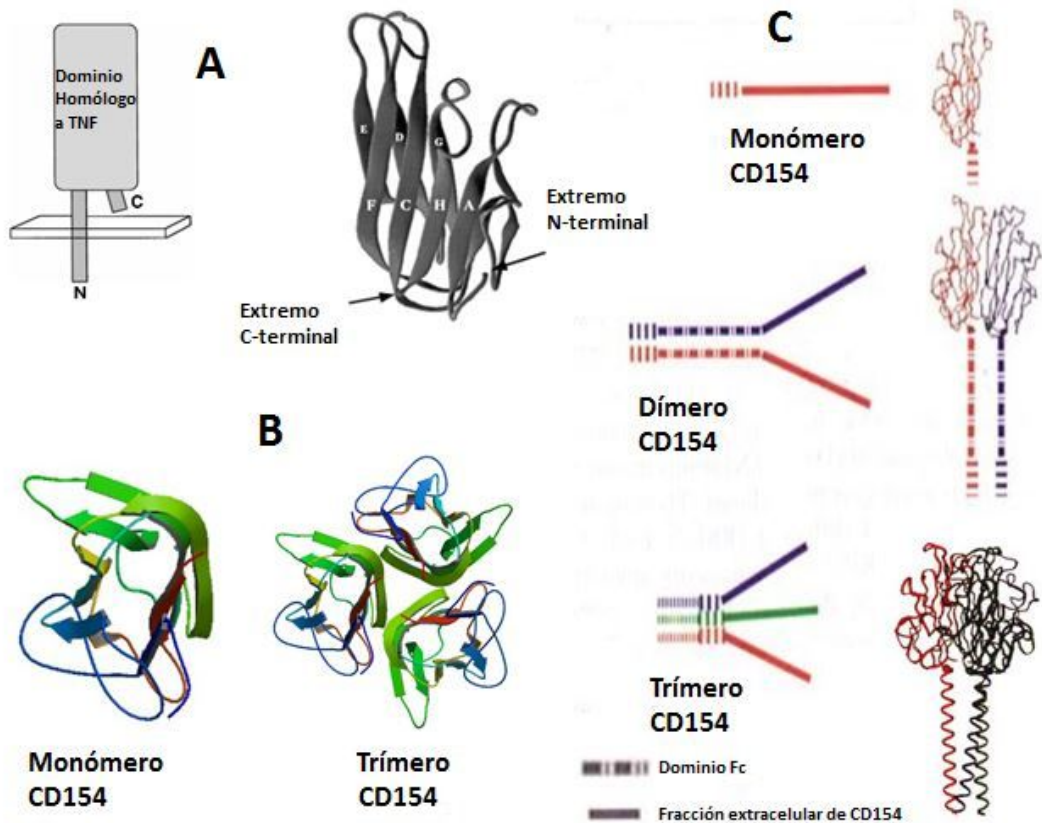


Figura 1.3 Organización y estructura tridimensional del CD154 humano. A) Representación esquemática de la proteína CD154 (izquierda), su región extracelular cuenta con el extremo carboxiterminal y tiene homología estructural con otros miembros de la familia TNF. Mediante difracción de rayos X (resolución de 2 Armstrong) se ha determinado la estructura tridimensional en homotrimeros de la fracción extracelular de CD154 (derecha) que incluye un *sándwich* de dos láminas β con una topología de *jellyroll* (Protein Data Bank #1 ALY) (Tomado de van Kooten *et al.*, 2000). B) Estructura tridimensional en vista aérea de un monómero (izquierda) y un trímero (derecha) de CD154 (Protein Data Bank #1 ALY). C) Diagrama de las distintas formas solubles de CD154: monómero, homodímero y homotrímero (Fanslow *et al.*, 1994).

Introducción

Dado que las respuestas inmunológicas adaptativas secundarias se inducen en los órganos linfoides y los síndromes de híper IgM están causados por mutaciones en *CD40LG* o en el de otros elementos de su ruta de señalización que están implicados en estos procesos, se esperaría una mayor expresión de CD154 en esas regiones anatómicas. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta hoy no son muy claros: la inmunohistoquímica ha demostrado que CD154 humano se expresa en linfocitos T CD4⁺ de los centros germinales de la zona “clara” de los folículos secundarios en todos los tejidos linfoides periféricos y en áreas ricas en linfocitos T de las zonas interfoliculares (Lederman *et al.*, 1992). No obstante, en bazo de ratón aislado 3 o 4 días tras su inmunización con el antígeno KLH timo-dependiente, las células T CD4⁺/CD154⁺ se encuentran dentro y alrededor de las arteriolas terminales y en la periferia de la vaina linfoide periarteriolar externa, pero no en los centros germinales (van den Eertwegh *et al.*, 1993).

Por tanto, la expresión de CD154 está fuertemente regulada, especialmente en el interior de los órganos linfoides para prevenir una activación inespecífica. Por este motivo, sutiles diferencias podrían alterar los patrones observados de expresión de CD154. No deja de ser interesante que en tejidos bajo condiciones inflamatorias hay un expresión muy fuerte de CD154 murino, como es el caso de lesiones ateroscleróticas y rechazo de trasplante renal (van Kooten *et al.*, 2000).

1.1.4 Regulación de la expresión de CD40LG/Cd40lg

CD40LG está sujeto a mecanismos regulatorios muy estrictos que son de una importancia funcional muy elevada (Foy *et al.*, 1996). Para que se exprese *CD40LG* hacen falta tanto la activación de la proteincinasa C, como un aumento de la concentración citosólica de Ca²⁺ (Fuleihan *et al.*, 1994), que desencadena

una cascada de señales en las que intervienen, al parecer, la calcineurina y la calmodulina. Desde hace varios años se sabe que los genes CD40L humano (*CD40LG*) y murino (*Cd40lg*) comparten mecanismos de regulación con los genes que codifican para IL-2 e IL-4 de sus respectivas especies. Esto es así porque algunos factores de transcripción que regulan los genes de las interleucinas 2 y 4, al unirse a motivos específicos presentes en sus promotores, también se encargan de controlar la expresión de los genes CD154 murino y humano (Tsytsykova *et al.*, 1996) (Tabla 1.3).

De este modo, al contar el promotor de *CD40LG* con estos motivos específicos para la unión de los mencionados factores de transcripción, se establece un sistema regulatorio tan fino como al que obedece la expresión de las interleucinas IL-2 e IL-4. El motivo TTTTCC se encuentra 4 veces representado en la secuencia del promotor *Cd40lg* (Tabla 1.3) y a ella se unen 2 miembros de la familia de factores de transcripción NF-AT.

Además, es necesaria la unión de la proteína AP-1 de la familia Jun y Fos, a los complejos formados por los factores de transcripción y las secuencias TTTTCC del promotor para obtener una expresión correcta del gen. Por ello, el promotor tiene también sitios de unión para AP-1 (Tsytsykova *et al.*, 1996). La expresión de la proteína CD154 murina en la superficie de linfocitos T (tumoraes o primarios) activados es temporal y está muy controlada. Existen numerosos modelos de activación policlonal de células T para inducir la expresión de CD154: fitohemaglutinina (PHA), acetato de forbol miristato (PMA) e ionomicina, anticuerpos anti-CD3 y anti-CD2. Además, la estimulación mediante CD28 potencia la expresión de CD40L inducida por anti-CD3 al estabilizar dicha expresión (Johnson-Leger *et al.*, 1998). Tras 5 a 15 minutos de estimulación con anti-CD3 o PMA/Ionomicina se puede detectar CD40L en células T

Introducción

CD4⁺/CD45R⁺ (Roy *et al.*, 1993; Casamayor-Pelleja *et al.*, 1995). Tal expresión no requiere la síntesis *de novo* de proteínas y probablemente se trate de CD154 preformado. Una segunda ola de expresión de CD154 que sí necesita síntesis proteica *de novo* y que va precedida del aumento de los niveles de mRNA se puede detectar en todas las células T CD4⁺ 1 o 2 horas tras la activación y su pico máximo de expresión se alcanza a las 4-8 horas, en caso de haber estimulado con anti-CD3, o a las 6-8 horas en el caso de haber usado PMA/Ionomicina, seguido en ambos casos por una pérdida progresiva de intensidad que decae completamente a las 24 horas (Roy *et al.*, 1993).

Gen	Motivo	Posición	Secuencia
<i>Cd40lg</i>	NM-1	74 a 57	AAGCACATTTTCCAGGAA
	NM-2	283 a 266	GCAGTATTTTTTCCTATTG
	NM-3	935 a 918	AAAGTCTTTTTTCCTTAGC
	NM-4	1016 a 999	AAATGAGTTTTCCAAATG
	NLM-1	327 a 310	TTTGTCaTTTCCTTGAA
	NLM-2	1169 a 1152	AAGCAATTTTaCCAGTTT
<i>Il2</i>	NF-AT1	290 a 273	AAACAAATTTTTCCTCTTT
<i>Il4</i>	PI	81 a 64	AATAAAATTTTCCAATGT

Tabla 1.3 El factor nuclear de células T activadas o NF-AT está compuesto por una subunidad citoplasmática (igualmente denominada NF-AT) y otra subunidad nuclear (AP-1).

Los genes murinos *Cd40lg*, *Il2* e *Il4* poseen secuencias reguladoras o motivos de unión para estas subunidades (NM en el caso de NF-AT o PI en el caso de AP-1) *aguas arriba* de dichas secuencias génicas, lo que permite el control de la expresión de las mismas. Sus posiciones relativas respecto a estos genes y sus secuencias se muestran en esta tabla. Adaptado de Tsytzykova *et al.*, 1996.

La expresión de la proteína CD154 humana en la superficie de linfocitos T primarios de sangre periférica, o de líneas tumorales CD4⁺, sigue unos mecanismos de control igualmente estrictos y con unos patrones de expresión muy similares a los observados en células de ratón. El pico máximo de expresión se

encuentra igualmente a las 6-8 horas (Fuleihan *et al.*, 1994), aunque algunos estudios han sugerido una cinética algo más lenta, con unos valores máximos de CD154 a las 8-12 horas (revisado por Armitage *et al.*, 1993).

Aparte de esta expresión temporal intrínseca, hay mecanismos adicionales que operan para asegurar que la expresión de CD40L queda restringida en el tiempo.

La interacción CD40-CD154 lleva a:

- 1) Endocitosis mediante receptores para CD154 y degradación lisosomal.
- 2) Liberación de CD40 soluble que se une a CD154.
- 3) Ruptura proteolítica de CD154.
- 4) Desactivación de la producción de mRNA de *CD40LG*.

Por otro lado, el pretratamiento de células T con ciclosporina A o glucocorticoides previene *in vitro* la inducción de la expresión de CD154 (Fuleihan *et al.*, 1994), aunque en linfocitos de pacientes de trasplante así tratados aún se tiñen con anticuerpos anti-CD154 en zonas de rechazo del injerto. En otros tipos celulares se sabe menos de las condiciones fisiológicas necesarias para inducir la expresión de CD154, aunque casi todas toleran la estimulación por PMA e ionomicina. Un caso peculiar es el de las plaquetas humanas, que tras estimularlas con trombina, expresan en su superficie CD154 en tan sólo 1 minuto.

1.1.5 Proteína CD40 y otros receptores de CD154

El contra receptor de CD154 en células B, CD40, es un miembro de la familia de los receptores de TNF y de factores de crecimiento nerviosos (Smith *et al.*, 1994). Hasta ahora CD40 ha sido descrita como una molécula expresada en todos los estadios de desarrollo y diferenciación de los linfocitos B de forma constitutiva. Desde el descubrimiento de la proteína CD40 en 1985 la mayoría de las investigaciones sobre la misma se han centrado en su papel en la regulación de las respuestas inmunológicas humorales. CD40 también se expresa en monocitos y células dendríticas. En éstas últimas juega un papel crítico en su maduración hasta células presentadoras de antígeno totalmente competentes. A causa de esto, tanto los pacientes de HIGM como los modelos de ratón CD40L *knock out* muestran una destacable anormalidad en el cebado del antígeno a células T CD4⁺ vírgenes, lo cual no disminuye su importancia en la interacción cruzada células dendríticas-linfocitos T CD8⁺. La expresión de CD40 no queda restringida al linaje hematopoyético, de tal manera que células endoteliales y fibroblastos participan en la regulación de la respuesta inflamatoria mediante la localización de CD40 en su superficie.

Al igual que el CD154, la molécula CD40 también tiene una forma soluble natural, que puede actuar a larga distancia, como una interleucina al uso, algo que no es improbable dado que ambas moléculas pertenecen a familias de receptores y ligandos que incluyen miembros que sí son interleucinas (familias de TNF y TNFR). Las familias moleculares se caracterizan por poseer homologías estructurales entre sus miembros, que se suelen agrupar en una localización precisa del cromosoma al tiempo que suelen compartir rutas de transducción de señales moleculares y que a menudo solapan sus funciones biológicas entre ellas

como en procesos como el crecimiento, diferenciación y muerte celular (Foy *et al.*, 1996).

Además de su principal receptor, CD154 es capaz de ligarse a otros receptores como son las integrinas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Andre *et al.*, 2002), $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ (Léveillé *et al.*, 2007) y $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ (Zirlik *et al.*, 2007). La unión a $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ induce la fosforilación de la integrina β3 y la expansión plaquetaria (Prasad *et al.*, 2003). Es más, se ha comprobado que la ausencia de CD154 afecta a la estabilidad de los trombos arteriales y retrasa la oclusión de los vasos sanguíneos por ellos afectados (Andre *et al.*, 2002). La unión de CD154 con la integrina $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ produce en monocitos una rápida activación de la MAPK ERK1/2 y un aumento en la producción de IL-8 (Léveillé *et al.*, 2007). Se sabe que la díada CD154- $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ interviene de forma activa en los procesos inflamatorios de enfermedades de las vías respiratorias. Finalmente, la interacción entre la integrina $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ y CD154 es capaz de promover la adhesión y migración de monocitos, así como la liberación de mieloperoxidasa *in vitro*, potenciando los eventos de iniciación de la aterosclerosis (Loubaki *et al.*, 2010).

1.1.6 Naturaleza física de la interacción CD40-CD154

Conviene subrayar lo extraordinariamente significativo del papel ejercido por la interacción CD40-CD154 en respuestas celulares T dependientes de células B (Tabla 1.1), algo que quedó especialmente en evidencia tras el hallazgo de que los pacientes de HIGM-1 sufren mutaciones en el gen codificante de CD40L. Deficiencias similares en el montaje de la respuesta inmunológica se han observado en ratones genéticamente modificados para que no puedan activar los genes de CD40 y CD154. Una interacción molecular que tiene profunda

Introducción

importancia en situaciones clínicas tan recurrentes como el trasplante, el desarrollo de problemas autoinmunológicos o las enfermedades infecciosas.

Un factor determinante en la interacción CD40-CD154 y de la subsiguiente activación de los linfocitos B es la distribución de CD154 en la superficie celular de las células T, que cambia sustancialmente, fomentando dicha interacción, bajo una situación de estimulación debido a la redistribución causada por su concentración en balsas lipídica o *rafts* (El Fakhry *et al.*, 2010). Las balsas lipídicas son microdominios de la membrana celular ricos en colesterol y esfingolípidos, de los que se sabe que amparan una gran cantidad de proteínas adaptadoras implicadas en la señalización y que actúan como plataformas que facilitan las interacciones intercelulares (Bi *et al.*, 2001). El número y el tamaño de las balsas lipídicas aumentan de forma abrupta al estimular los linfocitos T (Tani-ichi *et al.*, 2005), al igual que la producción de sus componentes, aunque éstos y sus proporciones varíen de una especie a otra (El Fakhry *et al.*, 2010). La activación de las células T requiere la interacción sostenida entre el TCR y los complejos MHC-péptidos de linfocitos T y células presentadoras de antígeno (Norcross *et al.*, 1984; Paul *et al.*, 1994). De esta interacción, que se lleva a cabo en un pequeño espacio físico entre ambos tipos celulares, denominada sinapsis inmunológica, de su formación y de su correcto funcionamiento depende el inicio de la respuesta inmunológica adaptativa (Batista *et al.*, 2001; Vascotto *et al.*, 2007). La sinapsis inmunológica es una estructura dinámica que se organiza a partir de pequeñas balsas lipídicas en el contexto de la membrana polarizada de linfocitos T para crear una maquinaria para la señalización sostenida de esas células (Kucik *et al.*, 1996; Sánchez-Madrid *et al.*, 1999; Moffett *et al.*, 2000). Se ha demostrado que cuando se produce la unión entre CD154 y CD40, esto motiva la traslocación del CD154 a las balsas lipídicas, donde se concentra y se ve acompañado de un número creciente de moléculas coestimuladoras y de apoyo

(como algunas quinasas de la familia Src relacionadas con la señalización vía TCR) (El Fakhry *et al.*, 2010), que en definitiva es respondida con una concentración del CD40 en la sinapsis inmunológica, lo que de forma sinérgica permite la potenciación de la estimulación tanto de la célula B, como de la célula T.

Durante mucho tiempo se ha considerado que, a causa de que CD154 se expresa como un trímero estable (Karpusas *et al.*, 1995), su unión con CD40 provocaría la trimerización del mismo, tal y como sucede con otros miembros de la familia de TNF. En particular, existe una gran homología con el patrón canónico marcado por la mayoría de las interacciones entre miembros de la familia TNF y miembros de la familia TNFR. No obstante, hoy se sabe, y no sin que haya generado cierta sorpresa, que un trímero de CD154 se liga a tan sólo dos moléculas de CD40 (An *et al.*, 2011). Las subunidades monoméricas se distribuyen dentro del trímero de CD154 dejando tres hendiduras donde poder albergar hasta tres moléculas de CD40. No hay diferencias en el espacio o el volumen abarcado entre esas tres hendiduras y no se han descrito impedimentos estéricos en ninguno de los modelos cristalográficos descritos, pero sin embargo, una de las tres queda vacía, dejando una proporción molecular CD40-CD154 de 2:3 (Figura 1.4). Esto parece debido a la existencia de algunas diferencias sustanciales encontradas en su interacción con respecto al patrón TNF-TNFR característico, especialmente en lo referente a los aspectos que controlan la unión al ligando y la especificidad de la activación de CD40.

La interacción CD40-CD40L depende en gran medida de la complementariedad de cargas, algo común en la mayoría de este tipo de asociaciones moleculares, pero que es más acusado en la unión CD40-CD154 que en la mayoría de interacciones TNF-TNFR. CD40 presenta tres dominios ricos en

Introducción

cisteínas (CRD), cuya importancia radica en ser regiones que facilitan la formación de puentes disulfuro ínter e intramoleculares. El denominado CDR3 de CD40 presenta un puente disulfuro en una posición ciertamente inusual, que lleva a una distribución desigual de cargas en la interacción de esa molécula CD40 con las dos subunidades afectadas de CD154. Al margen de estas observaciones, aún se desconoce la explicación exacta para esta anómala proporción molecular entre CD40-CD154.

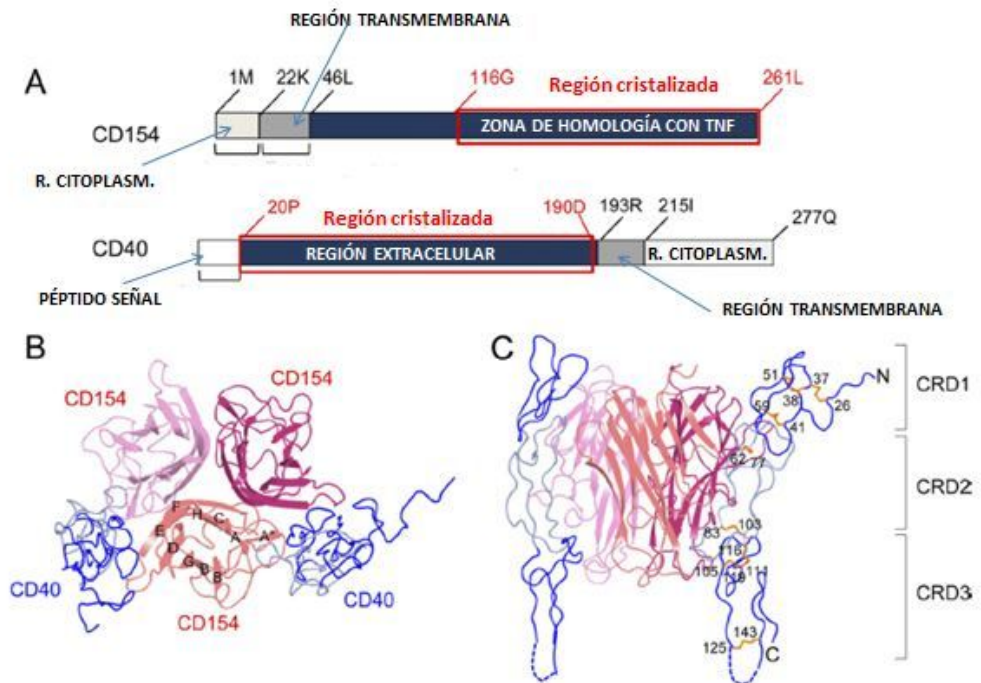


Figura 1.4 Estudio de la interacción CD154-CD40 por difracción de rayos X tras la cristalización de los complejos CD154-CD40 a una resolución de 3,5 Armstrong. A) Representación esquemática de las secuencias lineales aminoacídicas de CD154 y CD40 humanos. Las regiones encerradas en cajas rojas indican las regiones cristalizadas de cada molécula con las que se han obtenidos las gráficas B y C. B) Vista superior y C) lateral del complejo CD154-CD40 cristalizado. Cada trímero de CD154 se asocia con sólo dos moléculas de CD40, dejando un sitio intermonomérico de CD154 vacío. La región extracelular de CD40 cuenta con tres dominios ricos en cisteína (CRD) que proporcionan gran estabilidad a la molécula gracias a la formación de dos puentes disulfuro por CRD (An *et al.*, 2011). molécula gracias a la formación de dos puentes disulfuro por CRD (An *et al.*, 2011).

Además, las particularidades de estas dos moléculas no acaban ahí, ya que se sabe que, entre otras características, tienen un efecto notable en la regulación de la producción de interleucinas tales como la IL-12 (Foy *et al.*, 1996).

1.2 Terapia génica e inmunodeficiencias primarias

El tratamiento de las inmunodeficiencias primarias, típicamente diagnosticadas en los primeros meses de vida, es difícil y en general poco efectivo. El trasplante de médula ósea tiene éxito en aquellas situaciones en las que es posible disponer de un donante relacionado HLA-idéntico. Sin embargo, en todos los demás casos este tratamiento conlleva una elevada morbilidad y mortalidad, especialmente en aquellos pacientes mayores de 5 años en el momento del trasplante (Antoine *et al.*, 2003; Griffith *et al.*, 2008). Lamentablemente, la mayoría de los pacientes sólo pueden recurrir a tratamientos paliativos basados en la administración de inmunoglobulinas intravenosas o subcutáneas (Hill *et al.*, 1971; Gardulf *et al.*, 1995) y en profilaxis antibiótica. Las dosis necesarias para alcanzar un éxito relativo y temporal van en función de la severidad de la inmunodeficiencia, lo que, en definitiva, deja a un significativo número de pacientes en una situación extremadamente delicada, cuya consecuencia más reseñable es que la esperanza de vida de los individuos que sufren inmunodeficiencias graves, como es el caso de los afectados por HIGM, no supera la tercera década de vida. Ante esta situación tan desfavorable se ha hecho precisa desde ya bastante tiempo la necesidad de encontrar vías terapéuticas alternativas que permitan ofrecer, sino una cura, al menos una calidad y esperanza de vida aceptables. Entre otras propuestas médicas cabe destacar la terapia génica, que aspira a llenar ese vacío terapéutico.

Introducción

La terapia génica es el proceso de reinfusión de células autólogas modificadas para conseguir la expresión del gen defectuoso, por lo común a través de la inserción de cDNA del gen mutado, en el propio paciente para corregir el fenotipo característico de la enfermedad. A principios de los años setenta se describieron varios ensayos que mostraron el potencial de algunos virus para transmitir su material génico a células diana (Friedmann *et al.*, 1972). Progresivamente, y especialmente a finales de la década de los 80 cuando se desarrolló la aplicación de la tecnología del DNA recombinante para la transferencia génica mediante retrovirus (Shimotohno *et al.*, 1981), se comenzó a considerar la posibilidad de emplear dicha tecnología con fines terapéuticos.

Así dio sus primeros pasos la terapia génica, buscando hallar inicialmente solución a enfermedades de carácter monogénico y herencia mendeliana simple, cuya causa es más fácilmente identificable. No obstante, posteriormente se ha comprobado su potencial para el tratamiento de otros desórdenes o patologías más complejas, como es el caso del cáncer o algunas enfermedades infecciosas (Boucher *et al.*, 1996).

Indudablemente, el descubrimiento del origen genético de numerosas enfermedades humanas propició la base molecular para la terapia génica. De esta forma ha sido posible caracterizar genes que causan desórdenes por la pérdida de funciones normales debido a alteraciones genéticas tales como deleciones, mutaciones, translocaciones, pérdida de alelos, etc. Por tanto, la introducción de genes funcionales para la restauración de las funciones normales o la transferencia de genes terapéuticos para tratar enfermedades concretas, como el cáncer o las infecciones virales, son de gran interés. La lista de enfermedades o síndromes sobre las que la terapia génica tiene un potencial clínico relevante es muy amplia, entre las que podemos hallar: varios tipos de inmunodeficiencias combinadas

severas, anemia falciforme o de Fanconi, síndromes de Wiskott-Aldrich, de Híper IgM, hemofilias A y B, α y β talasemias, entre otras (Revisado por Ghosh *et al.*, 2015).

En los países desarrollados, al margen de las enfermedades cardiovasculares, el mayor de los problemas de carácter clínico es incuestionablemente el cáncer. Tanto es así que desde hace ya bastante tiempo se ha convertido en el objetivo principal de estudio de un gran número de laboratorios en todo el mundo. Esto ha condicionado notablemente las investigaciones terapéuticas llevadas a cabo con casi cualquier metodología disponible. Según la base de datos de la revista *The Journal of Gene Medicine* la terapia génica no ha sido una excepción en este sentido y, hasta el 31 de diciembre de 2015, el 64% (1415) de sus ensayos en fase clínica van dirigidos contra algún tipo de cáncer, mientras que tan sólo un 9,5% tienen como objetivo enfermedades monogénicas y un 7,9% enfermedades infecciosas.

En cualquier caso, los tres elementos principales de la terapia génica se mantienen constantes independientemente del contexto marcado por la patología objeto de la misma, a saber: las células diana para la modificación genética, el transgén terapéutico y el vector de transferencia. Aunque lo ideal sería contar con un sistema terapéutico en que el transgén se administrase *in vivo* a través de un vector de transferencia seguro y eficaz, la realidad ha demostrado la existencia de ventajas y desventajas entre los distintos diseños experimentales sin que ninguno esté exento de alguna dificultad a tener en cuenta. Por este motivo se ha generalizado el uso de protocolos que simplifican las variables y que están orientados a extraer y purificar células del paciente, preferentemente progenitoras, para transferirles el gen terapéutico *ex vivo* con vectores de transferencia génica, corregir su defecto y volver a aplicárselas al paciente (Figura 1.5).

Introducción

1 *In vitro* se modifican los vectores de transferencia génica incapacitando su capacidad de replicación e insertando en su genoma un transgén o gen terapéutico

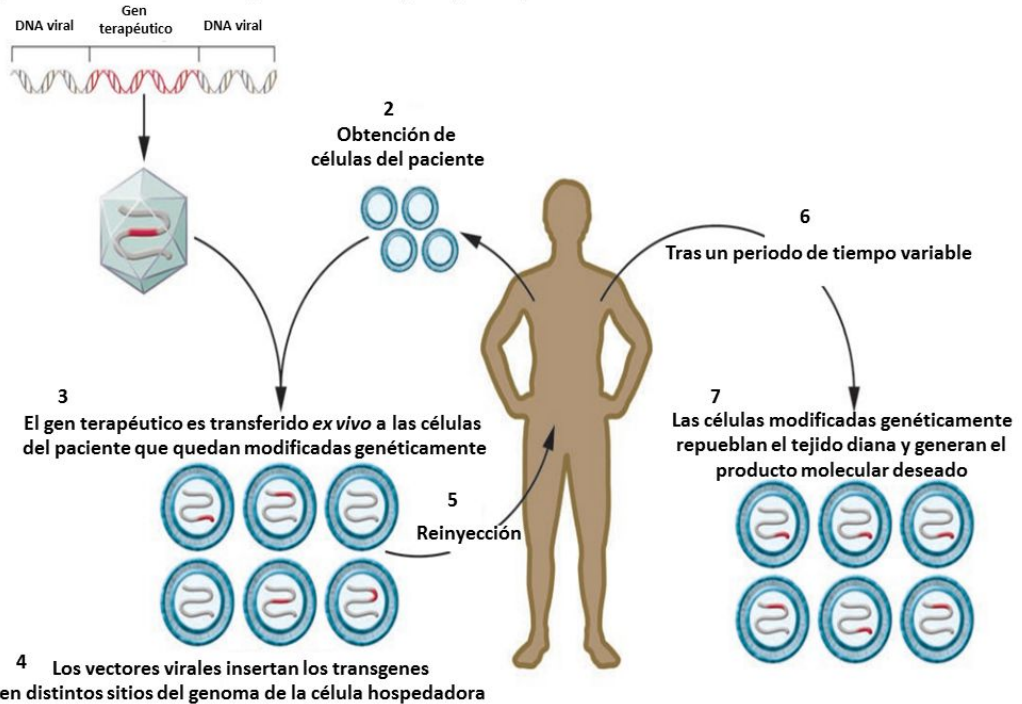


Figura 1.5 Ilustración simplificada a modo de ejemplo de un procedimiento de terapia génica *ex vivo*. Adaptado de Bushman *et al.*, 2007.

1.2.1 Las IDP: buenas candidatas para la terapia génica

Las IDP más severas son letales en los primeros meses de vida, o a lo sumo al año, con opciones limitadas de terapia. La mayoría de ellas son desórdenes monogénicos que siguen una herencia mendeliana simple con la expresión del gen afectado predominantemente restringida al sistema hematopoyético. Esto hace de la terapia génica de células troncales hematopoyéticas *ex vivo* una opción alternativa lógica. Es más, en algunas de estas enfermedades las células transducidas con el gen corregido tienen una ventaja de supervivencia *in vivo* sobre las no transducidas (Bousso *et al.*, 2000).

Desde 1991, la aplicación de la terapia génica ha alcanzado la fase de ensayos preclínicos con diversas inmunodeficiencias primarias y se han tratado más de 90 pacientes con esta tecnología (Tabla 1.5). Es más, a lo largo de los últimos 20 años se han hecho ensayos clínicos de terapia génica en un amplio abanico de IDP, a saber: SCID-X1 (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000; Gaspar *et al.*, 2004; Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008), ADA-SCID (Bordignon *et al.*, 1993; Bordignon *et al.*, 1995; Aiuti *et al.*, 2002; Gaspar *et al.*, 2009), X-CGD (Heyworth *et al.*, 2003; Kang, EM. *et al.*, 2012) o WAS (Boztug *et al.*, 2010; Castiello *et al.*, 2015). Como se decía, los primeros intentos de terapia génica con inmunodeficiencias primarias se hicieron en la década de los noventa, cuando a pacientes afectados de ADA-SCID se les inoculó linfocitos de sangre periférica (y posteriormente progenitores hematopoyéticos CD34⁺ de la médula ósea o del cordón umbilical) con el gen corregido (Bordignon *et al.*, 1993; Bordignon *et al.*, 1995; Blaese *et al.*, 1995; Kohn *et al.*, 1995). No obstante, la corrección de células progenitoras hematopoyéticas fue adquiriendo gradualmente mayor interés. Los primeros experimentos con este tipo celular vieron limitado su éxito a causa de la poca duración a largo plazo de los progenitores con la corrección génica. Sin embargo, las mejoras posteriores en la tecnología de transferencia génica y en el diseño experimental permitieron obtener resultados exitosos en el tratamiento de enfermos de ADA-SCID y de SCID X-1, ocasionada por la mutación del gen *IL2RG*.

Dicho éxito se debió en gran medida a la ventaja selectiva que se introdujo junto a los genes terapéuticos en los linfocitos transducidos. Esta ventaja se observó primero en pacientes de SCID (Haddad *et al.*, 1998; Buckley *et al.*, 1999) y revisado por (Antoine *et al.*, 2003) en clones linfocitarios que reexpresaban la proteína mutada por reversión de las mutaciones corregidas. Como dicha ventaja no estaba presente a nivel de los progenitores hematopoyéticos CD34⁺, sólo se

Introducción

consiguió la recuperación de niveles sustanciales en múltiples líneas con la inclusión de un condicionamiento de baja intensidad, durante las pruebas clínicas para la terapia génica de ADA-SCID (Aiuti *et al.*, 2002). La inclusión de una dosis reducida de busulfán (un agente alquilante citotóxico) por vía intravenosa (4 mg/kg) fue la clave en este ensayo, dado que indujo una ligera mielosupresión, sin causar toxicidad a los órganos, que otorgó la ventaja que necesitaban los progenitores CD34⁺ para expandirse y reconstituir una gran cantidad de líneas celulares. El vector corrector de ADA se expresó de manera eficiente en linfocitos, monocitos, eritrocitos y células de la médula ósea, permitiendo que llevara a cabo una detoxificación sistémica de manera progresiva hasta 8 años después de la terapia génica. De los 10 pacientes tratados, 9 recuperaron la timopoyesis policlonal, aumentaron sus niveles de linfocitos T y lo que es más importante: normalizaron sus funciones inmunológicas.

<i>Immunodeficiencia combinada severa causada por:</i>	<i>Immunodeficiencia combinada severa causada por:</i>
Deficiencia en RAG 1	ADA-SCID (immunodeficiencia severa por déficit de adenosín deaminasa)
Deficiencia en RAG 2	SCID-X1
Deficiencia en Artemis	CGD (enfermedad granulomatosa crónica)
Deficiencia en IL7R	JAK3-SCID
Deficiencia en PNP	WAS (Síndrome de Wiskott Aldrich)
Deficiencia en SAP	LAD (deficiencia de adhesión leucocitaria)
Deficiencias en CD40L	Hemoglobinopatías y enfermedades metabólicas
Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X	SCD (anemia falciforme)
IPEX (disfunción inmunológica, poliendocrinopatía y enteropatía ligadas al cromosoma X)	B-Thal (β-Talasemia)
	B-Thal/SCD (β-Talasemia/Anemia falciforme)
	X-ALD (adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X)
	MLD (leucodistrofia metacromática)
	FA (anemia de Fanconi)

Tabla 1.4 Ensayos preclínicos (columna izquierda) y clínicos (columna derecha) de terapia génica finalizados o en fase de desarrollo para inmunodeficiencias primarias, hemoglobinopatías y desórdenes metabólicos hasta el año 2015. Adaptado de (Aiuti *et al.*, 2009b; Ghosh *et al.*, 2015).

Además, conviene señalar que, a menudo, en los ensayos de terapia génica con pacientes es importante la mieloablación, que facilita el “injerto” de las células modificadas genéticamente al crear espacio en la médula ósea. Sin embargo, el grado de mieloablación, al igual que en el trasplante de médula ósea alogénico, es un punto delicado tanto en lo que se refiere a la bioseguridad como a la eficiencia de la terapia génica. Por ejemplo, para el ADA-SCID una dosis baja de busulfán (4 mg/Kg) es suficiente para que las células troncales hematopoyéticas modificadas se implanten en la médula ósea receptora, pero se debe a que las células de estos pacientes son intrínsecamente más susceptibles a la quimioterapia. En otras situaciones, no obstante, puede ser preciso realizar una mieloablación total.

1.2.2 Estrategias terapéuticas para la corrección génica

Existen dos estrategias fundamentales a la hora de diseñar un estudio de terapia génica. La primera consiste en reparar el propio gen mutado causante de la enfermedad, a menudo efectuada *in vivo*, manteniendo, por tanto, su localización natural y bajo el control de su propio promotor, algo que es ideal, pero que conlleva una elevada dificultad. La segunda estrategia, denominada sustitutiva, consiste en obviar el producto génico defectuoso de la célula diana y adicionar un gen terapéutico a la misma que cumpla correctamente la función del gen defectuoso original. Esta vía no requiere tanta precisión como la primera porque suele confiar en que la expresión del transgén sea fisiológicamente regulada por un promotor de expresión inducible y tejido-específica.

1.2.2.1 Terapia génica sustitutiva: Adición de genes terapéuticos

En la mayoría de los estudios de terapia génica se opta por insertar un gen normal en el genoma para reemplazar la función de un gen anormal causante de una enfermedad. Este proceso de adición génica puede realizarse en una localización inespecífica del genoma de la célula hospedadora (lo más común) o en una región específica del mismo, mediante una inserción dirigida del transgén, como sucede, por ejemplo, con un sistema lentiviral Cre-loxP, donde la recombinasa Cre facilita un proceso de recombinación homóloga en un sitio seguro donde no se produzcan efectos posicionales (Michel *et al.*, 2010).

Un punto clave en estos protocolos lo supone el proceso de transferencia génica, es decir el mecanismo por el que se transporta el gen terapéutico a la célula hospedadora. Un vector es un sistema de transferencia que actúa como transportador del transgén (Gardlík *et al.*, 2005). Actualmente se han desarrollado diversas técnicas y procedimientos para la transferencia génica a células eucariotas diana en la terapia génica. De forma global se pueden agrupar en dos grandes conjuntos en función de la naturaleza del vector de transferencia empleado: estrategias que emplean vectores virales y aquellas que usan vectores no virales.

Los vectores no virales tienen la ventaja de ser fácilmente producidos a gran escala y no causar graves problemas asociados con la inmunogenicidad frente a sus componentes, por el contrario cuentan con la desventaja de poseer una baja eficiencia de transferencia génica y por causar, en algunos casos, cierta toxicidad a las células o tejidos diana (Li *et al.*, 2006b). Los sistemas de transferencia génica no virales se clasifican a su vez en sistemas de transferencia

de DNA desnudo y sistemas de transferencia por lípidos. Dentro de los primeros se puede señalar la transferencia de plásmidos por inyección intramuscular (Wolff *et al.*, 1990), electroporación para permeabilizar la membrana celular (Coster *et al.*, 1965; Neumann *et al.*, 1982) y la biolística en la que el DNA va adherido a pequeñas bolas de oro o wolframio que son disparadas a gran velocidad contra las células o tejidos diana (Klein *et al.*, 1992). Por su parte, la transferencia génica mediante el uso de lípidos incluye procedimientos de transferencia que implican la utilización de liposomas o micelas (Yu *et al.*, 2004) que envuelven la estructura portadora del gen terapéutico.

El otro gran grupo de sistemas de transferencia génica para la terapia génica es el de los vectores virales. Los virus son parásitos moleculares altamente especializados en la transferencia de los ácidos nucleicos que componen su genoma a las células hospedadoras. El ciclo biológico viral incluye una fase en la que el virus inserta su material genético en el genoma de la célula hospedadora de forma natural, una capacidad muy interesante para la terapia génica. Por ende, es lógico que los virus hayan atraído la atención de los investigadores por el enorme interés que despiertan como versátiles herramientas moleculares (Walther *et al.*, 2000). Los vectores virales son virus de replicación defectuosa a los que se les ha privado de parte de sus secuencias codificantes al sustituirlas por los genes terapéuticos de interés (Li *et al.*, 2001). Hay una amplia variedad de vectores virales empleados en terapia génica entre los que destacan: retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus, poxvirus y vectores basados en el virus de Epstein-Barr (revisado por (Walther *et al.*, 2000; Vannucci *et al.*, 2013).

Además del nutrido conjunto de vectores virales integrativos, hay que mencionar la singular estrategia en terapia génica representada por los vectores virales no integrativos (Yáñez-Muñoz *et al.*, 2006). Ahora bien, esto implica que

Introducción

el transgén ha de expresarse de forma episomal en el citoplasma de la célula hospedadora y como bien es sabido, al realizarse la natural mitosis celular no se replican esas estructuras plasmídicas. En una situación así, los vectores no integrativos irían diluyéndose entre las crecientes generaciones celulares y la expresión del gen terapéutico se perdería progresivamente hasta retornar a la situación patológica original.

1.2.2.2 Terapia génica reparadora: Edición del genoma

La tecnología de edición genómica dirigida pretende reparar el gen mutado con una copia de DNA por recombinación homóloga (Pessach *et al.*, 2011). Ahora bien, este método ha tenido una reducida eficiencia hasta que se desarrollaron una serie de nucleasas que agilizaron el proceso e incrementaron la precisión en la edición de genes. En los últimos años la lista de nucleasas de diseño (*Custom designed nucleases* o CDNs) para tal fin ha aumentado significativamente e incluye: nucleasas “dedos de zinc” o ZNFs (Kim *et al.*, 1996), meganucleasas de diseño y nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción o TALENs (Silva *et al.*, 2011; Bedell *et al.*, 2012; Reyon *et al.*, 2012). Recientemente han sido desarrollados los sistemas CRISPR (sistemas asociados a repeticiones palindrómicas cortas que se agrupan de forma regular en regiones interespaciales), que han demostrado ser aún más eficientes y flexibles que las nucleasas en la edición dirigida de genes (revisado por Cai *et al.*, 2014).

Todos estos elementos de edición génica son capaces de realizar modificaciones genéticas precisas y eficientes al introducir cortes de doble cadena (DSB) en secuencias específicas, tras lo que efectúan las modificaciones deseadas durante el proceso de reparación del DNA. Por ejemplo, los ZNF's son proteínas

dirigidas específicamente contra una secuencia particular que llevan unidas nucleasas FokI no específicas (Kim *et al.*, 1996). Las nucleasas cortan DNA de doble cadena, lo que mejora la frecuencia de recombinación homóloga del DNA suministrado en *trans* (Bibikova *et al.*, 2003). El gen es modificado en su locus evitando efectos genotóxicos y además, de este modo el gen queda bajo regulación de su propio promotor. No obstante, en algunos casos también se ha señalado que este método ha causado ciertos efectos nocivos por corte de DNA de manera no específica (Urnov *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006).

La tecnología de edición de genes tiene como objetivo primario la reparación *in situ*, generalmente asociada a un tratamiento *in vivo*, del gen defectuoso causante de la enfermedad, pero sus aplicaciones son más amplias. En ciertas circunstancias puede ser más sencillo interrumpir un gen defectuoso de forma dirigida que corregirlo. Es decir, evitando la expresión de dicho gen anómalo, cuyos elevados niveles de transcripción y/o traducción son causantes de una enfermedad. Tal es el caso de los estudios de inmunoterapia contra el glioblastoma o las infecciones por HIV (virus de la inmunodeficiencia humana) o HBV (virus de la hepatitis B) (Perez *et al.*, 2008; Bloom *et al.*, 2013).

Estas dos modalidades de edición génica dirigida son posibles gracias a la existencia de dos mecanismos principales de reparación de daños del DNA:

- Aquel que promueve la unión de extremos no homólogos (NHEJ), que es el más común y que tiende a cometer errores en el proceso introduciendo pequeñas inserciones o deleciones en la secuencia, debido a que realiza la reparación de roturas de doble cadena en el DNA sin la asistencia de un molde homólogo para esa secuencia dañada (Budman *et al.*, 2005).

Introducción

- Aquel que funciona mediante recombinación homóloga, que es mucho menos frecuente, pero más preciso, ya que cuenta con una secuencia homóloga de DNA como molde para reparar la secuencia original (Court *et al.*, 2002).

1.2.3 Vectores virales integrativos: retrovirus y lentivirus

Aunque existen opiniones encontradas respecto a qué vector viral es el más adecuado y prometedor para alcanzar los mejores resultados en terapia génica, los primeros ensayos clínicos sobre inmunodeficiencias primarias se realizaron con vectores oncoretrovirales (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000). Los vectores retrovirales son extraordinarias herramientas para la transferencia de ácidos nucleicos. Los retrovirus conforman la familia de los *Retroviridae*, son virus cuyo genoma está constituido por RNA monocatenario (ssRNA) de polaridad +. Son virus esféricos de 80 a 120 nm de diámetro, cuya masa oscila alrededor de $2,5 \times 10^5$ KDa y densidad de 1,16 g/ml en gradientes de densidad de sacarosa (Vogt *et al.*, 1999). Todos los retrovirus son capaces de llevar a cabo la retro transcripción de su única cadena de RNA a DNA de doble cadena, que posteriormente se integra de manera estable en el genoma del hospedador donde expresan RNA viral durante la vida de la célula infectada (Temin *et al.*, 1970).

Durante los últimos 30 años la biología de la familia de los *Retroviridae* se ha ido comprendiendo mejor progresivamente, hasta el punto que hoy día se pueden diseñar vectores retrovirales para aplicaciones específicas (Maetzig *et al.*, 2011b). Comparada con otras técnicas de transferencia génica, la transducción retroviral es versátil, eficiente y de baja toxicidad. Entre los miembros más empleados de dicha familia con tales fines se incluyen: espumavirus (Heinkelein

et al., 2002), lentivirus como el HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus 1* (Naldini *et al.*, 1996), SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*) (Nègre *et al.*, 2002), FIV (*Feline Immunodeficiency Virus*) (Poeschla *et al.*, 1998) y gammaretrovirus como el MLV (*Murine Leukemia Virus*), BLV (*Bovine Leukemia Virus*) (Derse *et al.*, 1990), RSV (*Rous Sarcoma Virus*, (Suerth *et al.*, 2010), SNV (*Spleen Necrosis Virus*, (Watanabe *et al.*, 1982) y el MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*, (Günzburg *et al.*, 1986).

El uso de retrovirus como vectores de transferencia génica se introdujo a principios de los años ochenta por (Mann *et al.*, 1983) y hasta hoy se han empleado en multitud de ensayos clínicos para corregir los efectos adversos de distintas IDP (Figura 1.6). En base a la organización de su genoma, los *Retroviridae* se dividen en dos categorías: simples y complejos. Los vectores retrovirales oncogénicos más empleados se basan en el MLV. Este retrovirus tiene un genoma sencillo que incluye genes codificantes para las poliproteínas *gag*, *pol* y *env* necesarias como elementos activos en *trans* para la replicación y el empaquetamiento viral. Dichos genes son sustituidos por un *cassette* de expresión para generar vectores retrovirales incapaces de replicarse tras su inserción en el genoma del hospedador. Por otro lado se requiere la presencia de genes que actúen en *cis* entre los que encontramos: 5' y 3' LTR (*Long Terminal Repeat sequence*), las secuencias de integración, el sitio de empaquetamiento γ , el sitio de unión al RNA para su transporte y la secuencia para la retrotranscripción. Los vectores retrovirales tienen la ventaja de ser poco inmunogénicos al haberse eliminado los genes codificantes de sus proteínas virales. Así se reduce enormemente la posibilidad de despertar una respuesta inmunológica ante sus antígenos y se facilita que los vectores se puedan usar en repetidas ocasiones sobre el mismo tejido. Por el contrario, las limitaciones más destacadas de los vectores retrovirales oncogénicos son la inestabilidad de su partícula viral (Andreadis *et*

Introducción

al., 1997), la producción de títulos virales bajos (Le Doux *et al.*, 1999) y su incapacidad para transducir células que no estén en división (Roe *et al.*, 1993).

Para sobrepasar las limitaciones de los vectores retrovirales clásicos se sugirió la utilización de vectores lentivirales (Naldini *et al.*, 1996). Los lentivirus son una subclase de retrovirus de los que el SIV y el HIV son sus principales representantes. Su organización genómica es básicamente la misma que la del resto de la familia *Retroviridae*, pero tienen más genes accesorios (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *tat* y *rev*) que los hacen más complejos (Zufferey *et al.*, 1997) (Figuras 1.6 y 1.7).

La principal ventaja de los vectores lentivirales sobre los oncoretrovirales es que pueden transducir células quiescentes (Lewis *et al.*, 1994) gracias a su proteína integrasa (Gallay *et al.*, 1995a; Gallay *et al.*, 1995b), su proteína de matriz *gag* (Bukrinsky *et al.*, 1993), su proteína accesoria *vpr* (Heinzinger *et al.*, 1994) y al fragmento polipurínico central (cPPT) (Follenzi *et al.*, 2000). Esta capacidad para transducir células que no estén en división (salvo algunas excepciones que requieren que la célula pase de fase G0 a G1 de su ciclo celular para completar la reverso transcripción) (Korin *et al.*, 1998) los ha hecho muy interesantes.

Al igual que los vectores retrovirales oncogénicos, el diseño de los vectores lentivirales se ha basado en la separación de las secuencias que actúen en *cis* de las que actúen en *trans*. Por eso se suelen generar a través de transfecciones transitorias con plásmidos sobre células 293T (células embrionarias nefríticas humanas o HEK). Originalmente los sistemas retrovirales empezaron contando

con un plásmido de transferencia y otro asistente que le proporcionaba los genes necesarios para el empaquetamiento y la envoltura del virus (Figura 1.7).

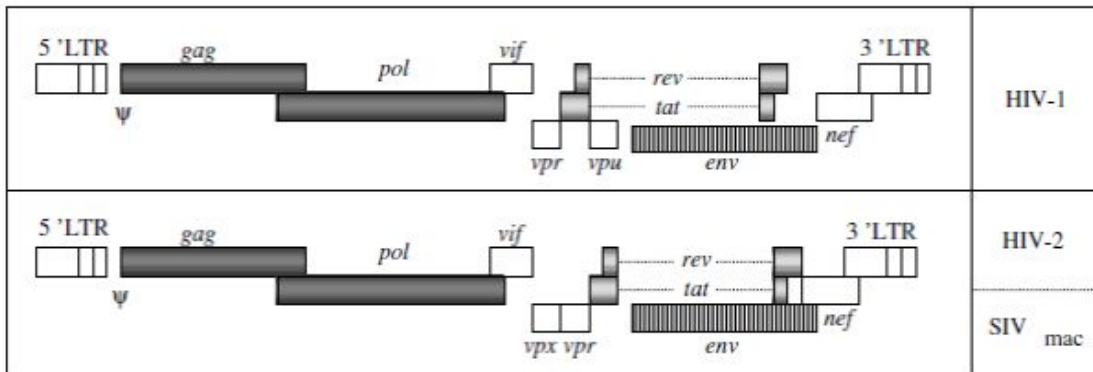


Figura 1.6 Descripción genómica de los vectores de transferencia génica basados en los lentivirus HIV-1 y HIV-2. Marco de lectura abierto de genes virales: los marcos se muestran con los tres posibles códigos genéticos. El genoma *gag-pol* queda representado por barras oscuras, mientras que las barras que representan los genes *env* están rayadas a causa de su ausencia en las construcciones de vectores lentivirales pseudotipados. Los genes accesorios (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *vpx*, ORF2 y S2) y los genes reguladores (*tat* y *rev*) se muestran como barras blancas y grises respectivamente. Tomado de Delenda, 2004.

Cuando empezaron a usarse los vectores lentivirales ya se empleaba un sistema de tres plásmidos en los oncoretrovirales, lo que permitió empezar a trabajar directamente con ese diseño. De este modo, las células productoras se han cotransfectado tradicionalmente con tres plásmidos, a saber: un plásmido de transferencia, otro empaquetador y un último para la envoltura del virus.

Introducción

1.2.3.1 Plásmido empaquetador

Las partículas lentivirales se dividen en generaciones en base al plásmido empaquetador usado para la producción viral (Delenda, 2004; Breckpot *et al.*, 2007) (Figura 1.8):

- **Primera generación:** la primera generación de vectores lentivirales contaba con un plásmido empaquetador que contenía las secuencias completas de los genes *gag* y *pol* para permitir el empaquetamiento de la construcción de transferencia, además de incluir los genes regulatorios virales *tat* y *rev* y los genes accesorios *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*.

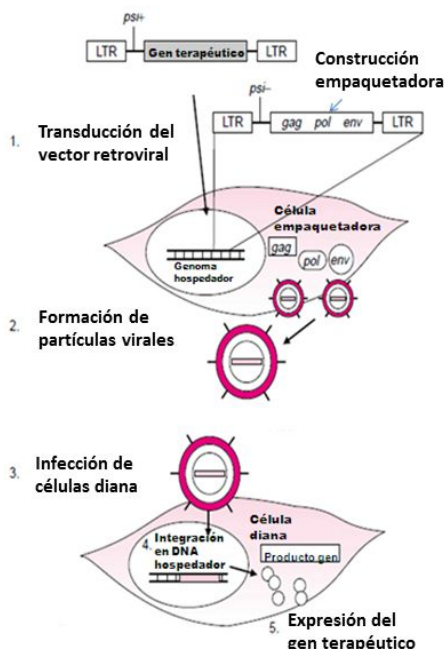


Figura 1.7 Vectores virales integrativos. Proceso de producción de vectores retrovirales en células empaquetadoras y de su transferencia génica a células diana. Adaptado de (Walther *et al.*, 2000).

- **Segunda generación:** con el paso del tiempo se fueron identificando los genes del HIV responsables de su virulencia, pero que eran prescindibles para entregar la carga genética. Esto llevó a sistemas empaquetadores multiatenuados (Zufferey *et al.*, 1997; Gruber *et al.*, 2000). Así se eliminaron 4 genes accesorios (*vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*) sin perjuicio para la eficiencia de infección de los vectores o para la producción viral en la mayoría de tipos celulares. Además, la supresión de esos genes accesorios permitió incrementar la bioseguridad del sistema, pues cualquier

posible lentivirus capaz de ejecutar su propia replicación (RCL) que aún pudiera producirse estaría desprovisto de todos sus factores de virulencia. Este sistema implica, por tanto, la cotransfección de tres plásmidos.

- **Tercera generación:** en este caso se cotransfecta con 4 plásmidos en lugar de 3. Este procedimiento es más laborioso e incluye un plásmido de transferencia, otro de envuelta y dos plásmidos empaquetadores: uno que contiene los genes *gag-pol* y otro el gen *rev* (Dull *et al.*, 1998). La implicación directa de esta estrategia es, de nuevo, el aumento de la seguridad del sistema, pues cada vez se requieren más eventos de recombinación homóloga para que se produzca un lentivirus replicativamente competente. Una ventaja adicional de este sistema de empaquetamiento partido es la eliminación del gen transactivador *tat* (en la segunda generación no se puede prescindir de él en el plásmido empaquetador) que se sustituye por un promotor fuerte 5'LTR.

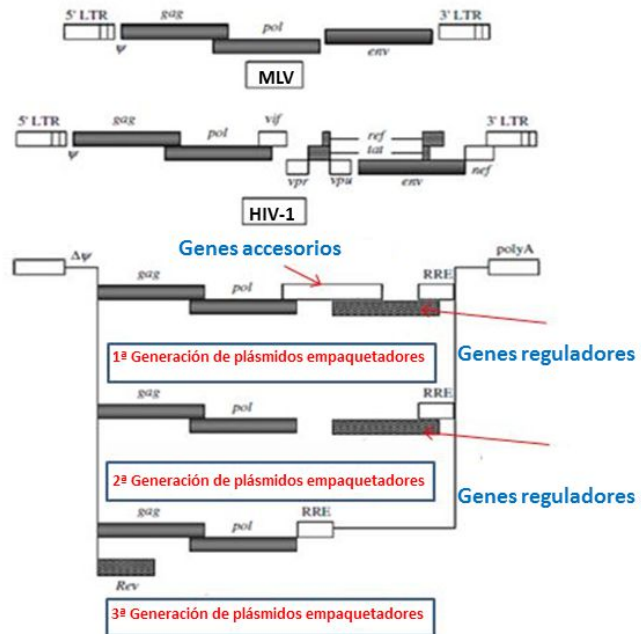


Figura 1.8 Generaciones de vectores lentivirales integrativos. Representación esquemática de los genomas del MLV y HIV-1, además de las distintas generaciones de sistemas empaquetadores lentivirales. Adaptado de Delenda, 2004 y Breckpot *et al.*, 2007.

1.2.3.2 Plásmido de transferencia

En la segunda y tercera generación el plásmido de transferencia consiste en un cassette de expresión que también porta los factores que actúan en *cis* del HIV necesarios para la integración, retro transcripción y empaquetamiento.

Un punto muy importante en el desarrollo de vectores para terapia génica fue la construcción de vectores de transferencia auto-inactivables (*self-inactivating vectors* o SIN), que se han obtenido al deleccionar la mayor parte del U3 (*3' Untranslated Region*) del 3'LTR (Miyoshi *et al.*, 1998; Zufferey *et al.*, 1998). Las regiones U3 de los LTR, tanto 5' como 3', de los retrovirus cumplen varias funciones imprescindibles en el ciclo infectivo viral. Estas regiones se encargan de dirigir la integración del provirus y la expresión de sus genes. Las secuencias U3 incluyen fuertes regiones promotoras y potenciadores que son responsables de la trans-activación de genes cercanos a los sitios de integración (Schröder *et al.*, 2002). Durante la retrotranscripción natural del virus *wild type* se escinde la región U3 del LTR5', que se recupera posteriormente al copiar la secuencia U3 del LTR3'. Si se delecciona dicha región U3 del LTR3', los vectores no podrán recuperar esa secuencia, pues durante la retro transcripción del ciclo infectivo ellos mismos escindirán la región U3 del LTR5' y ya no contarán con ninguna secuencia U3.

Otras mejoras del plásmido de transferencia son

1) Mejora de la importación nuclear al incluir la secuencia cPPT y su secuencia de terminación central. Juntas forman la triple hélice (TRIP) que facilita el transporte del complejo de preintegración viral a través de los poros nucleares. Los vectores

que incluyen estas secuencias producen mayores títulos virales y potencian la expresión del transgén (Follenzi *et al.*, 2000; Sirven *et al.*, 2000).

2) Al añadir la secuencia WPRE (*Woodchuck hepatitis B Posttranscriptional Regulatory Element* o elemento regulatorio postranscripcional del virus de la hepatitis B de la marmota) se facilita la expresión génica. WPRE es un elemento activo postranscripcional que modifica la poliadenilación del mRNA viral, favorece la exportación nuclear del mismo y aumenta su traducción (Zufferey *et al.*, 1999) (Figura 1.9).

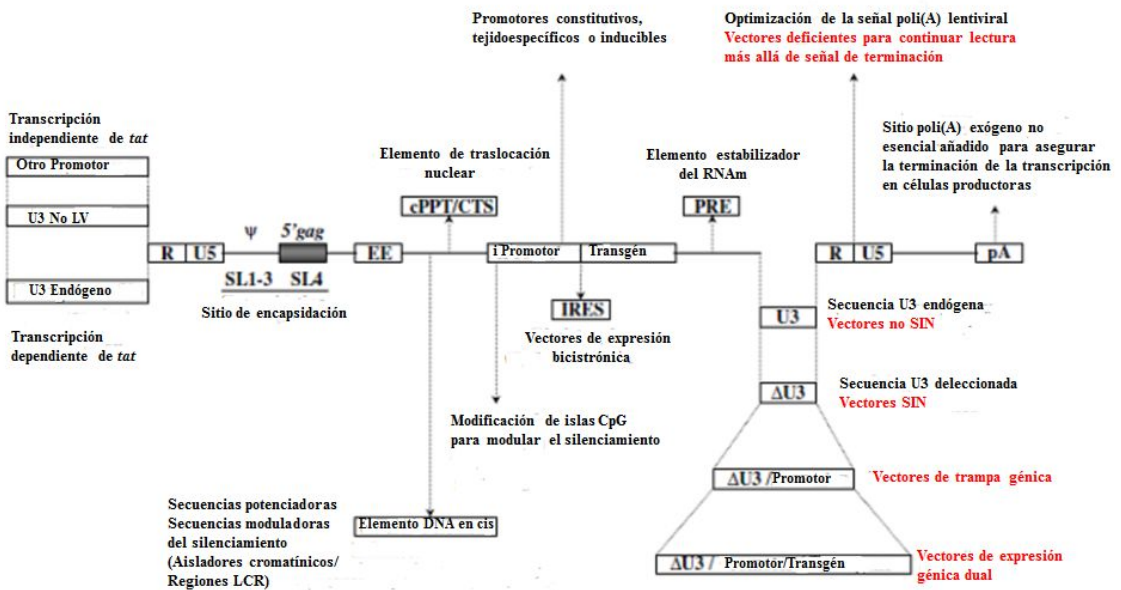


Figura 1.9 Ilustración de los elementos esenciales y optimizados en el esqueleto del vector de transferencia lentiviral. Se muestra la presencia, localización y actividad óptima de varios elementos regulatorios que actúan en *cis*: el elemento de respuesta post-transcripcional (PRE), el elemento de respuesta *rev* (RRE) o cualquier otro elemento de exportación nuclear (EE). Es interesante que para potenciar la importación nuclear, se ha postulado que el fragmento polipurínico central asociado con el sitio de terminación central (cPPT/CTS) tiene que estar insertado en el centro del genoma proviral. Los elementos de DNA que actúan en *cis*, los promotores limitadores (los moduladores potenciadores o silenciadores) también pueden insertarse en la región U3 delecionadas del 3'-LTR. Adaptado de Delenda, 2004.

Introducción

3) Los vectores retrovirales en general tienen señales de poliadenilación en ambos extremos LTR, que se caracterizan por marcar el fin de la transcripción de manera muy laxa. Son señales de terminación débiles que evitan que los transcritos retrovirales sufran terminaciones prematuras (Furger *et al.*, 2001). Esto supone un grave inconveniente porque no se produce una parada de la transcripción al llegar a los sitios de poliadenilación, lo que puede provocar la expresión de genes cercanos a los lugares de inserción del vector o *read-through* (Zaiss *et al.*, 2002). Por este motivo algunos grupos han logrado una mayor eficiencia de la terminación y del procesamiento del mRNA al insertar potenciadores de poliadenilación en la región U3 de 3' (Schambach *et al.*, 2007).

1.2.3.3 Plásmido de la envoltura viral o pseudotipado

El que tradicionalmente es el tercer plásmido requerido para la producción lentiviral, obviando la tercera generación de vectores lentivirales, es el que proporciona una envuelta *heteróloga*. El proceso por el que un vector viral queda recubierto por proteínas de la envoltura de un tipo viral ajeno y que le confiere distintas propiedades. Por ejemplo, el HIV tiene un tropismo limitado básicamente a macrófagos y linfocitos humanos CD4⁺, lo que es un importante inconveniente si se pretende usar vectores lentivirales sobre distintos tejidos o tipos celulares de varias especies. En la mayoría de los casos se usan los genes codificantes de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) lo que permite la formación de partículas mixtas o pseudotipadas y le otorga al vector un amplio tropismo derivado del virus al que pertenece su envuelta (Sanders *et al.*, 2002) al interactuar con un receptor celular ubicuo (Schlegel *et al.*, 1993; Coil *et al.*, 2004). La envuelta del VSV-G también confiere más estabilidad a la partícula-vector permitiendo un procesamiento eficiente de dichas

partículas para generar mejores títulos virales (Burns *et al.*, 1993). Los inconvenientes más destacables del uso de la envuelta del VSV-G con este fin cuentan con su elevada toxicidad al ser expresado de manera constitutiva (Burns *et al.*, 1993) y su sensibilidad al inactivarse con el complemento del suero (DePolo *et al.*, 2000). No obstante, tal inactivación se puede evitar si se usan partículas modificadas con polietilenglicol (Croyle *et al.*, 2004). Por descontado hay otros pseudotipajes que se han usado con éxito para producir vectores lentivirales. Cada glicoproteína proporciona la capacidad de interactuar con espectro distinto de receptores celulares, habiendo algunas que sólo infectan determinados tipos celulares (revisado por Breckpot *et al.*, 2007).

1.2.4 Efectos adversos de la terapia génica

Hoy en día, las aproximaciones a esta vía terapéutica se dirigen básicamente hacia una transferencia génica *ex vivo*, como se apuntó previamente, del gen terapéutico a progenitores hematopoyéticos autólogos, mediante el uso de vectores virales no replicantes (Kohn *et al.*, 2008). El proceso de corrección de los defectos moleculares por transferencia génica es extremadamente complejo, dado que es necesario asegurarse de que el gen terapéutico no interfiera en la estructura o regulación de otros genes. Además, si el vector de transferencia goza de un carácter integrativo, será preciso que se inserte específicamente en el lugar deseado del genoma, o que al menos lo haga en algún sitio donde no cause efectos posicionales (especialmente mutagénesis insercional).

La transducción con vectores retrovirales es versátil, eficiente y de baja toxicidad. En el sistema hematopoyético la modificación genética de unas pocas células troncales (HSC) puede llevar a la corrección de células de todos los linajes

Introducción

descendientes. Sin embargo y a pesar de que alcanzaron el éxito con los resultados obtenidos en ensayos preclínicos y clínicos durante los años 2000, en algunos casos ese éxito inicial quedó ensombrecido por la expansión clonal descontrolada de células transducidas, lo que denota cierto potencial leucemogénico del tratamiento (revisado por (Kohn *et al.*, 2010; Naldini *et al.*, 2015). En particular, algunos de los estudios más significativos en la evolución de la terapia génica fueron aquellos que se encargaron del tratamiento de un total de 57 pacientes, incluidos los 30 de SCID-ADA tratados entre Milán, Londres y Los Angeles (Aiuti *et al.*, 2009b) y también los de París (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000; Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2002) y Londres (Gaspar *et al.*, 2004), que fueron objeto de tratamiento por padecer SCID X1. Los vectores que se utilizaron en todos estos casos fueron gamma retrovirales, basados en el MLV o el virus de la leucemia de simios gibones (GALV). En estos ensayos la edad representó un factor negativo para la recuperación de los pacientes, habiendo más dificultades conforme aumentaba la edad. No obstante, lo realmente significativo fue la aparición de efectos indeseados en forma de síndromes linfoproliferativos en cuatro pacientes del grupo tratado en París (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003b; Check *et al.*, 2005), de los que uno de ellos murió, y en un paciente del ensayo de Londres. La mutagénesis insercional había sido considerada como riesgo potencial desde el inicio del ensayo, dado que entonces se consideraba que los vectores retrovirales se integraban al azar. Además, se consideraba que la transformación de células humanas sólo era probable si se producía una acumulación de alteraciones genéticas causadas por múltiples inserciones en determinados puntos *calientes* del genoma (Knudson *et al.*, 2001). Por este motivo se procuró que el número de inserciones por célula fuese relativamente bajo (Baum *et al.*, 2003; Fehse *et al.*, 2004). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que una única inserción en la vecindad de un proto-oncogén crucial es suficiente para causar la transformación celular y desencadenar una expansión clonal descontrolada (en los

pacientes de París fue el *LMO-2*) Por tanto, la inserción de múltiples copias de los vectores por célula representa un incremento adicional en el riesgo potencial de mutagénesis.

Nota ^a Se usó un vector gamma retroviral autoinactivable. En los demás ensayos clínicos SIN se emplearon vectores lentivirales.

Vector	Enfermedad (defecto genético)	Centro de ensayo (n° de pacientes)	Condicionamiento	Beneficio clínico logrado/eventos adversos
Gamma Retrovirus	SCID-X1 (<i>IL2RG</i>)	Reino Unido (11) Francia (11) E.E.U.U. (3)	Ninguno	Resultados positivos significativos en todos los pacientes, aunque menores en pacientes de más edad/ desarrollo de síndrome linfoproliferativo descontrolado de células T en 5 pacientes, de los que murió 1 (Hacein-Bey-Abina <i>et al.</i> , 2003a; Gaspar <i>et al.</i> , 2011b; Hacein-Bey-Abina <i>et al.</i> , 2014; Touzot <i>et al.</i> , 2015).
	ADA-SCID (<i>ADA</i>)	Italia (18)	Busulfán	15/18 pacientes desarrollaron rechazo contra injerto
		E.E.U.U. (16)	Busulfán	10/16 pacientes desarrollaron rechazo contra injerto (Aiuti <i>et al.</i> , 2009a; Candotti <i>et al.</i> , 2012)
		Reino Unido (8)	Melfalán y Busulfán	4/8 pacientes desarrollaron rechazo contra injerto (Gaspar <i>et al.</i> , 2011a)
	CGD (<i>NCF-1/CYBB</i>)	E.E.U.U. (5) y (3) Alemania/Suiza (4) Reino Unido (4) Corea (2)	Ninguno o Busulfán Busulfán Melfalán Busulfán y fluradabine	Corrección a corto plazo a las 3 semanas tras el trasplante como pico máximo (Kang <i>et al.</i> , 2011)
	WAS (<i>WASP</i>)	Alemania (10)	Busulfán	Corrección a largo plazo con desarrollo de síndrome linfoproliferativo descontrolado en 4/10 Pacientes (Boztug <i>et al.</i> , 2010; Avedillo Diez <i>et al.</i> , 2011; Rivat <i>et al.</i> , 2012; Braun <i>et al.</i> , 2014)
SCID-X1 (ILERG) ^a	Francia, Reino Unido y E.E.U.U. (9)	Ninguno	Recuperación de células T (Pai <i>et al.</i> , 2011; Touzot <i>et al.</i> 2015)	
Vectores SIN	ADA-SCID (<i>ADA</i>)	Reino Unido y E.E.U.U. (31)	Busulfán	Seguimiento inferior a un año. Recuperación inmunológica y detoxificación sistémica en algunos pacientes con rechazo contra injerto (Gaspar, comunicación)
	CGD (<i>NCF-1/CYBB</i>)	Suiza, Alemania, Francia y Reino Unido (2)	Busulfán	Ensayo en curso (Santilli <i>et al.</i> , 2011)
	WAS (<i>WASP</i>)	Reino Unido, E.E.U.U., Francia e Italia (10)	Busulfán y fluradabine con o sin ATG/Rituximab	(Aiuti <i>et al.</i> , 2013; Scaramuzza <i>et al.</i> , 2013; Castiello <i>et al.</i> , 2015; Hacein-Bey Abina <i>et al.</i> , 2015) Los pacientes muestran síntomas de mejora en el eczema y vasculitis (Thrasher, comunicación)

Tabla 1.5 Ensayos clínicos en terapia génica con vectores virales para inmunodeficiencias primarias. Adaptado de Zhang *et al.*, 2013; Ghosh *et al.*, 2015.

Introducción

La genotoxicidad supone uno de los mayores retos para la terapia génica usando vectores retrovirales y puede ser causada por varios mecanismos: activación de promotores, truncado de transcritos génicos y *splicing* erróneo. La *cis*-activación de promotores cercanos al lugar de inserción del vector se produce porque algunos de los elementos del mismo son potenciadores de la expresión del transgén y pueden anular los mecanismos de control transcripcional celular (Stein *et al.*, 2010). Si la integración se produce dentro de una unidad de transcripción (esto es, dentro de un gen) el resultado podría ser la producción de transcritos truncados. Si la señal de poliadenilación del transgén aparece en medio de otro gen (ya sea en sentido 5'-3' o en antisentido) puede producirse el fin de la transcripción del gen interrumpido antes de tiempo. Al mRNA así formado suele faltarle importantes secuencias regulatorias que comprometen su estabilidad y daña la homeostasis celular (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2010). Finalmente, si la inserción se hace efectiva entre el promotor de un gen y su primer exón, entonces dicho gen quedará regulatoriamente hablando aislado de su promotor y será el promotor del transgén el que dirigirá la transcripción del transgén y del gen así interrumpido. En ese caso se pueden originar transcritos que sean una fusión de los productos de ambos genes y que por consiguiente pueden ser susceptibles de sufrir mecanismos de *splicing* erróneos y dar lugar a proteínas aberrantes o a niveles alterados de proteínas de longitud completa (Martín-Hernández *et al.*, 2001; Wotton *et al.*, 2002).

Es decir, todo parece indicar que dependiendo del vector utilizado y/o de la enfermedad a tratar podemos tener efectos diferentes. Para obtener datos fiables comparativos (Suerth *et al.*, 2012) diseñaron construcciones de transferencia génica análogas para los tres tipos de retrovirus más importantes (gamma retrovirus, lentivirus y alfa retrovirus), cuyo *cassette* interno de expresión común a todas las construcciones consistía en: el promotor SFFV (*Spleen focus forming*

virus) conocido por causar la activación de proto-oncogenes por inserción y por atraer maquinaria enzimática silenciadora epigenética (Stein *et al.*, 2010), la secuencia codificante de la proteína fluorescente verde potenciada (*EGFP*) como gen marcador y el elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota modificado (WPRE) para potenciar el título viral y la expresión del transgén (Modlich *et al.*, 2009). Mediante LM PCR (PCR medida por ligación) (Maetzig *et al.*, 2011a) se analizó la distribución de los respectivos sitios de integración en HSC (*Hematopoietic Stem Cells*) murinas, tras lo que se alcanzaron las siguientes conclusiones que respaldan los datos obtenidos en estudios anteriores por otros grupos:

- Los gamma retrovirus tienden a insertarse en la proximidad (a unas 10 Kb) de sitios de inicio de la transcripción, islas CpG (lo que implica un posible silenciamiento del transgén y para lo que se ha desarrollado la estrategia de incluir secuencias aisladoras que flanqueen el transgén en los propios vectores) y genes implicados en el cáncer (Laufs *et al.*, 2003; Mitchell *et al.*, 2004; Ciuffi *et al.*, 2006). También tienen mucha más probabilidad de localizarse a menos de 250 Kb de genes implicados en el cáncer (genes seleccionados de *Retrovirus Cancer Gene Database* o *RTCGD* y *Cancer-Gene Census Database* o *GCG*), cosa poco frecuente en alfaretrovirus o lentivirus. Mediante ensayo IVIM (Modlich *et al.*, 2006) se ha demostrado que los gamma retrovirus provocan la inmortalización de las células diana dos veces mejor que los lentivirus y seis que los alfa retrovirus.
- Los lentivirus lo hacen cerca de regiones intragénicas y especialmente en genes transcritos activamente (Wu *et al.*, 2003; Hematti *et al.*, 2004; Barr *et al.*, 2005; Beard *et al.*, 2007; Montini *et al.*, 2009), pero sin ninguna

Introducción

predilección especial por los proto-oncogenes. Además, se ha demostrado que la localización de las integraciones del HIV-1 depende considerablemente de la arquitectura nuclear de la célula (Marini *et al.*, 2015). En particular, los genes activos donde normalmente se integra el virus HIV-1 se encuentran con frecuencia en la periferia del núcleo celular y a menudo cerca del complejo del poro, lo que implica que la distribución espacial de la cromatina condiciona qué regiones serán las dianas de integración más usuales del virus (Marini *et al.*, 2015).

- Los alfa retrovirus a su vez se caracterizan por poseer un espectro de integración más neutro, sin preferencia por ninguna de las estructuras genómicas antes mencionadas (Narezkina *et al.*, 2004; Modlich *et al.*, 2006; Suerth *et al.*, 2010). Esto podría hacerlos recomendables para posteriores ensayos clínicos, pero la mayoría de los experimentos realizados hasta finales de 2014 con ellos tan sólo ha incluido alfa retrovirus con sus LTR intactos, es decir, con elementos transcripcionales capaces de activar genes nucleares y contribuir a la mutagénesis insercional. Igualmente, esos vectores contenían elementos codificantes virales potencialmente inmunogénicos y que incrementaban el riesgo de movilidad viral (Modlich *et al.*, 2006; Montini *et al.*, 2009).

Ahora bien, hay que señalar que el tipo de promotor influye enormemente en la capacidad de un vector para producir la transformación de la célula diana. En este sentido es lógico argumentar que los posibles eventos tumorales derivados de la terapia génica no se pueden achacar exclusivamente a la naturaleza del vector (Suerth *et al.*, 2012). Luego si al emplear promotores endógenos, regulados y/o tejido-específicos se equiparan o reducen las diferencias en bioseguridad entre distintos vectores, tal vez se deban sopesar las ventajas que ofrecen vectores

lentivirales aunque muestren un espectro integrativo, a priori, menos *conservador* que el de los alfa retrovirales.

1.2.5 Bioseguridad: estrategias para neutralizar efectos adversos en la terapia génica por adición de genes terapéuticos

Tras los numerosos ensayos realizados en los últimos 15 años, resultan riesgos asociados a estrategias de terapia génica que comprometan los mecanismos de regulación génica naturales. Esto ha fomentado la necesidad elaborar protocolos que reduzcan esos peligros. Algunos grupos han abordado el problema renunciando a la transferencia génica y prefiriendo apostar por la estrategia de edición génica dirigida *in situ* (Tahara *et al.*, 2004; Gaj *et al.*, 2013; Genovese *et al.*, 2014; Ghosh *et al.*, 2015). Un campo prometedor pero de una complejidad muy elevada y que requerirá aún profundizar más en sus mecanismos para optimizar su eficacia.

Aparte otros muchos grupos de investigación han preferido desarrollar estrategias de transferencia génica apoyándose en la cuantiosa experiencia adquirida desde principios de los años noventa. Esto ha fomentado que varios grupos de investigación hayan preferido insistir en los vectores lentivirales y sacar provecho de sus ventajas frente a otros vectores virales. Los vectores de transferencia génica basados en genomas lentivirales proporcionan medios efectivos de entrega, integración y expresión de transgenes en células de mamífero ya estén o no en división. Son capaces de lograr una expresión estable del transgén a largo plazo, baja toxicidad, alta capacidad de empaquetamiento y causantes de una respuesta inmunológica baja ante sus componentes vectoriales.

Introducción

Tratando de mejorar estos sistemas de vectores lentivirales se han efectuado varias modificaciones para mejorar su bioseguridad, eficiencia de transferencia, expresión génica y producción bajo protocolos normalizados fundamentados en unas buenas prácticas de manufactura (GMP). Estas GMP han desembocado en vectores lentivirales desprovistos de RCL (*replicant-competent lentivirus*) y contaminaciones asociadas a las células productoras, que han permitido su aprobación para estudios clínicos.

Los denominados genomas partidos (o más bien repartidos) entre varios plásmidos han corregido el riesgo de RCL producidas por recombinación no controlada. Además, el mínimo solapamiento existente entre las secuencias de los distintos plásmidos ha reducido considerablemente el riesgo derivado de eventuales recombinaciones homólogas. Es más, tras emplear técnicas muy sensibles no se han detectado RCL en sistemas de vectores lentivirales de segunda y tercera generación (Escarpe *et al.*, 2003; Segall *et al.*, 2003).

No obstante, habría que reconsiderar estos peligros asociados al trasladar los estudios a un entorno *in vivo*. Mucho se ha discutido de un posible rescate del provirus mediante recombinación con retrovirus salvajes o *wild type* (WT) presentes en pacientes, ya sea el propio HIV-1 como cualquier otro virus que comparta homología con las secuencias del provirus. La posibilidad de que dicho provirus recupere la función retroviral, a través de elementos activos en *trans* o de que el genoma proviral se recombine con secuencias retrovirales endógenas humanas, es algo muy difícil de determinar mediante estudios con animales. No obstante, sólo una monitorización a largo plazo será una prueba lo bastante robusta para detectar eventos adversos relacionados con la integración lentiviral.

Los vectores lentivirales ya han sido validados para su uso clínico, pero hasta entonces causaban cierta desconfianza en algunos investigadores por la posibilidad de que pudieran desarrollar posibles problemas derivados de la mutagénesis insercional. Es bien sabido que el HIV-1 favorece la integración de su genoma cerca de genes activos (Schröder *et al.*, 2002), pero parece que el HIV-1 *WT* no provoca eventos tumorigénicos de forma directa. Se postuló la idea de que los procesos tumorales asociados al SIDA estaban causados más bien por superinfecciones con otros virus y la inmunosupresión que provoca la infección con el HIV-1. Se ha comprobado, no obstante, que hay vectores lentivirales, derivados de genomas víricos cuyo hospedador son mamíferos no primates, que son agentes efectores de tumorigénesis en fetos y neonatos murinos tratados con tales vectores (Trono *et al.*, 2003). En cualquier caso hay que puntualizar que los vectores lentivirales siguen un patrón de inserción distinto en células humanas y murinas, integrándose predominantemente cerca de diferentes conjuntos de genes, lo que debe considerarse a la hora de determinar las limitaciones de los modelos murinos para no precipitarse al extrapolar resultados de un sistema a otro (Mavilio *et al.*, 2016). Complementando esta última idea acerca de la bioseguridad de los vectores lentivirales en terapia génica debemos recordar que además, no hay observaciones que indiquen que la integración del virus HIV-1 o de vectores derivados del mismo, presente dominancia clonal, sino más bien al contrario. Es decir, su patrón de integración es policlonal y no tumorigénica (Aiuti *et al.*, 2013). Un buen ejemplo de la fiabilidad de los sistemas lentivirales lo representan los ensayos clínicos realizados sobre pacientes de WAS tratados mediante terapia génica. Tanto los pacientes tratados con sistemas lentivirales como retrovirales presentaron una mejora clínica de los síntomas asociados a WAS, pero mientras que con los retrovirus hubo activación de protooncogenes en varios pacientes (Braun *et al.*, 2014), no se detectaron efectos adversos en los pacientes tratados con vectores lentivirales (Hacein-Bey Abina *et al.*, 2015).

Introducción

Además, actualmente existe un amplio rango de estrategias dirigidas a mejorar los resultados obtenidos en terapia génica con la tecnología de transferencia génica. Con esto en mente se han llevado a cabo estudios que pretenden diseñar vectores lentivirales no integrativos (Urnov *et al.*, 2005; Yáñez-Muñoz *et al.*, 2006), elaborar sistemas de integraciones dirigidas a sitios específicos del genoma, incluir elementos aisladores del transgén en el vector o construir vectores cuyo gen terapéutico quede controlado por promotores endógenos que permitan que la expresión génica sea inducible y tejido-específica:

a) Estrategia no integrativa: mediante mutaciones en la secuencia codificante de la integrasa (Engelman *et al.*, 1999) se han elaborado sistemas lentivirales que carecen de la capacidad para integrarse en el genoma. Estos elementos terapéuticos permanecen en el citoplasma de la célula diana en un estado episomal. Así se evitan los problemas que podría ocasionar una integración indeseable cerca de puntos calientes del genoma. El mayor inconveniente, empero, es que células de tejidos con una alta tasa de proliferación perderían rápidamente la expresión del gen terapéutico, puesto que con cada división celular el episoma lentiviral no se replica, sino que se reparte. Es decir, con cada nueva generación celular iría disminuyendo el porcentaje de células transducidas. La aplicación evidente es, por tanto, su uso sobre tejidos con una tasa de proliferación muy baja, como es el caso del sistema nervioso central y periférico (Peluffo *et al.*, 2013), quedando al margen de un gran porcentaje de enfermedades que afectan a tejidos con una proliferación mucho más activa. También reduce las opciones para emplearlos como herramientas de una terapia génica *in vivo*, donde el uso de vectores virales integrativos ya han demostrado su eficacia, además de en tejidos nerviosos (Naldini *et al.*, 1996), en tejidos modelo para la terapia génica como el hepático o el muscular (Kai *et al.*, 1993; Kafri *et al.*, 1997) y revisado por

(Mingozzi *et al.*, 2011), donde los vectores no integrativos no lograrían evitar que la expresión de su transgén decayese con el tiempo.

b) Estrategia de integraciones dirigidas: varios ensayos han sido descritos ya empleando nucleasas con dedos de Zn (Urnov *et al.*, 2005) y la integrasa del fago phiC31 (Held *et al.*, 2005). En ambos casos se ha controlado una integración eficiente y una expresión funcional de la proteína terapéutica.

c) Estrategia de aislamiento del transgén sin renunciar a promotor fuerte que asegure una expresión potente del gen terapéutico: como ya se ha comentado el lugar de la inserción en el genoma hospedador de los vectores retrovirales, y por ende de los lentivirales, resulta biológicamente relevante. Si los vectores se insertan cerca de proto-oncogenes u otros puntos *calientes* del genoma pueden producirse diversos efectos deletéreos. Además, si la inserción se produce en regiones altamente susceptibles a distintos procesos de metilación o de modificación de histonas el transgén puede quedar silenciado (Qasim *et al.*, 2009). Esta es la razón por la que los primeros trabajos en terapia génica, para contrarrestar entre otros efectos el silenciamiento de las construcciones insertadas, incluyeran en sus vectores promotores fuertes y otros elementos potenciadores que aseguraran una expresión del transgén. Si se renuncia a dichos elementos fuertes se corre el riesgo de no conseguir una expresión mínima del transgén que corrija o atenúe la enfermedad. En consecuencia, hay líneas de investigación que optan por mantener dichos elementos potenciadores de la expresión transgénica, pero para aislar al vector de la cromatina circundante y viceversa se han diseñado las secuencias aisladoras. Los aisladores son secuencias de DNA situados en los límites entre el vector integrado y los dominios de la cromatina hospedadora, que impiden la activación o inhibición de la expresión del transgén por elementos reguladores ajenos a la estructura del vector e igualmente la trans-activación de

Introducción

genes cercanos al vector a causa de los potenciadores que éste porta (Yusufzai *et al.*, 2004). De este modo se disminuye la genotoxicidad ocasionada por el vector (Ramezani *et al.*, 2008) y se reduce el riesgo de silenciamiento del transgén (Hino *et al.*, 2004).

d) Estrategia de vectores transcripcionalmente regulados: Esta estrategia se basa en la idea fundamental de conseguir niveles fisiológicos del transgén al regular su expresión transcripcional mediante promotores tejido-específicos ya sea con o sin potenciadores, pero sobre todo evitando la toxicidad relacionada con niveles de proteína no controlados (Toscano *et al.*, 2008). De este modo, una transcripción dirigida puede limitar la expresión de mRNA y proteína a un tipo celular concreto, incluso si el vector de transferencia génica se introduce en múltiples tipos celulares. De hecho, esta metodología ya ha tenido éxito en líneas hematopoyéticas utilizando promotores tejido-específicos como los de los genes CD19 (Werner *et al.*, 2004), CD4 (Marodon *et al.*, 2003) o WASP (Martín *et al.*, 2005; Frecha *et al.*, 2008; Toscano *et al.*, 2008). Mediante estos protocolos se ha pretendido evitar el riesgo de la expresión ectópica del transgén (Lagasse *et al.*, 2000; Camargo *et al.*, 2003; Jang *et al.*, 2004), ya sea al realizar ensayos de transducción *in vivo* que afecten a tipos celulares no diana o al efectuar la transducción de precursores hematopoyéticos *ex vivo* que más adelante puedan diferenciarse en tejidos no hematopoyéticos o fusionarse con células del linaje no hematopoyético.

Al hilo de esta última idea, la consecución de vectores cuya expresión pueda controlarse perfectamente por el investigador de modo que quede restringida a las condiciones deseadas por el diseño experimental es un objetivo largamente ambicionado por los expertos en terapia génica. Las dos estrategias predominantes en este campo científico son

1. El método como sistema de inducción (expresión inducida) más usado para vectores de transferencia es la aproximación basada en la tetraciclina (Reiser *et al.*, 2000; Vigna *et al.*, 2002). Se puede afirmar que para terapia génica generalmente es preferible un vector inducible por la aplicación de antibióticos (*tet-on*), antes que uno que silencie su expresión al proporcionar dichos antibióticos al cultivo (*tet-off*). Un sistema *tet-off* implica la necesidad de administrar antibióticos constantemente. Salvo algunas excepciones (Kafri *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 2002) los vectores derivados del HIV que cuentan con un sistema de expresión inducible por tetraciclina se suelen basar en el sistema *tet-on* (Farson *et al.*, 2001; Georgievskaja *et al.*, 2004). Con este sistema se puede controlar la expresión del gen terapéutico incluso si ésta tiene un carácter ubicuo.
2. La otra estrategia para lograr controlar la expresión del vector permite lograr una expresión tejido-específica, puesto que opta por el uso de promotores tejido-específicos (Tabla 1.6). La expresión del transgén se recluye así al tejido particular en el que opera naturalmente ese promotor y su activación entonces depende de los mecanismos característicos que regulan al promotor en cuestión. Ésta es, por tanto, una inducción bastante más parecida a la que sucede en el organismo de forma natural

Un ejemplo del éxito terapéutico que puede alcanzar la terapia génica recurriendo a esta estrategia sobre inmunodeficiencias de origen monogénico lo representan los estudios efectuados sobre pacientes de síndrome de Wiskott-Aldrich.

Introducción

Linaje celular	Promotor regulado	Referencia
Linaje eritroide	Ankirina 1	(Moreau-Gaudry <i>et al.</i> , 2001)
Células endoteliales	Receptor angiopoyetina	(De Palma <i>et al.</i> , 2003)
Células del sistema nervioso central	Enolasa	(Lai <i>et al.</i> , 2002)
Células fotorreceptores	Rodopsina	(Miyoshi <i>et al.</i> , 1997)
Hepatocitos	Albúmina	(Follenzi <i>et al.</i> , 2002; Oertel <i>et al.</i> , 2003)
Linfocitos T	WAS	(Dupré <i>et al.</i> , 2004; Martín <i>et al.</i> , 2005)

Tabla 1.6 Representación de algunos de los promotores empleados para obtener una regulación tejido-específica del transgén en determinados linajes celulares.

Se han perfeccionado vectores lentivirales SIN codificantes del gen humano WAS bajo el control de fragmentos de 1,6 Kb o de 0,5 Kb de su promotor endógeno (Dupré *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2005). Estos fragmentos del promotor logran producir una expresión fisiológica del transgén (Bosticardo *et al.*, 2009) y es, por tanto, capaz de restaurar la expresión de WASP en células humanas y murinas (Dupré *et al.*, 2006; Toscano *et al.*, 2008; Scaramuzza *et al.*, 2013). Por otro lado, hay que recordar que las células madre hematopoyéticas transducidas pueden generar problemas al fusionarse con células de linajes no hematopoyéticos (Lagasse *et al.*, 2000; Camargo *et al.*, 2003; Jang *et al.*, 2004), causando posibles eventos de expresión ectópica del gen terapéutico. Pues bien, el promotor de WAS restringe la expresión del transgén al linaje hematopoyético (Martín *et al.*, 2005), evitando la toxicidad asociada a la expresión ectópica de WASP en tejido no hematopoyético o a unos niveles de expresión no controlados (Toscano *et al.*, 2008). También, junto al empleo de un LTR SIN (Ginn *et al.*, 2003), su moderada actividad potenciadora ha demostrado ser capaces de reducir el riesgo de mutagénesis insercional (Montini *et al.*, 2009) tanto en los ensayos de transformación *in vitro* (Modlich *et al.*, 2009), como en los estudios preclínicos *in vivo* con ratones deficientes para WASP (Scaramuzza *et al.*, 2013). Todos estos estudios favorables permitieron aplicar el vector dirigido por un fragmento de 1,6

Kb del promotor endógeno de WAS, y por ende transcripcionalmente regulado, a células madre hematopoyéticas de tres pacientes de síndrome de Wiskott-Aldrich (Aiuti *et al.*, 2013; Hacein *et al.*, 2015). Su consiguiente reinfusión a los pacientes y un seguimiento en el tiempo de 20 a 32 meses post-reinfusión han revelado que las HSC portadoras del gen WAS corregido han repoblado de forma estable la médula ósea y generado la hematopoyesis de múltiples líneas celulares de forma eficaz. No se ha detectado selección alguna de clones con inserciones cercanas a oncogenes, ni expansión clonal aberrante tras un seguimiento de 20 a 32 meses y además, se han recuperado niveles normales en el conteo plaquetario, han mejorado los distintos síntomas y marcadores clínicos y se han desarrollado de forma plena y normalizada todas las funciones inmunológicas antes comprometidas (Aiuti *et al.*, 2013). A día de hoy es tal la confianza en las posibilidades de los tratamientos con terapia génica, que el número de pacientes de WAS incluidos en ensayos clínicos asciende a 20 entre aquellos tratados con vectores lentivirales y gamma retrovirales (revisado por Ghosh *et al.*, 2015).

1.2.6 Terapia génica, vectores integrativos y linfocitos

La inmensa mayoría de los ensayos de terapia génica sobre IDP siguen un modelo canónico que implica la transducción *ex vivo* de las células madre hematopoyéticas (HSC) del paciente o del modelo animal de la enfermedad para su posterior reinyección en el sujeto del que se obtuvieron esas células. Una estrategia alternativa consiste en la transducción de linfocitos primarios como diana de la terapia. La transferencia génica a linfocitos T puede permitir el tratamiento de disfunciones genéticas severas del sistema hematopoyético, como ciertas inmunodeficiencias severas (Blaese *et al.*, 1995; Bordignon *et al.*, 1995). También supone el punto de partida para desarrollar nuevas estrategias

Introducción

terapéuticas frente al cáncer y a enfermedades adquiridas como el SIDA (Buchsacher *et al.*, 2001). Este tipo de terapia se ha utilizado con éxito en la corrección de inmunodeficiencias tales como ADA (Hirschhorn *et al.*, 1996) o la mejora de los síntomas asociados al síndrome de Wiskott-Aldrich (Dupré *et al.*, 2004; Castiello *et al.*, 2015). La terapia génica de células primarias T y B tiene mayores perspectivas de futuro para el tratamiento de cánceres sanguíneos severos porque, entre otras cosas, parece tener la capacidad de corregir los efectos colaterales adversos del trasplante de médula ósea alogénica (Horowitz *et al.*, 1990).

En lo que respecta a la terapia génica de células B o inmunoterapia, hay que destacar que originalmente se vio ralentizada por la falta de lentivirus capaces de lograr una transferencia génica eficaz y una expresión estable del transgén en estas células, ya que funcionan mediante mecanismos moleculares distintos que los de las células T (Serafini *et al.*, 2004). Posteriormente la eficiencia de la transferencia génica a linfocitos B quiescentes mejoró con el uso de vectores lentivirales pseudotipados con la glicoproteína del sarampión (MLV), en lugar de con la glicoproteína VSV-G (Frecha *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011). Finalmente, se consiguió construir sistemas lentivirales capaces de efectuar una transferencia génica eficiente a células B empleando el pseudotipado con la glicoproteína del virus de la leucemia de los simios gibones (GALV) (Mock *et al.*, 2012) o con la de la envuelta del retrovirus del papión (BaEV) (Fusil *et al.*, 2015). Las células B son una diana celular importante en tanto que tal grupo celular tiene potencial para inducir actividades inmunológicas específicas y tolerancia frente a diferentes situaciones (Chen *et al.*, 2001; Lei *et al.*, 2005). Uno de los principales objetivos de la inmunoterapia contra el cáncer es la de aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales. Aunque hay varias moléculas que pueden mediar en la colaboración entre células T-B, parece que respetar el CD40 es crucial (Aruffo *et*

al., 1993), por lo que para superar los defectos inmunológicos de células B malignas varios grupos han inducido una expresión ectópica forzada de CD154 u otro factor estándar (Stripecke *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006a).

Fundamentalmente existen dos estrategias de terapia génica sobre linfocitos primarios: la dirección transduccional, realizada mediante la modificación de la superficie del vector (Morizono *et al.*, 2001), y la dirección/selección transcripcional, basada en el empleo de un promotor o fragmento del mismo que dirija la expresión del gen terapéutico de forma tejido-específica. Un objetivo plausible, pero que ha manifestado algunos contratiempos puntuales de expresión *off-target* en ciertos ensayos (Marodon *et al.*, 2003; Moreau *et al.*, 2004).

1.2.6.1 Restricciones de la transducción de células T y B mediante LVs

La principal limitación de los vectores lentivirales derivados del HIV es la existencia de algunas células diana, de gran importancia para la terapia génica, que son parcialmente refractarias a su transducción. Entre ellas se incluyen las HSC tempranas, cuyo ciclo celular se encuentra en fase G_0 (Sutton *et al.*, 1999), monocitos (Kootstra *et al.*, 2000), linfocitos T en reposo (Dardalhon *et al.*, 2001) y células quiescentes como los linfocitos B y T primarios (Frecha *et al.*, 2010). Ha sido generalmente aceptado el hecho de que los linfocitos verdaderamente quiescentes, que se encuentran en fase G_0/G_{1a} , son poco permisivas a la infección lentiviral, mientras que las células T estimuladas en fase G_{1b} no lo son. La reverso transcripción de los vectores derivados del HIV-1 es muy ineficiente en este tipo de células quiescentes, al generar transcritos virales de longitud completa que son muy estables (Zhou *et al.*, 2005). Esta situación causa un retraso de hasta 30 veces

Introducción

en la culminación de la retro transcripción y con respecto a las T estimuladas a través del TCR (Vatakis *et al.*, 2007). Igualmente, es cierto que existen niveles nucleotídicos más bajos en las células quiescentes que en las proliferativas. No obstante, eso no justifica completamente las restricciones observadas, ya que en ensayos en los que se ha suministrado un aporte compensatorio de nucleótidos a los linfocitos humanos quiescentes, la elaboración de productos intermedios de la retro transcripción ha mejorado, pero no así la eficiencia de infección o de integración (Plesa *et al.*, 2007). Es más, tras añadir nuevas dosis de ATP para incrementar la importación nuclear del cDNA retro transcrito no se ha logrado una transducción más eficiente (Bukrinsky *et al.*, 1992).

El virus “salvaje” del HIV-1 puede infectar células T en reposo, pero no replicarse dentro (Stevenson *et al.*, 1990). La razón no está del todo clara, pero la causa se atribuye a múltiples bloqueos post-entrada, además de a la presencia de varios factores de restricción celulares (Strebel *et al.*, 2009). Por el momento, las restricciones observadas incluyen: defectos en la iniciación y terminación de la retro transcripción (Stevenson *et al.*, 1990; Korin *et al.*, 1998), importación nuclear dependiente de ATP defectuosa (Bukrinsky *et al.*, 1992) e integración deficiente del genoma viral en el genoma celular. Los vectores lentivirales pseudotipados con la glicoproteína VSV-G (VSVG-Lv) pueden superar la mayoría de estas limitaciones al estimular las células T y provocar su entrada en fase G_{1b} del ciclo celular (ya que aumenta la cantidad total de mRNA con respecto al que hay en células quiescentes) (Sun *et al.*, 2005; Vatakis *et al.*, 2009). A pesar de lo cual, aún hay dianas de difícil acceso para los VSVG-Lv. Por este motivo se han desarrollado otros lentivirus, como los vectores lentivirales pseudotipados con las glicoproteínas H y F del virus del sarampión (MV-Lv), que facilitan la transducción a través de los receptores de la familia del SLAM para el sarampión

y a través del CD46, superando en eficiencia a los VSVG-Lv (revisado por Frecha *et al.*, 2010).

La transducción de linfocitos primarios puede mejorarse con el uso de las interleucinas 2 y 7, que incrementan las posibilidades de supervivencia de las células T a largo plazo (Fry *et al.*, 2001) y que, en particular, convierte a las células T adultas en más permisivas a la transducción con vectores lentivirales, sin necesidad de recurrir a la estimulación mediada por el TCR (Dardalhon *et al.*, 2001), porque promueven el paso de fase G_0 a G_{1b} del ciclo celular sin sufrir alteraciones indeseadas (Ferrand *et al.*, 2000). Las células T vírgenes y memoria responden de manera diferente a la estimulación por IL-7 recombinante (Cavaliere *et al.*, 2003), ya que las vírgenes necesitan estimulaciones más largas que las memoria para permitir la transducción por vectores lentivirales (Cavaliere *et al.*, 2003).

Otra limitación del virus del HIV-1 es aquella causada por poseer un tropismo altamente restringido, dirigido específicamente hacia macrófagos y linfocitos T primarios o inmortalizados humanos. Además de carecer de receptores apropiados en la superficie celular para permitir la entrada de este virus o de vectores derivados del mismo, las células de distintas especies de roedores (usados como modelos de muchas enfermedades) tienen una serie de factores inhibitorios, como el producto proteico del gen murino *FvI*, que impiden la infección por distintos retrovirus. El *FvI* murino y otros factores similares confiere resistencia a las células de ratón ante la infección por MLV (Hartley *et al.*, 1970) o al HIV-1, manifestándose la fase de bloqueo del ciclo viral en algún momento temprano post-entrada (Himathongkham *et al.*, 1996). Estas observaciones han sido actualmente refrendadas y han justificado la muy escasa capacidad de infección de los vectores lentivirales derivados del HIV-1 sobre

Introducción

linfocitos primarios murinos, independientemente del pseudotipado usado para promover la entrada viral en ellos. La replicación del HIV-1 (y sus vectores derivados) está bloqueada en distintos pasos del ciclo infeccioso, incluyendo la entrada viral (superada al pseudotipar el vector), la transcripción, la importación nuclear de los productos de la retro transcripción (por una disfunción de la integrasa del HIV-1 dependiente del sistema de importación nuclear PIC de la célula murina) (Tsurutani *et al.*, 2007), la exportación del mRNA viral, el ensamblaje viral y la producción de nuevos viriones (estas dos últimas barreras en lo que al HIV-1 *salvaje* se refiere) (Baumann *et al.*, 2004). Algunos pasos están bloqueados por la presencia de elementos inhibitorios y pueden superarse aumentando la carga viral, mientras que otros están causados por la falta de factores de transcripción necesarios para la correcta ejecución del ciclo viral y no pueden superarse mediante el mismo procedimiento.

1.2.7 Terapia génica para HIGM1: una alternativa terapéutica

La terapia para pacientes de HIGM1 está limitada a tratamientos paliativos como la administración de inmunoglobulinas por vía intravenosa o antibióticos (Winkelstein *et al.*, 2003), que reducen la frecuencia y gravedad de las infecciones, pero que no son capaces de prevenir el desarrollo de enfermedades linfoproliferativas (Notarangelo *et al.*, 1992) y otro tipo de procesos tumorales (Hayward *et al.*, 1997). Por otro lado, ha habido ensayos clínicos que han demostrado la validez y utilidad de administrar a pacientes por vía subcutánea CD154 recombinante (Jain *et al.*, 2011). Esta terapia ofrece una mejora parcial de los síntomas asociados a HIGM1 y también reduce la incidencia de algunas infecciones características como *Cryptosporidium* (Jain *et al.*, 2011). No obstante, sus beneficios son limitados y sigue suponiendo que el paciente dependa de la

administración regular de CD154 recombinante (frente al que se puede desencadenar una respuesta inmunológica que lo bloquee) y de otros fármacos como agentes antiinflamatorios. Los trasplantes de médula ósea pueden curar el HIGM1 (Thomas *et al.*, 1995) y resolver la neutropenia asociada (Scholl *et al.*, 1998), pero la disponibilidad de esta terapia está limitada por la necesidad de contar con pacientes HLA compatibles. Son frecuentes las complicaciones asociadas a infecciones posteriores al trasplante y al rechazo frente a injerto (Hadzic *et al.*, 2000; Gennery *et al.*, 2004).

La identificación del defecto genético causante del HIGM1 ha permitido la posibilidad de detectar a individuos portadores y de realizar un diagnóstico prenatal. Es más, la naturaleza del HIGM1 la caracteriza como una inmunodeficiencia primaria causada por un defecto monogénico. En ese contexto, y ante los éxitos obtenidos por la terapia génica con otras inmunodeficiencias primarias (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000), se puede considerar esta enfermedad como un objetivo plausible para la mencionada estrategia terapéutica. En este sentido, uno de los primeros pasos llevados a cabo fue el desarrollo de un modelo animal para la enfermedad. De esta manera fueron creados ratones *Cd40l* KO, cuya deficiente expresión de CD154 permitió mimetizar la sintomatología, aunque algo menos acusada, de los pacientes de HIGM1 (Renshaw *et al.*, 1994). No obstante, los requerimientos de una terapia génica para HIGM1 son sustancialmente más complicados que los que han sido necesarios, por ejemplo, para SCID. Primero, porque se prevé que los progenitores hematopoyéticos reconstituidos no tendrán ninguna ventaja selectiva, un proceso que ha sido muy importante en otras enfermedades cuando se ha pretendido repoblar la médula ósea con células modificadas mediante terapia génica. Y en segundo lugar, porque la expresión de CD154 está sujeta a fuertes mecanismos regulatorios (Tsytsykova *et al.*, 1996).

Introducción

En 1998 se realizó un ensayo con dicho modelo murino de la enfermedad (Brown *et al.*, 1998). Se transdujeron células progenitoras hematopoyéticas de estos ratones con vectores oncoretrovirales portadores del *Cd40lg*, pero dirigido por un promotor fuerte que asegurara la expresión de la proteína (Grossmann *et al.*, 1997). Posteriormente se realizó el trasplante de estas células, por vía intravenosa, a ratones letalmente irradiados (Brown *et al.*, 1998). Este trabajo demostró que es posible corregir total, o al menos parcialmente, los defectos de la inmunología celular y humoral en el modelo de HIGM1 mediante la expresión no regulada de CD154 en células progenitoras hematopoyéticas modificadas por transferencia. Ahora bien, entre 7 y 9 meses tras el trasplante surgió un grave efecto adverso en 12 de los 19 ratones tratados, puesto que comenzaron a desarrollar síndromes linfoproliferativos descontrolados de origen tímico, probablemente relacionados a una interacción inesperada entre CD40-CD154 en timocitos en desarrollo, que expresaron CD154 en la superficie de timocitos en desarrollo de forma no controlada. Sin embargo, tal y como ya se ha explicado, *CD40LG/Cd40lg* está sujeto a mecanismos regulatorios muy estrictos que son de una gran importancia funcional (Foy, 1996) y, además, CD154 es de gran relevancia en la maduración y selección de los timocitos y en la organización del timo (Clegg *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 1997).

Las observaciones de Brown *et al.* fueron respaldadas en el año 2000 por otro ensayo (Sacco *et al.*, 2000), cuyos datos confirmaron la importancia de una expresión regulada y tejido-específica de CD154 en los protocolos de terapia génica para evitar efectos adversos. En este trabajo se generaron ratones transgénicos cuyo gen *Cd40lg* quedó dirigido por un promotor de expresión tisular ubicua. Así pues, el significado biológico de una interacción CD40-CD154 aberrante quedó señalado por el desarrollo de ratones transgénicos CD40L, que permitieron demostrar que la extendida expresión ectópica de CD154 fue

deletérea. Si bien la sobreexpresión constitutiva de CD154 fue tolerada en células T maduras, una parte importante de los animales tratados desarrollaron un síndrome proliferativo parecido, salvo que en esta ocasión estuvo relacionado con la implicación del CD154 con las señales de apoptosis a células B en los nódulos linfáticos (Sacco *et al.*, 2000). Por tanto, la expresión no regulada de CD154 perturba la homeostasis propia de los distintos subconjuntos de células de los nódulos linfáticos, dado que se produce una lenta expansión de una subpoblación de células B en los centros germinales de los folículos secundarios que aún conservan algunos rasgos reminiscentes de células B normales. Las repercusiones negativas de una interacción CD40-CD154 anormal son consecuentes con la importante implicación de esta ruta no sólo en la creación (Foy *et al.*, 1996), sino también en el mantenimiento de los centros germinales (Han *et al.*, 1995). Por consiguiente, es razonable que los efectos adversos descritos en el modelo animal de HIGM1 usado en terapia génica se atribuyan a la expresión constitutiva de las construcciones empleadas (Brown *et al.*, 1998; Sacco *et al.*, 2000).

Estas dificultades, causadas por la complejidad propia de la regulación de *CD40LG* y de la expresión de CD154, forzosamente descartan cualquier estrategia terapéutica que no conlleve un meticuloso control de la expresión del transgén CD40L. Las tecnologías de reparación génica pueden aprovechar todas las ventajas que ofrece el promotor endógeno de *CD40LG* sin producir alteraciones causadas por una expresión constitutiva. En el año 2004 se publicó un estudio que pretendía corregir las deficiencias inmunológicas del modelo murino de HIGM1 utilizando una estrategia de edición del mRNA *trans-splicing* (Tahara *et al.*, 2004), un proceso por el que dos pre-mRNA se unen por el espliceosoma (Puttaraju *et al.*, 1999). Un vector lentiviral portaba un *cassette* de expresión de la secuencia que en forma de RNA serviría para corregir, durante la post-transcripción, el mRNA mutante expresado en las células de los ratones *Cd40l*

Introducción

KO. El artículo publicado por Tahara *et al.* en 2004 demostró que así podían curarse los defectos inmunológicos del modelo animal para HIGM1 y en definitiva corroboró que la terapia génica es una alternativa capaz de revertir eficazmente los defectos moleculares y celulares asociados a HIGM1. Evidentemente esta metodología también requiere de la transducción *ex vivo* de los progenitores hematopoyéticos y su consecuente transferencia al individuo afectado por la enfermedad.

Este método no afecta al gen endógeno, ni altera la regulación natural del gen, pero conlleva una complejidad enorme, porque entre otras cosas habría que definir la mutación concreta de cada paciente y diseñar un vector específico que la corrigiera, lo que dificulta su aplicación a ensayos clínicos. Una terapia génica más tradicional puede resolver esas complicaciones, pues permite diseñar un único vector que pueda aplicarse a cualquier paciente. Las ventajas de la utilización de un promotor endógeno para los vectores de CD40L parecen fundadas en diversos mecanismos moleculares, que sugieren una regulación tejido-específica, inducible sólo por activación de la célula T y altamente precisa. Por tanto, se puede optar por hacer una construcción con el cDNA de *CD40LG* que esté dirigida por su promotor endógeno o un fragmento del mismo, que mantenga un patrón de expresión de la proteína propia de un fenotipo sano y que evite las anomalías observadas con expresiones de carácter constitutivo.

El grupo de investigación al que pertenezco ha desarrollado en los últimos años algunos vectores autoinactivables (SIN) con estas características (Martín *et al.*, 2005; Frecha *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2011; Fernández-Rubio *et al.*, 2015). Entre ellos se encuentra un vector lentiviral portador de la secuencia para WAS dirigida por su promotor endógeno, que ha logrado establecer una expresión fisiológica y tejido-específica de la proteína WASp, deficiente en el Síndrome de

Wiskott-Aldrich (Martín *et al.*, 2005; Frecha *et al.*, 2008; Toscano *et al.*, 2008). Es más, tratando de desarrollar un procedimiento seguro de terapia génica para HIGM1, que corrija los defectos adversos que cabría esperar si se usasen vectores de expresión constitutiva, nuestro grupo de investigación desarrolló un vector lentiviral a partir del cDNA de *CD40LG* y dirigido por su promotor endógeno, que fue capaz de reconstituir y lograr una expresión fisiológica de CD40L humano, regulado de manera tejido-específica y dependiente de activación, en la línea de linfocitos T primarios PH3 de un paciente de HIGM1 *in vitro* (Figura 1.10) (Romero *et al.*, 2011).

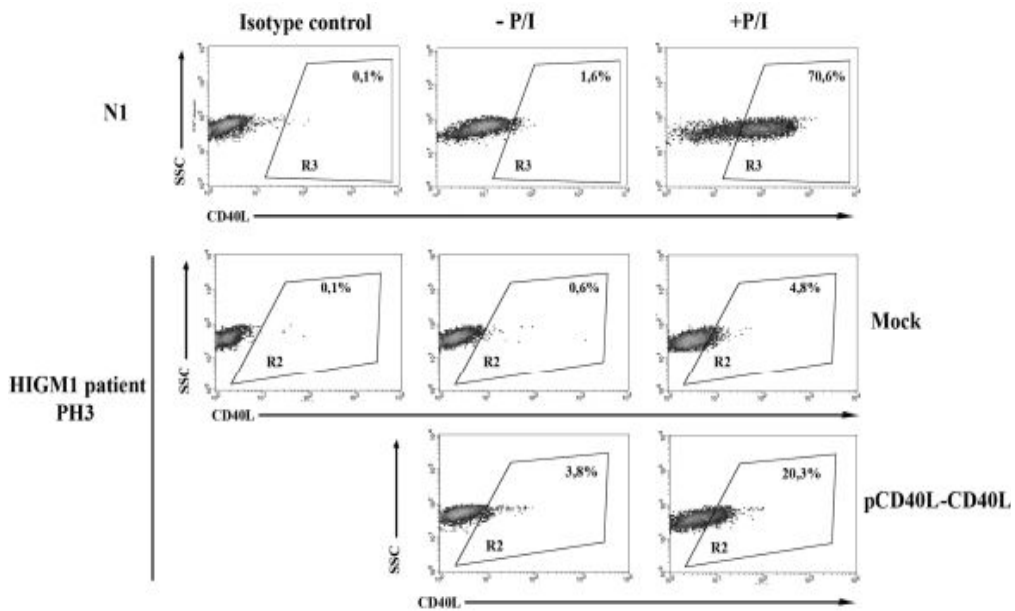


Figura 1.10 Expresión del CD40L en células T de un paciente HIGM1. Las células de paciente transducidas con el vector lentiviral pCD40L-CD40L, panel inferior, expresan CD40L sólo tras su activación (Romero *et al.*, 2011).

Aunque el patrón de expresión de proteína CD40L es más intenso en linfocitos T activados de un donante sano (75% CD154⁺ en la línea N1), que en las células de paciente reconstituidas (20% CD154⁺ en células PH3 activadas), no

Introducción

es preciso alcanzar una reconstitución de la expresión completa para que las funciones inmunológicas sean restituidas de forma drástica.

El trabajo que aquí se presenta como tesis doctoral pretende dilucidar si es posible emplear una metodología viable y efectiva de terapia génica para el síndrome de hiper IgM ligado al cromosoma X. En él se ha continuado el desarrollo del protocolo de terapia génica para HIGM1 que empleamos previamente en otros estudios (Romero *et al.*, 2011), tratando de profundizar en la comprensión de los patrones de expresión observados de CD154 y en los mecanismos moleculares y celulares subyacentes. De aquel trabajo nos interesó especialmente la relativa baja eficiencia mostrada por la expresión superficial de la proteína conseguida por el vector (Fig. 1.10), a pesar de lograr un número alto de integraciones del vector por célula y una buena tasa de transcripción del gen terapéutico. Esta tesis doctoral incluye un examen detallado de este problema y aborda algunos de los aspectos más intrigantes del mismo, que hasta la obtención de los resultados subsiguientes estuvieron sujetos a especulación. Entre otras cuestiones quisimos averiguar si los patrones de expresión observados con el vector terapéutico en células humanas (Romero *et al.*, 2011) pueden extenderse a otras especies, permitiendo la aplicación de este sistema de terapia génica en otros modelos experimentales de HIGM1. De este modo, hemos tratado de resolver la cuestión de si las herramientas terapéuticas que hemos desarrollado son capaces de lograr en células no humanas una expresión regulada de trímeros CD154 funcionales que sea dependiente de activación, transitoria y tejido-específica o si dicho patrón es una característica particular de los linfocitos humanos.

Objetives

2. Objectives

The establishment of a safe and efficient gene therapy protocol for primary immunodeficiency patients, in particular those suffering from HIGM1, needs to fulfil strict requirements because of the fine regulation of the *CD40LG* gene. Considering the possible adverse effects derived from a dysregulated gene expression, which might arise when viral vectors are used as therapeutic tools, it is essential to improve the biosafety of the procedure. Therefore, this work tries to delve into the knowledge and understanding of the molecular and cellular mechanisms involved in the restoration of the CD154 expression in different *in vitro* HIGM1 models, by means of second generation SIN lentiviral vectors designed by our research group, where the transcription of the therapeutic gene is driven by its endogenous promoter. After these reasons the next aims are proposed:

- 1- To assess the causes of the defective CD154 expression and the low transduction efficiency achieved with the regulated vector pCD40LG-CD40LG in Jurkat CD154⁻ cells and T cells derived from HIGM1 patients.
- 2- To investigate into the molecular and cellular mechanisms involved in the tissue-specific, transient and activation-dependent transgene expression of our lentiviral vectors, which are carriers of a CD40LG minigene driven by a fragment of its endogenous promoter.
- 3- To assess whether or not the CD154 expression pattern showed *in vitro* by human cells transduced with our lentiviral constructions is restricted to human models of HIGM1, and hence, if regulated transgene expression could be extended to other species.
- 4- To verify whether or not the vectors used in this work are suitable for a possible gene therapy clinical trial for HIGM1 patients.

Materiales y Métodos

3. Materiales y métodos

3.1 Bacterias, transformaciones y materiales para cultivo bacteriano

Para las transformaciones bacterianas con plásmidos se usaron bacterias “*Subcloning Efficiency DH5 α Competent Cells*” (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Para la transformación con productos de ligación se usaron MAX Efficiency DH5alpha Competent Cells (Invitrogen). El plásmido 1024140_mouse_pCD40L-CD40L_pMS (pMSMouse) liofilizado (5 μ g) se obtuvo mediante síntesis (GENEArt, Regensburg, Alemania). Los plásmidos basados en el pHR´SINcPPT-SEW fueron producto de trabajos previos en nuestro laboratorio (Romero *et al.*, 2011).

Las bacterias (50 μ l) fueron incubadas en hielo durante 30 min en presencia de los plásmidos (1 μ g en todas las construcciones, salvo para el pMSMouse donde se usaron 2 μ g) o productos de ligación, después fueron sometidas a un choque térmico de 30 seg a 42°C en un termobloque (Labnet, Encinitas, CA, EE.UU.) y posteriormente devueltas al hielo. Se incubaron en medio SOC (Invitrogen) durante 2 h a 37°C y agitación orbital a 225 rpm y se sembraron en placas LB-Agar o LB con ampicilina 50 μ g/ml o espectinomicina 100 μ g/ μ l según las indicaciones del proveedor (Sigma, St. Louis, MO, USA). Se incubaron durante 24 h a 37°C y se expandieron colonias al azar para su análisis individual.

3.2 Purificación plasmídica por Miniprep, Midiprep y Maxiprep

En el caso de las minipreps, se cultivaron las bacterias en medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L) con el antibiótico correspondiente durante 16 h y en agitación orbital a 225 rpm. Una alícuota de 250 μ l de cada clon bacteriano se congeló en 250 μ l de medio Hoegness (solución de glicerol al 30% en agua bidestilada y autoclavada) a -80°C y el resto se centrifugó en una centrifuga Sorvall de alta velocidad. Los pellets bacterianos fueron resuspendidos en 100 μ l de solución de solubilización (25 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM glucosa y 10 mM EDTA), lisados con 200 μ l de solución de lisis (0,2 M NaOH y 1% SDS) y precipitados con 150 μ l de acetato potásico 3M. Posteriormente se realizaron tres extracciones orgánicas consecutivas (todas en una proporción muestra/disolvente 1/1) con Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico o IAA (25:24:1), Cloroformo-IAA (24:1) y fenol (Invitrogen). El material obtenido fue precipitado añadiendo 950 μ l de etanol absoluto y 50 μ l de acetato amónico 10 M por cada 500 μ l recuperados de las extracciones orgánicas durante 24 horas a -20°C, lavado con 1 ml de etanol al 70% y diluido en 50 μ l de solución tamponada TE (Tris-EDTA) dilución 1/10 pH 8. Las trazas de RNA fueron eliminadas con 1 μ l 10 mg/ml de RNAsa (Invitrogen). La concentración y pureza relativa del DNA plasmídico se midió en un nanodrop ND1000 (Thermoscientist, Wilmington, NC, EE.UU.).

Para las midipreps, las alícuotas de los clones bacterianos congeladas a -80°C fueron descongeladas en hielo. Se cultivaron 50 μ l de bacterias en 100 ml de medio LB estéril con espectinomicina 100 μ g/ml durante una hora, a 37°C y en agitación orbital. Alícuotas de 10 ml en tubos universales fueron incubadas durante 16 h bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación. La

purificación del DNA plasmídico se realizó tal y como se ha indicado previamente.

Para las maxipreps, 50 μ l de bacterias conservadas a -80°C fueron preinoculadas en 10 ml de medio LB estéril con ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) e incubadas durante 1 h a 37°C y agitación orbital a 225 rpm. Posteriormente estos 10 ml bacterianos fueron adicionados a 490 ml de medio LB estéril con ampicilina a igual concentración e incubados 16 h en las condiciones antes descritas. Una vez terminada la incubación las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm en recipientes de 250 ml de capacidad. Los pellets bacterianos resultantes fueron resuspendidos en 18 ml de tampón de solubilización. Después fueron lisados añadiendo 40 ml de tampón de lisis a cada recipiente. Finalmente se procedió a facilitar la precipitación del DNA genómico y de los componentes celulares de mayor peso molecular con 20 ml de solución de precipitación (acetato potásico 3M y ácido acético glacial 3M). Las soluciones obtenidas al final de este proceso fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 15 a 30 min, tras lo que se recogieron los sobrenadantes, que fueron entonces filtrados con gasas estériles humedecidas con agua bidestilada y precipitados con 0,6 volúmenes de isopropanol durante toda la noche a -20°C . Al día siguiente los sobrenadantes con isopropanol se centrifugaron nuevamente a 12000 rpm durante 15 a 30 min y los precipitados obtenidos fueron lavados con 20 ml de etanol 70% y centrifugados a 4000 rpm 15 min. Tras descartar el sobrenadante los precipitados se dejaron secar a temperatura ambiente y después fueron resuspendidos en 8 ml de solución tamponada TE pH 8.0, que se distribuyeron en sendos tubos estériles de 2 ml. El RNA de alto peso molecular de la muestra fue precipitado con 1 ml de LiCl 5M a 4°C por cada ml de muestra, tras lo que ésta fue centrifugada a 14000 rpm. Los sobrenadantes fueron entonces sometidos a precipitación con isopropanol (proporción 1/1) a 4000 rpm. Tras lo cual, los pellets fueron lavados con 10 ml de etanol 70% y

Materiales y Métodos

resuspendidos en 1,5 ml de solución TE pH 8.0, para luego aplicarles RNAsa (20 µg/ml) durante 1 h a 37°C. Posteriormente se realizaron dos extracciones orgánicas consecutivas con Fenol:Cloroformo:IAA (25:24:1) y con cloroformo (ambas con una proporción 1/1). El producto de estas extracciones fue precipitado toda la noche a -20°C añadiendo 950 µl de etanol absoluto y 50 µl de acetato amónico 10 M por cada 500 µl recuperados de las extracciones orgánicas. Al día siguiente se centrifugaron a 14000 rpm y el DNA plasmídico precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% y se resuspendió en 400 µl de TE diluido 1/10.

3.3 Geles, electroforesis, extracciones de DNA de geles de agarosa y procesos de ligación

Las digestiones plasmídicas se realizaron con las enzimas de restricción: EcoRI, XhoI, ClaI, BamHI, NotI, NheI, BglII y Sall (todas de Promega, Fitchburg, WI, EE.UU.) durante 16 h en baño a 37°C o 2 h en un termobloque. Los fragmentos de DNA fueron separados en geles de SeaKem LE agarosa (Cambrex, Oberbayern, Alemania) al 0,7 o 1 % y en Agarosa Low Melt (Pronadisa, Madrid, España) al 0,7%. Las condiciones de electroforesis para los geles de SeaKem LE agarosa fueron 50 min a voltaje constante de 100V. Para los geles de Agarosa Low Melt las condiciones electroforéticas fueron 4 h y 50V. A los geles se les adicionaron 0,6 µl de una solución de bromuro de etidio a 0,5 µg/ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) para su revelado en el GelPrinterPlus. Las extracciones de DNA de geles de agarosa y su purificación se hicieron con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) o mediante las extracciones orgánicas ya mencionadas. Los fragmentos de DNA fueron ligados con la DNA ligasa T4 (Invitrogen) y cuando se desfosforilaron sus extremos se hizo con la USB Shrimp Alkaline Phosphatase (Affymetrix,

California, CA, EE.UU.), en ambos casos siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, los fragmentos abiertos de DNA con extremos cohesivos fueron ligados entre sí con una proporción Inserto/Vector de 10/1 y 3/1 durante 1 h a temperatura ambiente tras lo cual fueron almacenados a -20°C. En los casos en que, previamente a la ligación, fue preciso la defosforilación de los extremos de los fragmento de DNA, los productos de PCR fueron incubados a 37°C con USB Shrimp Alkaline Phosphatase en un volumen total de 7 µl durante 15 min, tras lo cual se inactivó la enzima al incubar la mezcla 15 min a 80°C.

3.4 Construcción de los plásmidos y producción de vectores lentivirales

La secuencia murina de pCd40lg-Cd40lg de 2,1 Kb contiene una construcción que incluye al promotor endógeno de Cd40lg y el cDNA correspondiente a Cd40lg. Esta secuencia se obtuvo del plásmido 1024140_mouse_pCD40L-CD40L_pMS (GENEART), del que fue escindida por digestión con las enzimas de restricción EcoR1 y Xho1 (Promega), posteriormente se ligó con la DNA ligasa T4 (Invitrogen) al plásmido pHR'SINcPPT-SEW, cuya secuencia central SFFV-eGFP-WPRE fue eliminada tras su digestión con las mismas enzimas de restricción.

El plásmido pSFFV-Cd40lg contiene una construcción formada por el promotor viral fuerte SFFV y el cDNA correspondiente a Cd40lg. Este plásmido se desarrolló a partir del plásmido pCd40lg-Cd40lg por amplificación de la secuencia codificante completa de Cd40lg, sin su promotor endógeno, de 0,9 Kb mediante el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), usando los cebadores F-BglII(1346)

Materiales y Métodos

(AGATCTATTCTTGGTCAGAAG) y R(XhoI 1) (TGGCTAAGATCTACAG), que introdujeron una diana Bgl II en 5', bajo las condiciones de PCR [(94°C 2 min, 35X(94°C 20 seg, 50°C 20seg, 72°C 30 seg), 72°C 7 min, 4°C 10 min)] en un termociclador 2720 Thermal Cycle (Applied Biosystem, Indianapolis, IN, E.E.U.U.). La secuencia fue subclonada en el plásmido de clonaje intermedio pGEM-T Easy (Promega) (Fig. 3.1) y posteriormente extraída por digestión con las enzimas BamH I y Xho-I. Este fragmento fue ligado mediante la DNA ligasa T4 (Invitrogen) al esqueleto plasmídico pHR'SINcPPT-SEW abierto resultante de su digestión con las mismas enzimas de restricción.

El plásmido con la secuencia pSFFV-CD40LG incluye una construcción constituida por el promotor viral fuerte SFFV y el cDNA correspondiente a CD40LG. El plásmido con la secuencia pCD40LG-CD40LG contiene una construcción formada por el promotor endógeno de CD40LG y el cDNA correspondiente a CD40LG. Ambos fueron construidos tal y como se describió previamente (Romero et al., 2011)

El plásmido bicistrónico pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP incluye una construcción compuesta por el promotor endógeno de CD40LG, el cDNA correspondiente a CD40LG, la secuencia IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) y la secuencia de DNA codificante de la proteína fluorescente eGFP. Este plásmido se construyó por la escisión de la secuencia IRES-eGFP (1347 pb) del plásmido SQ4 al digerir con Xho-I y su ligación con el esqueleto abierto (por digestión con Xho-I) del plásmido pCD40LG-CD40LG.

El plásmido bicistrónico pSFFV-CD40LG-IRES-GFP cuenta con una construcción formada por el promotor viral fuerte SFFV, el cDNA correspondiente a CD40LG, la secuencia IRES y la secuencia de DNA codificante de la proteína

fluorescente eGFP. Este plásmido se obtuvo por la amplificación con polimerasa Expand High Fidelity PCR System (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) de la secuencia CD40LG-IRES-eGFP de 2,1 Kb usando como molde el plásmido al pCD40LG-CD40LG-IRES-GFP.

Los cebadores usados fueron: Forward BamHI-F-CD40L (5'GGATCCGCCCTTATTTCAACTTTAACACAGC3') y Reverse I (XhoI)-Sal I (5'CAGCTGTGGCTAAGATCTACAG3') que añadieron una diana BamHI en 5' y otra SalI en 3' flanqueando la secuencia, bajo las condiciones [(94°C 2 min, 35X(94°C 20 seg, 55°C 20 seg, 72°C 30 seg), 72°C 7 min, 4°C 10 min)]. El fragmento amplificado se subclonó en el plásmido de clonaje intermedio pGEM-T Easy (Promega) y fue extraído por digestión con las enzimas BamH I y Sal I (Promega). Esta secuencia fue ligada al esqueleto abierto del plásmido pHR'SINcPPT-SEW, al que previamente le fue escindida su secuencia comprendida entre las dianas BamH I y Xho-I.

Todas las construcciones, a excepción del pSFFV-Cd40lg, que sólo necesitó una pareja de cebadores, fueron sometidas a secuenciación completa usando 3 parejas de cebadores solapantes, que abarcaron los fragmentos completos de cada transgén, en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra de Granada (CSIC), quedando confirmada la integridad de todas las secuencias y su orientación correcta. En particular, para la secuenciación de los fragmentos pSFFV-Cd40lg y pCd40lg-Cd40lg se emplearon los siguientes cebadores para su secuenciación:

Forward 1 (EcoR1 7743) 5'ACAGGGACAGCAGAGATCCAG3'

Forward 2 (982) 5'GTGGACTCATTGTGCAC3'

Forward 3 (1511) 5'GCTGTGTATCTTCATAGAAGA3'

Materiales y Métodos

Reverse 1 (XhoI 1) 5'TGGCTAAGATCTACAG3'

Reverse 2 (1613) 5'CCTTCTCCTTTGTTGCATCTC3'

Reverse 3 (940) 5'CTGGAACCTGGTATAAAG3'

Todos los cebadores empleados fueron diseñados con la ayuda de la herramienta informática BioMath Calculators (Promega). Las PCR intermedias de la construcción de todos los plásmidos se realizaron con 5 unidades de GoTaq Flexi DNA Polimerase y 10 µl de tampón Green GoTaq Flexi 5X (Promega), 1 µl de desoxinucleótidos 10 µM, 2 µl de MgCl₂ 25 mM (Promega) y 1 µl de cada primer con concentración 10 µM en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de PCR fueron: [2 min a 94°C, 30x (30 seg a 94°C, 30 seg a 50°C, 90 seg a 72°C) y 10 min a 72°C].

Las secuencias usadas en la construcción de plásmidos de transferencia para la producción de vectores lentivirales se diseñaron con la herramienta informática Vector NTI Advance 9 (Invitrogen) y fueron sintetizadas por GENEArt. El alineamiento de las distintas secuenciaciones se realizó con la herramienta informática *online* Blast (NCBI, Maryland, MD EE.UU.).

Para la producción de los vectores lentivirales (LVs) se usaron el plásmido empaquetador pCMVDR8.91 que codifica los genes gag, pol, tat y rev del virus de la inmunodeficiencia humana y el plásmido de la envoltura del virus-G de la estomatitis vesicular, que fueron amablemente proporcionados por el Dr. D. Trono (Universidad de Ginebra, Suiza). Los LVs se produjeron por cotransfección de células 293T en fase exponencial de crecimiento (80-90% confluencia) con el plásmido conteniendo el transgén, el plásmido empaquetador pCMVDR8.91 y el plásmido de la envoltura pMD.G tal y como fue descrito (Toscano *et al.*, 2004) (27µg total de DNA; con una proporción de los plásmidos 3:2:1) mediante el uso

de LipoD293 DNA In Vitro Transfection Reagent (SignaGen Laboratories, Ijamsville, MD, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los sobrenadantes fueron recogidos 48 y 72 h post-transfección, filtrados a través de filtros de 0,45 mm (Nalgene, Rochester, NY, USA) y concentrados por centrifugación a 2000 g con filtros concentradores Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultracel 100k (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Los virus fueron alicuotados y congelados a -80°C inmediatamente.

3.5 Líneas Celulares y Medios de Cultivo

Todas las líneas celulares tumorales murinas se obtuvieron del Banco de Células del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Las líneas murinas BW5147 (timoma temprano), EL-4 (leucemia de células T) y LL2-LLc (carcinoma de epitelio pulmonar) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Bio-Whittaker, Verviers, Bélgica) y las líneas Wehi 231 (linfoma de células B) y C2C12 (mioblastos) en medio Eagle modificado de Dulbecco DMEM (Lonza, Barcelona, España), en ambos casos suplementados con SFT (suero fetal bovino) al 10%, 2-Mercaptoetanol (100 μ M), glutamax, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales y P/E (penicilina/estreptomicina) al 1% (Sigma).

Los esplenocitos CD4⁺ fueron purificados a partir de bazos de ratones C57Bl/6 que fueron procesados mecánicamente y cargados en un gradiente de ficoll Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich), lavados con PBS estéril y purificados por selección negativa inmunomagnética (DynaL Mouse CD4 Negative Isolation Kit; Dynal, Oslo, Noruega). Estos linfocitos fueron cultivados en medio Panserin (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania) suplementado 2-Mercaptoetanol (100 μ M), SFB al 10%, glutamax, P/E, piruvato sódico y aminoácidos no esenciales y 50 UI/ml de IL-2 humana recombinante (obtenidas del National Institute of Health's AIDS

Materiales y Métodos

Reagent Program, Rockville, MD, USA). La pureza de la población resultante se determinó por citometría de flujo por marcaje con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4 murinos. Una vez purificadas, estas células fueron aloestimuladas con linfocitos B Wehi 231 previamente tratados con mitomicina C (Sigma-Aldrich).

Los linfocitos B primarios murinos fueron obtenidos de bazo de ratones C57Bl/6 como se acaba de describir, lavados con PBS estéril y purificados por selección negativa inmunomagnética (DynaMouse B Cell Negative Isolation Kit; Dynal). Estos linfocitos fueron cultivados en medio Panserin suplementado 2-Mercaptoetanol (100 μ M), FBS al 10%, glutamax, P/E, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, IL-4 e IL-5 recombinantes murinas (RD Systems Minneapolis, MD, EE.UU.) e IL-2 humana recombinante en las condiciones arriba descritas. La pureza de la población resultante se determinó por citometría de flujo al marcar con anticuerpos anti-IgM y anti-CD19 murinos.

Las líneas de linfocitos T aloespecíficos primarios procedentes de un individuo sano N1 (establecidas en nuestro laboratorio) y las de pacientes de HIGM1 PH2 y PH3 (establecidas en nuestro laboratorio según el procedimiento descrito por (Molina *et al.*, 1992) fueron mantenidas mediante aloestimulación semanal con células B Raji (HLA Class II⁺) pretratadas con Mitomicina C (50 μ g/ml). Los linfocitos fueron cultivados en medio completo Panserin (PAN Biotech) suplementado con 50 UI/ml de IL-2 humana recombinante (National Institute of Health's AIDS Reagent Program). El paciente PH2 presenta una mutación IVS3+5 g/a, mientras que el paciente PH3 tiene una mutación puntual que afecta al Q174R. Las líneas celulares Jurkat (leucemia aguda de células T) y Raji (leucemia de células B) fueron cultivadas en RPMI 1640 (Bio-Whittaker) y las células 293T (células epiteliales de riñón) en medio DMEM (Lonza), en ambos casos suplementados con SFB al 10%, glutamax y P/E al 1%. La línea Jurkat usada es

una variante CD154 negativa en su superficie celular, pero expresa mRNA de CD40LG que se puede detectar mediante PCR a tiempo real (qPCR).

3.6 Título de los vectores Lentivirales y Transducción Celular

La titulación de los vectores virales se efectuó sembrando 10^5 células 293T/pocillo en placas de 48 pocillos con 1, 10 o 100 μ l de sobrenadante viral en un volumen final de 1 ml de medio DMEM y en presencia de Polybrene Infection/Transfection Reagent 1000X (Millipore) según las instrucciones del proveedor. La transducción se prolongó durante 16-20 h a 37°C y 5% de CO₂ tras lo que el medio fue reemplazado por medio nuevo. Las células fueron cultivadas durante dos semanas y sometidas a una extracción de DNA genómico para determinar el número de inserciones/célula por qPCR (*quantitative PCR* o PCR a tiempo real) tal y como se describe más abajo. La media ponderada del número de inserciones en las células transducidas con distintos volúmenes de sobrenadante viral estableció el título viral.

La transducción de todas las líneas celulares, salvo otra indicación, se efectuó sembrando 10^5 células/pocillo en placas de 48 pocillos con un volumen de sobrenadante viral determinado según la Multiplicidad de infección (MOI) deseado en cada caso. El volumen final fue siempre de 1 ml del medio correspondiente en presencia de Polybrene Infection/Transfection Reagent 1000X (Millipore). En el caso particular de las líneas de linfocitos tumorales y de las líneas celulares aloespecíficas primarias también se suplementó el medio de transducción con 10 ng/ml de rIL-7 (Peprotech, Rocky Hills, NJ, EE.UU.). La transducción se produjo a 37°C y 5% CO₂ durante 20 h para las líneas tumorales y 7 h para los linfocitos primarios N1, PH2 y PH3. Las células fueron cultivadas un mínimo de 5 días antes de determinar la expresión de CD154 por citometría de

Materiales y Métodos

flujo y de 2 semanas antes de realizar la extracción de DNA genómico o mRNA total para determinar el nº de inserciones/célula (cc) o el nivel de expresión de CD40L mRNA por qPCR.

3.7 Extracción de DNA genómico y cálculo del número de inserciones/célula

El compuesto DNazol (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EE.UU.) fue empleado para aislar el DNA genómico de las distintas líneas celulares de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El pellet de DNA genómico se resuspendió en 100-200 µl de una solución NaOH 8 mM y tras determinar la concentración y pureza del mismo en un nanodrop ND1000 (Thermoscientist) se procedió a realizar una qPCR con el agente Fast Start SYBR GREEN MASTER (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) según las indicaciones del proveedor en un termociclador ABI Prism 7500 PCR Detection System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

La detección del número de inserciones de *CD40LG* se realizó mediante los cebadores: F321 (5'CTG TGA GGA GAT TAA AAG CCA GT3') y R514 (5'GGT GTA GTA CCT TTT TCA GCC CA3'), que generan una secuencia de 150 pb comprendida entre los exones 3 y 5. Las condiciones de la PCR fueron [(50°C 2 min, 95°C 10 min, 40x(95°C 20 seg, 57°C 30 seg, 72°C 30 seg), 4°C 10 min)]. Como gen control se seleccionó la β-actina humana, que se amplificó usando los cebadores: F-B-Act-RT (5'AGCCTCGCCTTTGCCGATCC3') y R-B-Act-RT (5'ACATGCCGGAGCCGTTGTCG3').

La detección de las inserciones de *Cd40lg* se llevó a cabo con los cebadores: F1759 (5'TGTAAGCGAAGCCAACAGTAATG3') y R1843

(5'CATTACCAAGTTGCTTTTCATGGT3') que generan una secuencia de 84 pb comprendidas entre los exones 4 y 5 de *Cd40lg*. Las condiciones de la qPCR fueron [(50°C 2 min, 95°C 10 min, 40x(95°C 15 seg, 58°C 1 min), 4°C 10 min)]. Como gen control se eligió la β -actina murina, que se amplificó con los cebadores Fbeta-act ratón (5'TGTTACCAACTGGGACGACA3') Rbeta-act ratón (5'GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA3').

El número de copias de plásmido/ μ l se determinó mediante la siguiente relación:

$$\text{pb plásmido} \times 330 \text{ g/mol} \times 2 \text{ cadenas DNA} / 6,023 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol} = \text{Masa 1 copia de plásmido}$$

donde

pb plásmido= n° de pares de bases del plásmido

330 g/mol= masa de un mol de nucleótidos

2 cadenas de DNA= el n° de cadenas de DNA que conforman el plásmido

Masa 1 copia de plásmido= en g/molécula

A continuación, si

$$\text{Masa de 1 copia de plásmido/1 molécula} = 1 \mu\text{g de plásmido/x moléculas}$$

Despejando x se halla el número de copias de plásmido en 1 μ g del mismo.

Por otro lado, el número de inserciones/célula (cc) se determinó considerando que 600 ng de DNA genómico corresponden a $\sim 10^5$ células y extrapolando los datos obtenidos en cada muestra en una curva patrón estándar establecida por concentraciones crecientes de 10 veces (desde 1 a 10^8 copias) del

Materiales y Métodos

plásmido pSFFV-CD40LG para todas las células transducidas con vectores que contuvieran la secuencia de cDNA de *CD40LG*. En el caso de las líneas celulares transducidas con vectores que contuviesen la secuencia de cDNA de *Cd40lg* se emplearon concentraciones crecientes de 10 veces (desde 1 a 10^8 copias) del plásmido pSFFV-Cd40lg para elaborar la curva patrón. Justo antes de cada ensayo se preparó una curva patrón nueva a partir de una solución madre de plásmido pSFFV-CD40LG o pSFFV-Cd40lg con una concentración de 10^{11} copias por μl . La figura 3.1 y la tabla 3.1 muestran un ejemplo del procedimiento empleado para calcular el número de inserciones de un vector en un tipo celular cualquiera transducido con dicho vector:

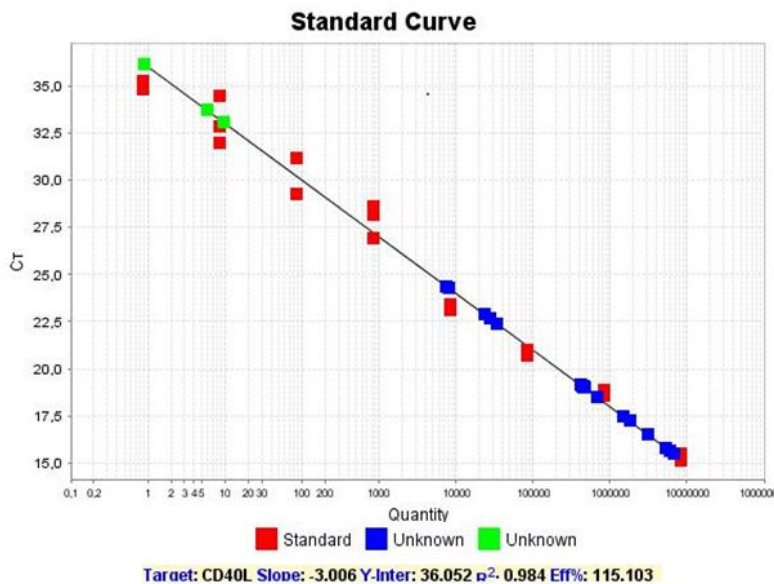


Figura 3.1. Curva patrón estándar usada en una PCR cuantitativa para hallar el número de inserciones de un vector *Cd40lg*. Tras preparar una curva patrón estándar con 1 a 10^8 copias por triplicado del vector SFFV-Cd40l (puntos rojos) el programa del termociclador ABI Prism 7500 PCR Detection System genera una recta de regresión por el método de los mínimos cuadrados que relaciona las variables CT (número de ciclo en que la enzima polimerasa se satura y alcanza la fase de “plateau”) y la cantidad de inserciones o copias de vector en la muestra. La pendiente o “*slope*” ideal debe ser de -3 (siendo en este caso de -3,006) y el coeficiente de correlación o R^2 lo más cercano posible a 1 (en esta gráfica es de 0,984). Los puntos azules y verdes representan diferentes muestras de las que deseamos conocer el número de inserciones de vector que portan. Al conocer la CT para cada muestra podemos superponerlas en la recta de regresión y deducir el número de inserciones para cada una.

Copias Curva Patrón	CT media	Muestra	CT media	Nº de inserciones (media)
1	35,1	293T No transducidas	34,4	6,4
10 ²	33,1	293T S1	24,3	9.315
10 ³	30,5	293T S10	19,1	509.116
10 ⁴	27,9	293T S100	15,7	7.211.103
10 ⁵	23,3	293T G1	22,7	33.765
10 ⁶	20,8	293T G10	18,8	635.097
10 ⁷	18,7	293T G100	17,1	2.510.374
10 ⁸	15,3			

Tabla 3.1. Cálculo del número de inserciones de un vector Cd40l en células 293T transducidas. Esta tabla sirve de ejemplo para entender la metodología empleada en el cálculo de inserciones de nuestros vectores en los distintos tipos celulares con los que hemos trabajado en esta tesis doctoral.

3.8 Estimulación celular, Anticuerpos y Citometrías de Flujo

Para la estimulación celular se sembraron 5×10^6 de células/pocillo en placas de 6 pocillos con un volumen final de 2 ml de medio. Salvo otra indicación, las células murinas fueron estimuladas durante 6-8 h con 10 ng/ml de Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) o Phorbol 12,13-dibutyrate (PDB) y 0,5 µg/ml de ionomicina (Sigma-Aldrich). Las células BW5147, Jurkat, N1, PH2 y PH3 usadas en los ensayos de transducción con los vectores lentivirales con la secuencia *CD40LG* fueron estimuladas durante 7 o 20 h con 10 ng/ml de PMA y 0,5 µg/ml de ionomicina.

Los anticuerpos empleados en este trabajo marcados con aloficocianina (APC) fueron anti-CD154 humano clon 24-31 (Biolegend, San Diego, CA,

Materiales y Métodos

EE.UU.), anti-IgM murina clon RMM-1 (Biolegend), anti-CD4 murino clon GK1.5 (Biolegend), control de isotipo IgG2b κ de rata clon RTK4530 (Biolegend) y suero policlonal obtenido de cabra anti-Ig murina (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.). Los anticuerpos marcados con ficoeritrina (PE) fueron anti-CD69 murino clon H1.2F3 (Biolegend), control de isotipo IgG de hámster de raza armenia clon HTK888 (Biolegend), anti-CD69 humano clon FN50 (BD Biosciences) y anticuerpo secundario IgG2b de rata (Tag Laboratories, Champlain, NY, EE.UU.). Los anticuerpos marcados con fluoresceína (FITC) fueron: anti-CD19 murino clon 6D5 (Biolegend), anti-CD40 murino clon HM40-3 (Biolegend) y anti-CD3 murino FITC clon 145-2C11 (eBioscience). Finalmente, marcado con peridina clorofila 710 nm (PerCP 710) fue el anticuerpo anti-CD154 murino clon MR1 (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.). Antes de la tinción, las células fueron bloqueadas con SFB al 3% en PBS durante 15 min, incubadas con los anticuerpos pertinentes durante 30 min en oscuridad y agitación, lavadas y analizadas en un citómetro de flujo FACSCALIBUR (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EE.UU.).

Todos los experimentos de citometría de flujo fueron ejecutados un mínimo de tres veces y se seleccionó el más representativo de la media estadística de los resultados. Todos los experimentos de activación de linfocitos T murinos o humanos confirmaron el estado de activación de las células por marcaje con anticuerpos para CD69 murino o humano determinado por citometría de flujo.

3.9 Ensayos de proliferación celular

10^7 linfocitos B purificados a partir de esplenocitos de ratón C57Bl/6, tal y como se describió anteriormente, fueron resuspendidas en 1 ml de PBS con el

colorante vital *5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* o CFSE (eBioscience) a una concentración de 10 μ M. Por dos veces fueron incubadas durante 5 min a 37°C y oscuridad y lavadas con 50 ml de PBS con SFB al 2%. Se distribuyó un millón de células B marcadas con CFSE por pocillo en una placa de 24 pocillos, tras lo que se aplicó el tratamiento correspondiente en 1 ml final de medio. Las células fueron cultivadas durante 72 h en oscuridad a 37°C y 5% CO₂. A tiempo cero se tomó una alícuota de 10⁵ células marcadas para establecer por citometría de flujo el valor de referencia de fluorescencia.

Como control negativo se usaron células B marcadas sin tratar. El control positivo fueron células B marcadas y estimuladas con 45 μ g/ml de lipopolisacárido bacteriano de *Escherichia coli* 055:B5 o LPS (Sigma-Aldrich). Las demás células B fueron cocultivadas con células T BW5147 no estimuladas o estimuladas 7 h con 10 ng/ml de PDB y 0,5 μ g/ml de ionomicina (Sigma-Aldrich) a una proporción células B:T 1:1. Al finalizar el tratamiento de activación, las células T fueron lavadas con PBS y tratadas con 50 μ g de mitomicina C (Sigma-Aldrich)/ 10⁶ células en 1 ml de PBS durante 1 h y 15 min a 37°C y lavadas tres veces más con PBS antes de que fueran puestas en contacto con las células B. 72 h después se recogieron los cultivos de células B y T y se determinó la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo usando los parámetros dispuestos en el test de células B marcadas a tiempo 0.

En cada ensayo de proliferación se comprobó la expresión de la molécula CD154 murino, por citometría de flujo, en todas las líneas BW5147 empleadas. Igualmente, se determinó la pureza del proceso de purificación de linfocitos B primarios de ratón por citometría de flujo al marcar con anticuerpos monoclonales anti-IgM y anti-CD19 murinos.

3.10 Extracción de mRNA total, RT-PCR y PCR

La extracción de mRNA total se hizo mediante el método del Trizol (Life Technologies). De manera resumida, se lavan con PBS 10^6 de células, tras lo cual se realizan dos extracciones orgánicas consecutivas con trizol:cloroformo (1ml:200 μ l) y 0,5 ml de isopropanol, resuspendiendo la muestra con una pipeta lenta y cuidadosamente varias veces en cada una de ellas. El RNA es precipitado por centrifugación a 13000 rpm 10 min a 4°C, lavado con 1 ml de etanol al 75% y de nuevo centrifugado a 13000 rpm, tras lo que se resuspende en agua DEPC al incubar 10 min a 55-60°C en un termobloque.

Para realizar la retro-PCR (RT-PCR) se tomó 1 μ g de RNA de cada muestra y se incubó 10 min a 70°C en un termobloque. La retrotranscripción se lleva a cabo con el kit AMV Reverse Transcriptase (Promega) en un termociclador Digital Dry Bath LA-D1200Th (LabNet, Nueva Jersey, NJ, EE.UU.) con las condiciones (60 min 42°C, 5 min 95°C y 5 min 4°C).

La cuantificación relativa del mRNA de CD40LG se efectuó por qPCR tal y como se ha descrito previamente. Para la amplificación del cDNA de CD40LG de las líneas Jurkat transducidas con los vectores pSFFV-CD40LG, pCD40LG-CD40LG, pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP y pCD40LG-CD40L-IRES-eGFP se usaron los cebadores: F321 (5'CTGTGAGGAGATTAA AAGCCAGT3') y R514 (5'GGTGTAGTACCT TTTTCAGCCCA3'), que cubren una secuencia de 193 pb entre los exones 3 y 5 del CD40LG y bajo las condiciones [(2 min 50°C, 2 min 95°C;40X(20 seg 95°C, 30 seg 55°C)]; 10 min 4°C). Para la amplificación del cDNA de CD40LG de las líneas celulares N1, PH2 y PH3 se usaron, tanto para PCR, como para qPCR, los cebadores: F-Exón 2 CD40L (humano) (5'GATACAGAGATGCAACACAGGA3') y R-Exón 5 CD40L (humano)

(5'CCAGGGTTACCAAGTTGTTGCTCA3'), que cubren una secuencia de 260 pb entre los exones 2 y 5 del CD40LG y bajo las condiciones [(2 min 95°C, 40X(45 seg 95°C, 90 seg 55°C, 2 min 72°C), 10 min 72°C, 10 min 4°C)]. En todos los casos se normalizó el valor de mRNA de CD40LG con el gen control β -Actina humana y los datos se expresaron considerando como referencia a las células Jurkat no transducidas y no estimuladas.

Resultados

4. Resultados

4.1 Construcción de los plásmidos de transferencia

El objetivo principal del presente trabajo ha sido el de profundizar en el conocimiento y comprensión de los mecanismos moleculares que controlan y condicionan la expresión de CD40L, mediante las construcciones lentivirales diseñadas en nuestro laboratorio como herramientas de terapia génica, en varios modelos *in vitro* de HIGM1. Pretendemos entender mejor la idoneidad y efectividad de una estrategia en la que un fragmento del promotor endógeno de *CD40LG* dirija la expresión del gen terapéutico de forma precisa, dependiente de activación, transitoria y tejido-específica.

4.1.1 Plásmidos de transferencia lentivirales portadores del transgén *Cd40lg*

La secuencia de cDNA de *Cd40lg* murina se extiende 2,1 Kb e incluye un fragmento de 1,3 Kb del promotor endógeno del gen y sus cinco exones. Este fragmento, generado por síntesis génica (GENEART), estaba incluido en el plásmido 1024140_mouse_pCD40L-CD40L_pMS (pMSMouse).

Mediante digestión enzimática se extrajo el fragmento *pCd40lg-Cd40lg* y se introdujo en el esqueleto del plásmido de transferencia autoinactivable (SIN) pHR'SINcPPT-SEW (SEWP) (Demaison *et al.*, 2002) donde sustituyó la secuencia SFFV-eGFP-WPRE. El plásmido resultante fue el pCd40lg-Cd40lg (Fig. 4.1A).

Resultados

La contraparte de expresión constitutiva al pCd40lg-Cd40lg fue el denominado pSFFV-Cd40lg (Fig. 4.2A). El cDNA del gen *Cd40lg* (0,8 Kb) sin su promotor fue amplificada por PCR de alta fidelidad, subclonada en el plásmido de clonaje intermedio pGEM-T Easy e insertada en el esqueleto del plásmido SEWP, que esta vez conservó el promotor viral fuerte SFFV, donde sustituyó a la secuencia eGFP-WPRE.

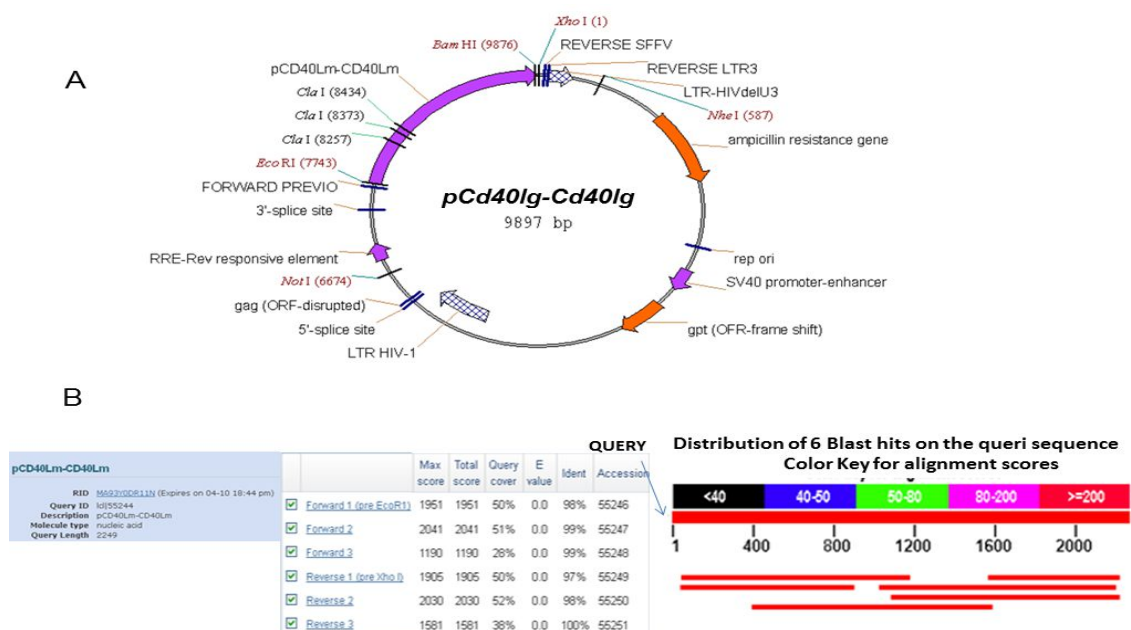


Figura 4.1 Mapa del plásmido portador de la secuencia *pCd40lg-Cd40lg* (A) y resultados de su secuenciación usando 3 pares de cebadores solapantes (B) usando la herramienta bioinformática Blast (Zhang *et al.*, 2000).

En ambos casos, por secuenciación con tres pares de cebadores cuyas regiones de amplificación se solapan, se aseguró la integridad de la secuencia nucleotídica completa del transgén (Fig. 4.1B y 4.2B).

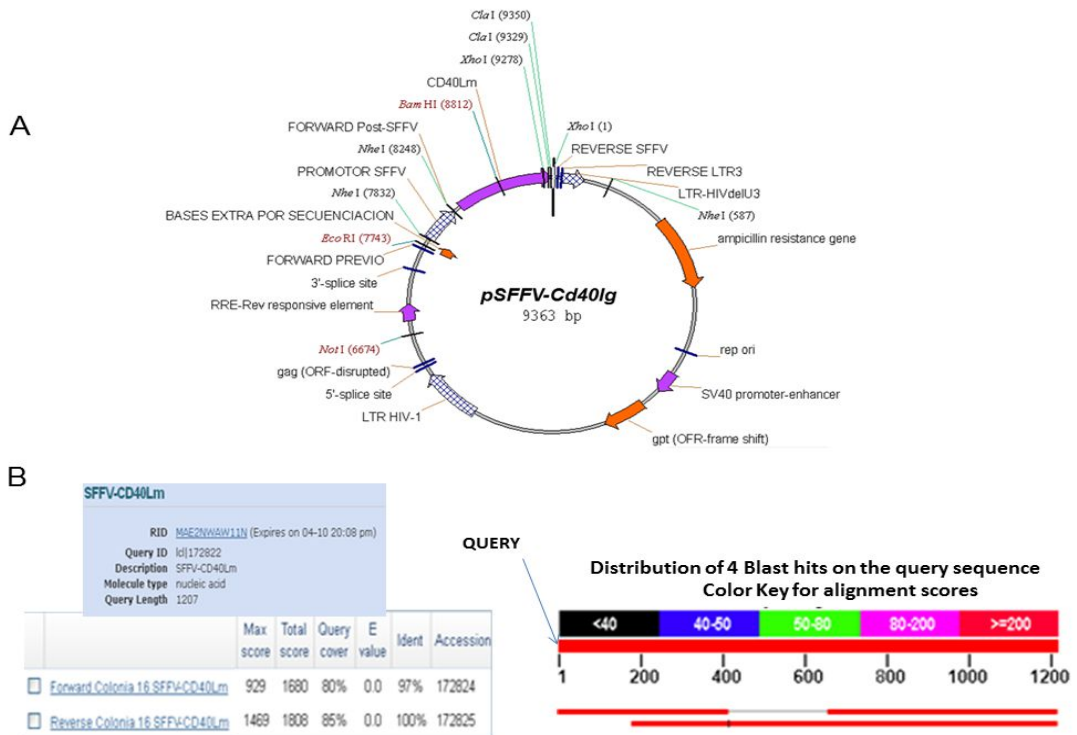


Figura 4.2. Mapa plasmídico del pSFFV-Cd40lg (A) y resultados de su secuenciación usando 1 pareja de cebadores solapantes (B) usando la herramienta bioinformática Blast (Zhang *et al.*, 2000).

4.1.2 Plásmidos de transferencia lentivirales portadores de CD40LG

En el caso de los plásmidos de transferencia con el cDNA completo codificante del *CD40LG* se han utilizado las construcciones lentivirales autoinactivables desarrolladas previamente en este laboratorio (Romero *et al.*, 2011): pSFFV-CD40LG y pCD40LG-CD40LG (Fig.4.3A y 4.3B). Estos plásmidos son equivalentes, pero con el minigén *CD40LG*, a las construcciones mostradas en las figuras 2 y 3, pues utilizan el mismo esqueleto plasmídico que aquellas. El promotor endógeno (1,3Kb) y el cDNA de *CD40LG* (0,8Kb) tienen un tamaño global de unas 2,2 Kb, muy parecido al caso del transgén *pCd40lg-Cd40lg*.

Resultados

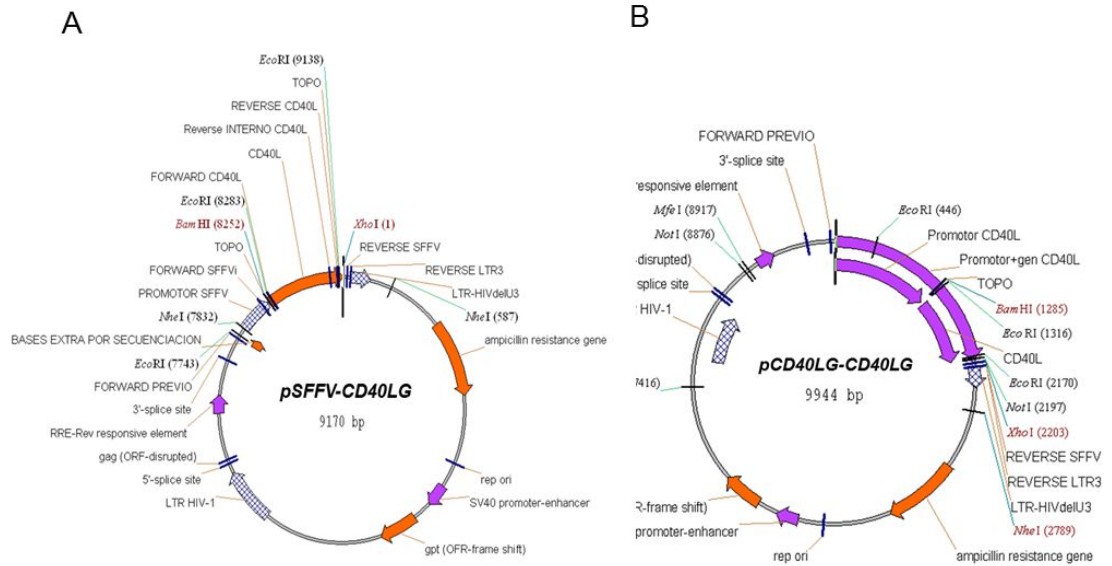


Figura 4.3 Mapas de los plásmidos SFFV-hCD40L (A) y hpCD40L-CD40L (B).

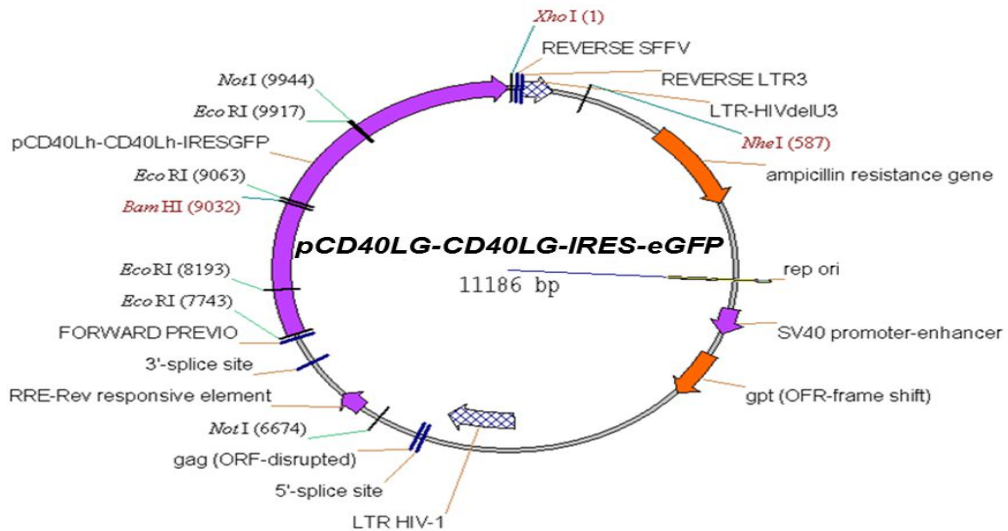


Figura 4.4 Mapa del plásmido pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP.

A partir del plásmido pCD40LG-CD40LG (Fig. 4.3B) se procedió a desarrollar otra construcción lentiviral SIN de naturaleza bicistónica abriéndolo por digestión enzimática con *XhoI*. La secuencia IRES-eGFP de otro plásmido

denominado SQ4 fue ligada al esqueleto abierto del plásmido pCD40LG-CD40LG. El resultado fue el plásmido pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP (Fig.4.4B) que cuenta con el minigén *CD40LG* y con la secuencia IRES-eGFP.

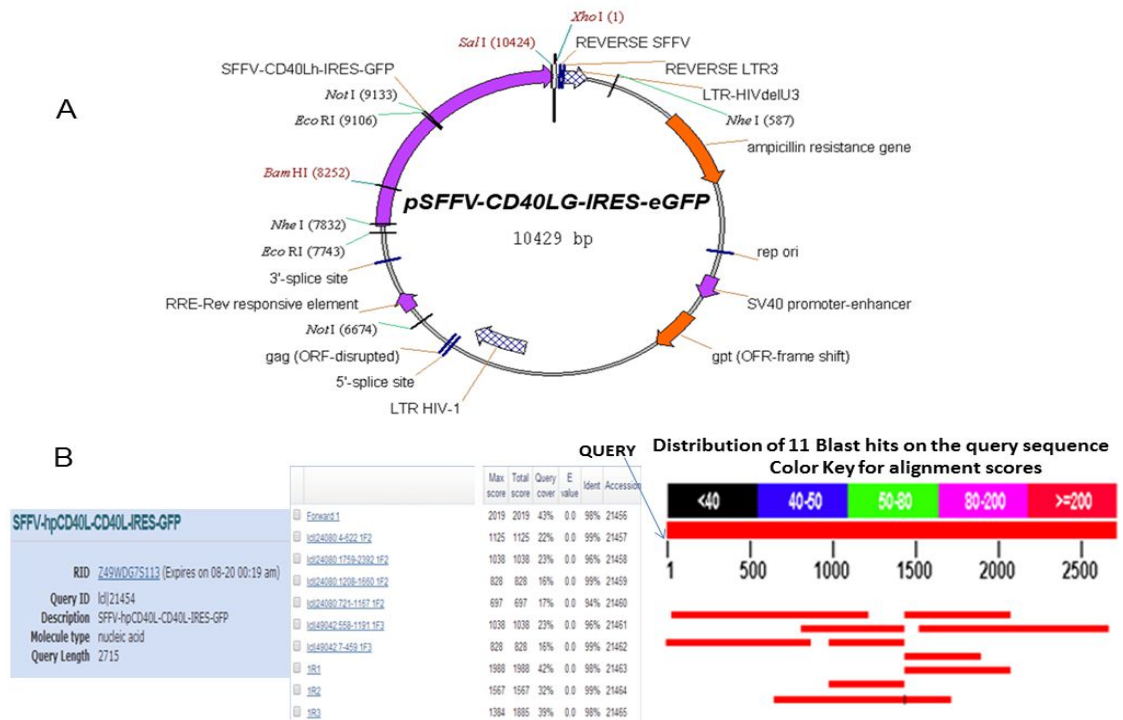


Figura 4.5 Mapa del plásmido pSFFV-CD40LG–IRES-eGFP (A) y su análisis por secuenciación con 3 pares de cebadores cuyas regiones de amplificación se solapan (B).

La última construcción que se efectuó fue la del plásmido de bicistrónico pSFFV-CD40LG–IRES-eGFP. El procedimiento a seguir fue similar al que se llevó a cabo en la construcción de pSFFV-Cd40lg. La secuencia CD40LG–IRES-eGFP fue amplificada sin el promotor de *CD40LG* a partir del plásmido pCD40LG-CD40LG (Fig4.3B), subclonada en el vector pGEM-T Easy y posteriormente escindida, purificada y ligada al esqueleto abierto del plásmido SEWP, que en esta ocasión conservó el promotor viral fuerte pSFFV para dirigir la

Resultados

expresión de la construcción, dando lugar al plásmido SIN pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP (Fig.4.5A). Tanto en el caso del pCD40LG-CD40LG (datos no mostrados), como del pCD40LG-CD40LG -IRES-eGFP (Fig.4.5B) se comprobó la integridad y orientación de las construcciones mediante análisis por secuenciación con tres parejas de cebadores solapantes.

Las construcciones lentivirales empleadas a lo largo de esta tesis doctoral para estudiar la aplicación su aplicación como herramienta terapéutica para HIGM1 han sido, por tanto, las siguientes (Fig.4.6):

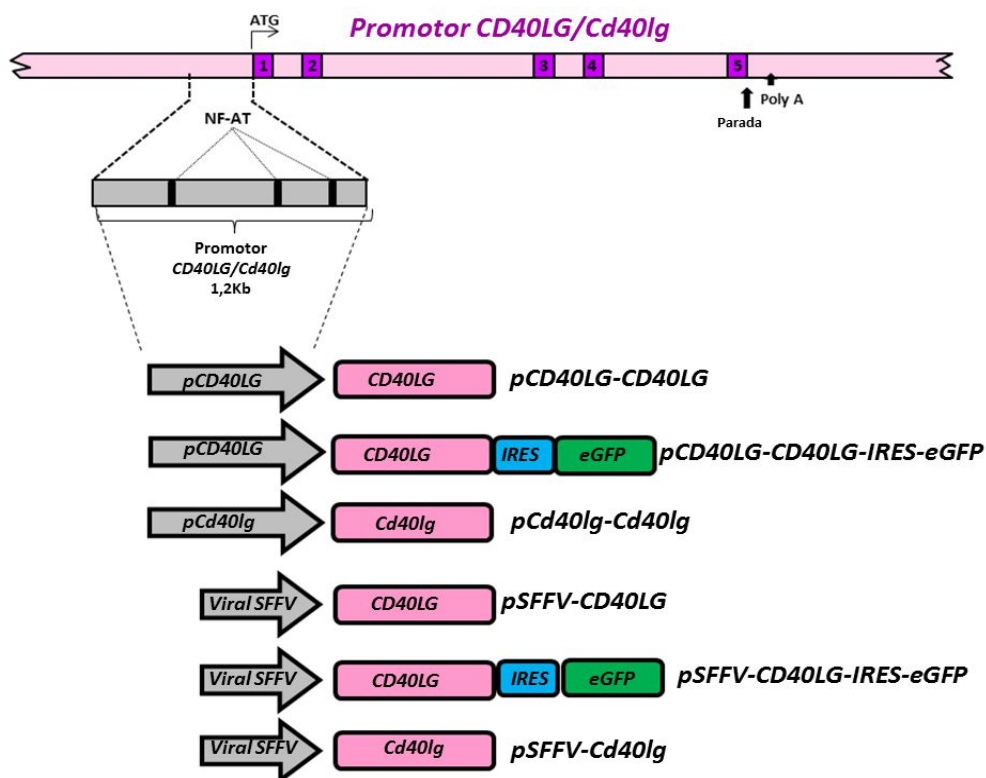


Figura 4.6. Construcciones lentivirales utilizadas como herramientas para terapia génica en HIGM1.

4.2 Efecto de la transducción de líneas celulares T con los vectores pCD40LG-CD40LG y pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP

La eficacia de una posible terapia génica para el Síndrome de Híper IgM ligado al cromosoma X (HIGM1) basada en el uso de vectores lentivirales autoinactivables (SIN), dirigidos por el promotor endógeno de CD40LG pasa en primer lugar por su comprobación en modelos *in vitro* con células humanas. Los vectores pCD40LG-CD40LG y pSFFV-CD40LG (Fig.4.3A y 4.3B) fueron desarrollados en nuestro laboratorio hace algunos años (Romero *et al.*, 2011).

4.2.1 La transducción de células Jurkat CD154⁻ con vectores lentivirales SIN pCD40LG-CD40LG y pSFFV-CD40LG dan lugar a una expresión discreta de la proteína en la superficie celular

Como primera aproximación a la transducción de células T humanas se seleccionó una línea celular Jurkat CD154⁻ que presenta niveles detectables de mRNA de *CD40LG*, pero no así proteína CD154 en la superficie celular de sus células, ni tan siquiera después de estimularlas con PMA e ionomicina (Io). Las células fueron transducidas con los vectores pCD40LG-CD40LG y pSFFV-CD40LG con una *Multiplicity of Infection* (MOI) de 100 (100 partículas virales por célula). El éxito de la transducción se comprobó mediante qPCR sobre DNA genómico al amplificar secuencias específicas del vector, obteniendo un número de inserciones del vector/célula (cc) de 0,94 cc en el caso del pCD40LG-CD40LG y 1,48 cc para el pSFFV-CD40LG. Las células T humanas tienen una cinética de estimulación muy parecida a la de los linfocitos T de ratón, alcanzando su pico de expresión máxima a las 6-8 h tras su estimulación con PMA+Io (Casamayor-Pelleja *et al.*, 1995). Por otra parte, otros trabajos indican que los linfocitos T

Resultados

humanos tienen una cinética de expresión de CD154 algo más lenta, en un periodo de 8-12 h (Graf *et al.*, 1995). Finalmente hemos considerado las observaciones que nuestro grupo de investigación ha realizado en trabajos previos, donde la máxima expresión de CD154 queda situada a las 20 h tras la activación con PMA+Io (Romero *et al.*, 2011). Por tanto, las células Jurkat fueron estimuladas con PMA+Io a dos tiempos distintos: 8 h y 20 h. Sin embargo, a lo largo de nuestra investigación no se han hallado diferencias significativas entre ambos tiempos en la expresión de proteína CD154, por lo que mostramos sólo aquellas citometrías correspondientes a una estimulación celular de 20 h. Así pues, las células fueron estimuladas en estas condiciones con PMA+Io, tras lo cual se comprobaron sus niveles de expresión de CD154 en su superficie mediante citometría de flujo (Fig.4.7A). Las células Jurkat transducidas con el vector de expresión constitutiva (pSFFV-CD40LG) expresan CD154 independientemente de su estimulación, mientras que las células transducidas con el vector dirigido por el promotor endógeno de CD40LG (pCD40LG-CD40LG) no muestran niveles detectables de la proteína ni siquiera tras su estimulación con PMA+Io.

Para determinar si estos bajos niveles de proteína pudieran estar relacionados con una pobre tasa de transcripción del mRNA de *CD40LG*, se procedió a realizar una extracción de mRNA total y se cuantificó el nivel del mRNA de *CD40LG* por qPCR, usando como referencia las células Jurkat no transducidas y no estimuladas (Fig.4.7B), que como se ha señalado, expresan cantidades detectables de mRNA a pesar de no traducirse a proteína. En las tres líneas Jurkat las células estimuladas presentan niveles mayores de mRNA que las no estimuladas (en un rango que oscila entre 2 y 10 veces más). Igualmente se puede comprobar que las células transducidas muestran niveles más altos de mRNA que las no transducidas (entre 10^3 y 10^4 veces), siendo las células transducidas con el vector pSFFV-CD40LG las que más expresan de todas ellas

(alrededor de 10 veces más que las células transducidas con el vector regulado pCD40LG-CD40LG). Por tanto, en las células Jurkat transducidas con el vector regulado pCD40LG-CD40LG se detecta mRNA proveniente de la transcripción de *CD40LG*, pero no proteína CD154 en su superficie celular.

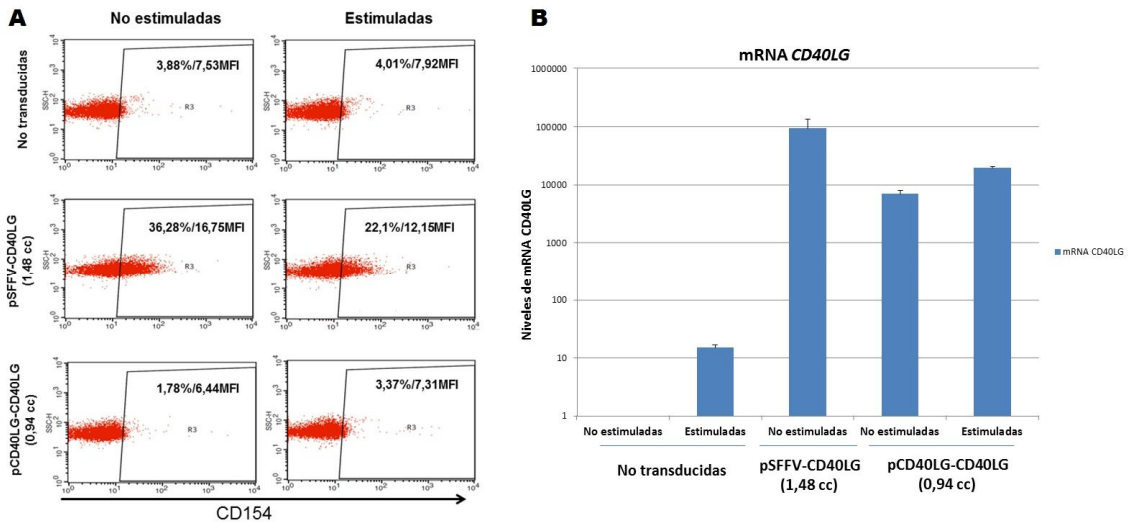


Figura 4.7 Las células Jurkat transducidas con vectores lentivirales muestran una expresión mínima de CD154 a pesar de contar con una alta tasa de transcripción de mRNA. A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD154 en células Jurkat CD154⁻ no transducidas (paneles superiores), transducidas con el vector constitutivo pSFFV-CD40LG (paneles centrales) y transducidas con el vector regulado pCD40LG-CD40LG (paneles inferiores) no estimuladas o estimuladas 20 h con PMA+Io. El número de inserciones/célula (cc) se refleja en cada caso en la esquina superior izquierda y a la derecha aparece el porcentaje de células CD154⁺ y la intensidad relativa de la población completa (MFI). B) Cuantificación relativa del mRNA del minigén *CD40LG* por qPCR usando células Jurkat no transducidas y no estimuladas como referencia.

4.3 Efecto de la transducción de líneas celulares T con los vectores bicistrónicos pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP y pSFFV-CD40LG - IRES-eGFP

Trabajos previos han descrito que los vectores lentivirales no tienen tendencia a integrarse cerca de regiones susceptibles al silenciamiento y aquellos en los que se describe que puedan ser silenciados por procesos de metilación de transgenes entregados por vectores SIN son escasos y poco frecuentes (revisado por Kildebeck *et al.*, 2012). Sin embargo, consideramos la posibilidad de que los bajos niveles de expresión de CD154, especialmente en células Jurkat transducidas con el vector pCD40LG-CD40LG, estuvieran sujetos a algún proceso de silenciamiento. Para analizar esta posibilidad se procedió al tratamiento de estas células con decitabine, un inhibidor de la metilación, que no provocó cambios significativos en los niveles de mRNA de *CD40LG* con respecto a las células no tratadas (datos no mostrados).

Como ya se ha mencionado, la expresión de CD40LG se encuentra fuertemente regulada tanto transcripcional como post-transcripcionalmente. Para determinar si las células habían sido eficazmente transducidas, y por tanto, si la baja expresión de CD154 se debía a la existencia de algún impedimento en la expresión del transgén que justificara sus bajos o nulos niveles detectados, se diseñaron dos construcciones de carácter bicistrónico que incluían la secuencia de eGFP para que actuara como gen reportero. Estas construcciones contaban con el promotor viral fuerte SFFV o con el promotor endógeno de CD40LG, las secuencias de cDNA *CD40LG*, la secuencia IRES para la entrada de lectura interna ribosomal y el gen eGFP (*pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP* y *pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP*). Se optó por esta estrategia porque la detección de la proteína fluorescente eGFP permite una fácil monitorización de la expresión del

trangén. En tanto que se trata de una construcción bicistrónica, la presencia de dicha proteína fluorescente en el citosol de las células transducidas implicaría forzosamente la transcripción del trangén eGFP y si éste se transcribiera también lo haría el transgén CD40LG, incluso si no hubiera traducción de CD154.

4.3.1 Los fibroblastos 293T transducidos con los vectores biscistrónicos pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP y pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP muestran altos niveles de fluorescencia independientemente del promotor que dirija el cassette de expresión

Las células humanas 293T fueron empleadas como células empaquetadoras de todos los vectores virales empleados en este trabajo. La cotransfección de estas células con los vectores biscistrónicos pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP y pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP, el plásmido empaquetador y el de envoltura, nos permitió observar la evolución de la expresión del gen marcador eGFP con suma facilidad a lo largo del proceso, tanto por microscopía de fluorescencia (datos no mostrados) como por citometría (Fig. 4.8).

Entre los tres y seis días post-transfección se pudieron detectar por citometría altos niveles de las proteínas codificadas por los transgenes, al margen de estimulación o de regulación alguna de los promotores, debido a una expresión transgénica de origen episomal, es decir, no integrativo. No obstante, cada mitosis celular diluye el número de episomas entre la creciente población celular hasta que desaparece por completo, lo que provoca que la expresión de la proteína terapéutica o marcadora sea sólo dependiente de la integración del vector y del carácter regulatorio del promotor.

Resultados

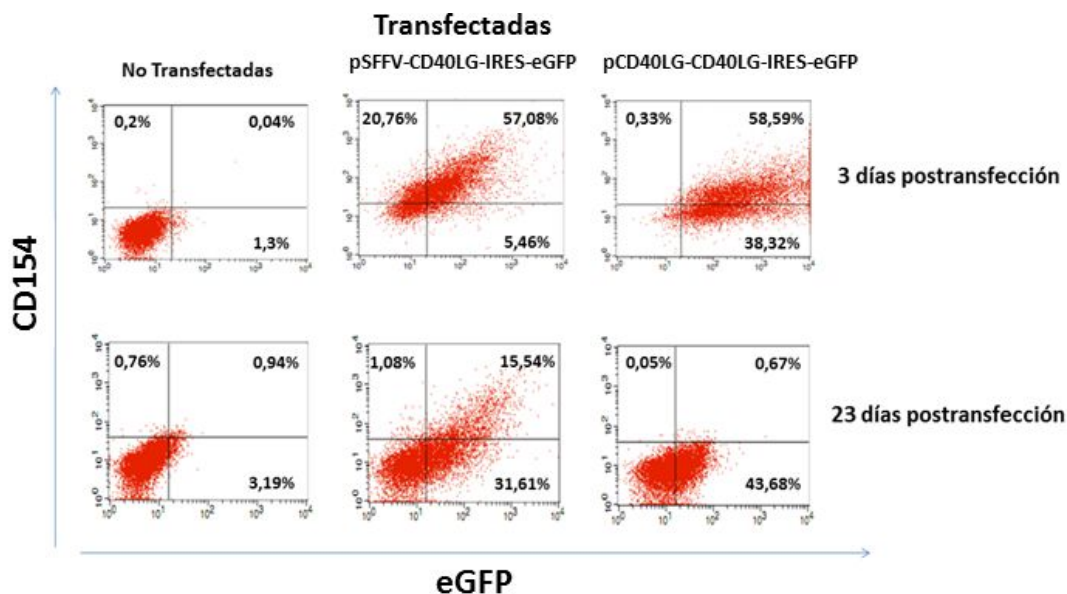


Figura 4.8 Seguimiento en el tiempo de células empaquetadoras 293T transfectadas con los vectores lentivirales bicistrónicos regulado y constitutivo. Análisis de la expresión por citometría de flujo de CD154 humano y eGFP en células 293 T transfectadas con los vectores bicistrónicos pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP (paneles centrales) y pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP (paneles de la derecha) a los 3 y a los 23 días (paneles superiores e inferiores respectivamente).

De este modo, las células productoras de los vectores bicistrónicos expresaron a los tres días de la transfección altos niveles de proteínas CD154 y eGFP casi por igual (Fig.4.8, fila superior). Sin embargo, a los 23 días las mismas células sólo expresaron CD154 constitutivamente, y de forma más moderada, en el caso de las transducidas con el vector pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP, pero no con el vector regulado pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP (Fig.4.8, fila inferior).

Cuando las células 293T fueron transducidas, en lugar de transfectadas, con los vectores lentivirales bicistrónicos, la expresión constitutiva del CD154 quedó restringida en todo momento al vector constitutivo pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP (Fig.4.9, fila superior). Por el contrario, la proteína marcadora eGFP se expresó constitutivamente en todo momento, tanto en las transfecciones como en

las transducciones, e independientemente del carácter regulador del promotor empleado, aunque se moderó ligeramente al superar el tercer día días post-transfección (Fig. 4.8 y 4.9). Esto mismo ya sucedió con vectores pWASP-eGFP o pCD40LG-eGFP (Romero *et al.*, 2011), donde los promotores usados tampoco pudieron regular el gen eGFP. Esta desregulación también pudo apreciarse por microscopía de fluorescencia en células 293T transducidas con los vectores bicistrónicos pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP y pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP (datos no mostrados).

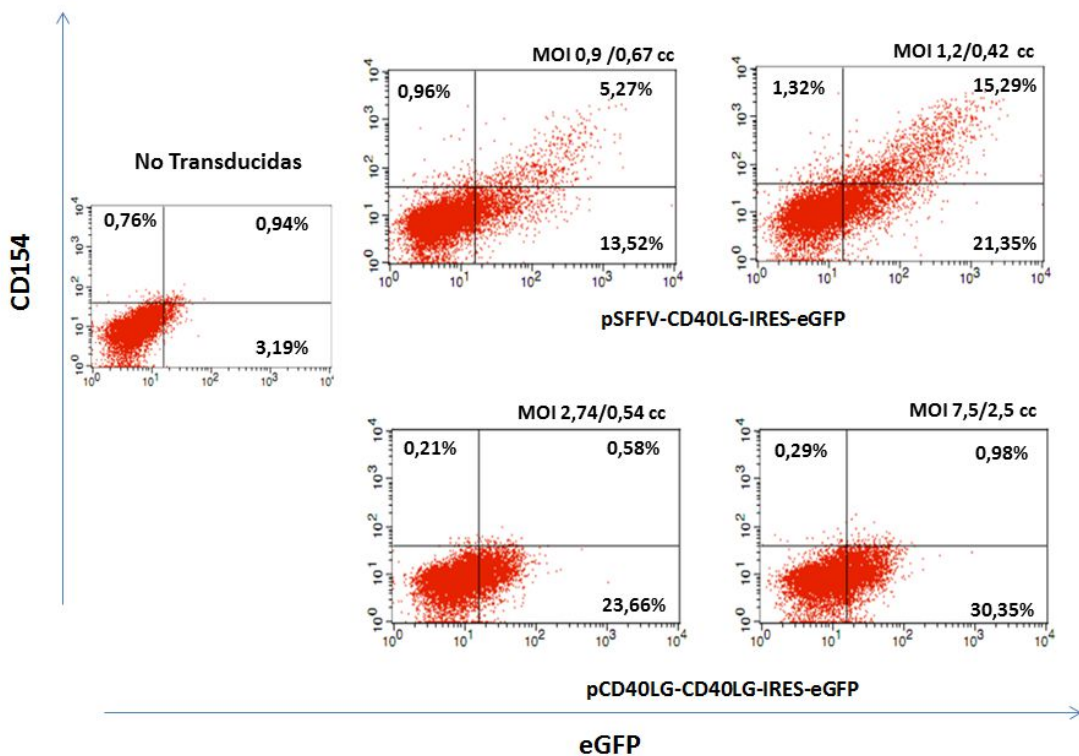


Figura 4.9 Expresión de CD154 en células empaquetadoras 293T transducidas con los vectores lentivirales de carácter bicistrónico regulado y constitutivo. Análisis de la expresión por citometría de flujo de CD154 humano y eGFP en células 293T transducidas con los vectores bicistrónicos pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP (paneles superiores) y pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP (paneles inferiores) 10 días post-transducción. La MOI empleada y el número de integraciones/célula se muestran sobre cada muestra.

4.3.2 El transgén eGFP muestra una expresión proteínica muy potente en células Jurkat transducidas con las construcciones bicistrónicas

Las células Jurkat fueron transducidas con el vector pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP con dos MOI distintos para observar el efecto relativo causado por el aumento del número de integraciones por célula. Las células Jurkat transducidas con el vector lentiviral a un MOI de 0,94 registraron 0,32 cc lo que dio lugar a un 7% de células CD154⁺ y un 25% eGFP⁺ (Fig.4.10A, panel izquierdo, fila central). Las células Jurkat con casi el doble de inserciones, 0,7 cc (MOI=4,7), presentaron un 24% de su población que expresó CD154 en estado de reposo, mientras que el eGFP fue expresado por un 47% de la población celular (Fig.4.10B, panel izquierdo, fila central). Posteriormente se realizó un enriquecimiento mediante separación por citometría de flujo sobre las células eGFP⁺ de ambas líneas, dando lugar a líneas celulares Jurkat transducidas con el vector pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP con 0,9 cc y 1,46 cc respectivamente. Ambas mantuvieron un 7% y un 26% de expresión de CD154 respectivamente, pero aumentaron a un 46% y un 62% el porcentaje de células eGFP⁺ en cada caso (Fig.4.10A y 4.10B paneles derechos). Se trató de aumentar el porcentaje de células CD154⁺ en la población por un nuevo enriquecimiento mediante separación por citometría de flujo, realizado sobre las últimas líneas Jurkat mencionadas. Las líneas celulares resultantes contaron con 1,1 cc y 1,6 cc respectivamente y se caracterizaron por presentar sólo un 9% y un 32% de la población CD154⁺ en cada caso, a pesar de los enriquecimientos llevados a cabo. Por otro lado, esas dos últimas líneas celulares expresaron un 67% (en la línea con 1,1 cc) y un 63% (en la línea 1,6 cc) de eGFP⁺ en cada caso.

Resultados

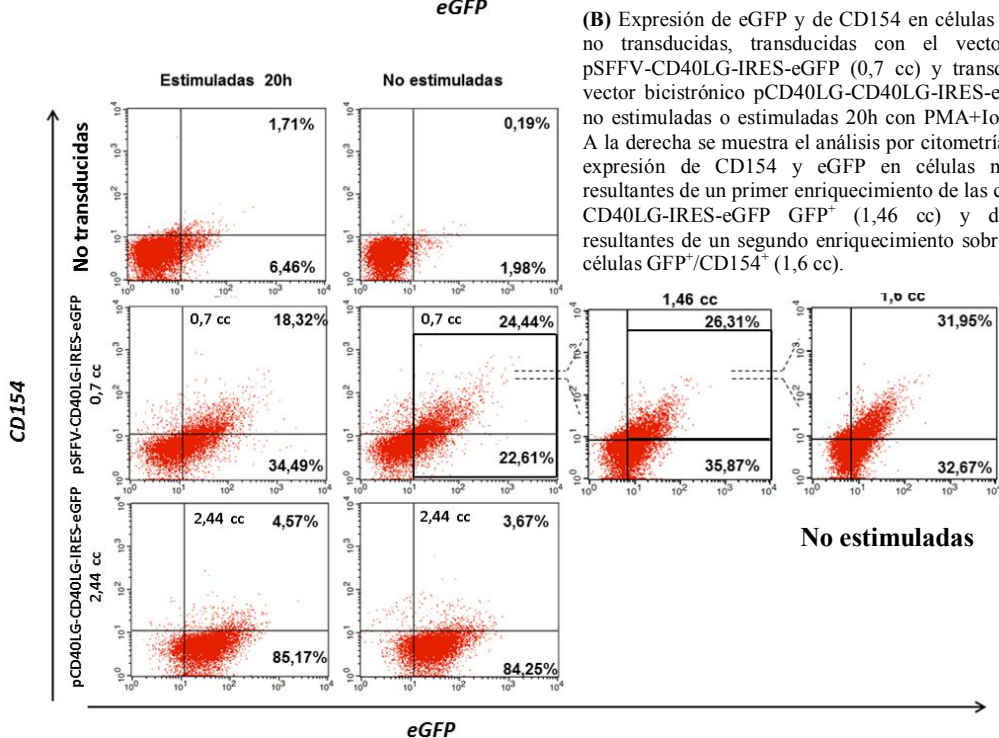
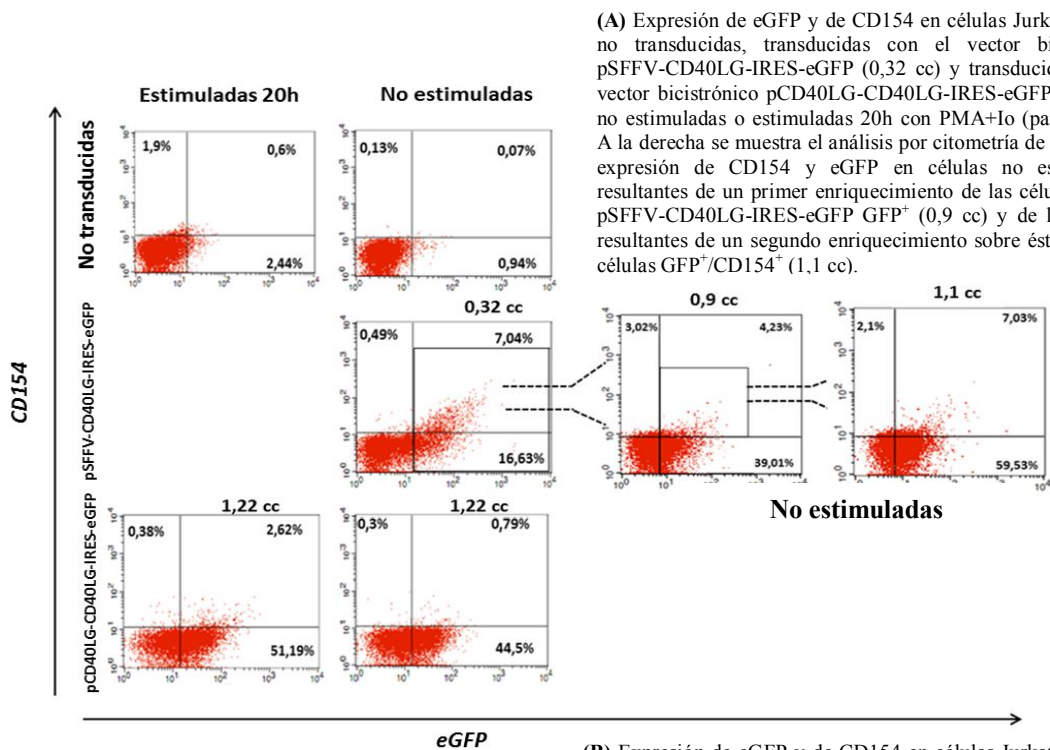


Figura 4.10 Expresión superficial de CD154 defectuosa en células Jurkat transducidas con los vectores bicistrónicos constitutivo pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP y regulado pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP. Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD154 y GFP en distintas líneas de células Jurkat resultantes de su transducción con los vectores bicistrónicos pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP y pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP.

Resultados

Las células Jurkat transducidas con el vector bicistrónico de carácter regulado, pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP, igualmente fueron subdivididas en dos líneas, aquellas transducidas con una MOI de 6 y que tienen 1,12 cc, y las células que tienen 2,44 cc (MOI=30). Tal y como sucedió con los vectores pSFFV-CD40LG y pCD40LG-CD40LG, los niveles de expresión celular de CD154 (Fig.4.10A y 4.10B panel izquierdo, filas inferiores) en ambos casos siguieron siendo muy bajos, independientemente de su estimulación con PMA+Io.

4.3.3 Las células Jurkat transducidas con el vector pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP expresan CD154 intracitoplasmático tras su estimulación

La ausencia de CD154 en la superficie de células Jurkat transducidas con el vector regulado pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP estimuladas contrastó notablemente con los altos niveles de mRNA transgénicos y la cantidad de eGFP proteínico detectados. Por este motivo consideramos la posibilidad de que el CD154 transgénico pudiera estar siendo traducido, pero no exportado a la superficie celular como consecuencia de algún tipo de bloqueo en su proceso de transporte, en cuyo caso podría estar acumulándose en el citosol o en algún compartimento intracelular. Para determinar si esta hipótesis estaba fundada, se realizaron una serie de citometrías intracelulares (Fig.4.11 panel izquierdo, fila inferior) sobre las diferentes líneas Jurkat transducidas con los vectores bicistrónicos.

Estos ensayos permitieron detectar proteína CD154, si bien de forma muy discreta (16%), en el citoplasma de células Jurkat transducidas con el vector regulado pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP (2,44 cc) estimuladas, pero no así en

estado de reposo. Ahora bien, cuando el número de inserciones en la línea de células Jurkat transducidas con el vector constitutivo pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP ascendió hasta 1,6 cc, el porcentaje de células doble positivas CD154⁺/eGFP⁺ se incrementó de un 22% extracelularmente a un 34% intracelularmente (Fig.4.11, cuarta columna).

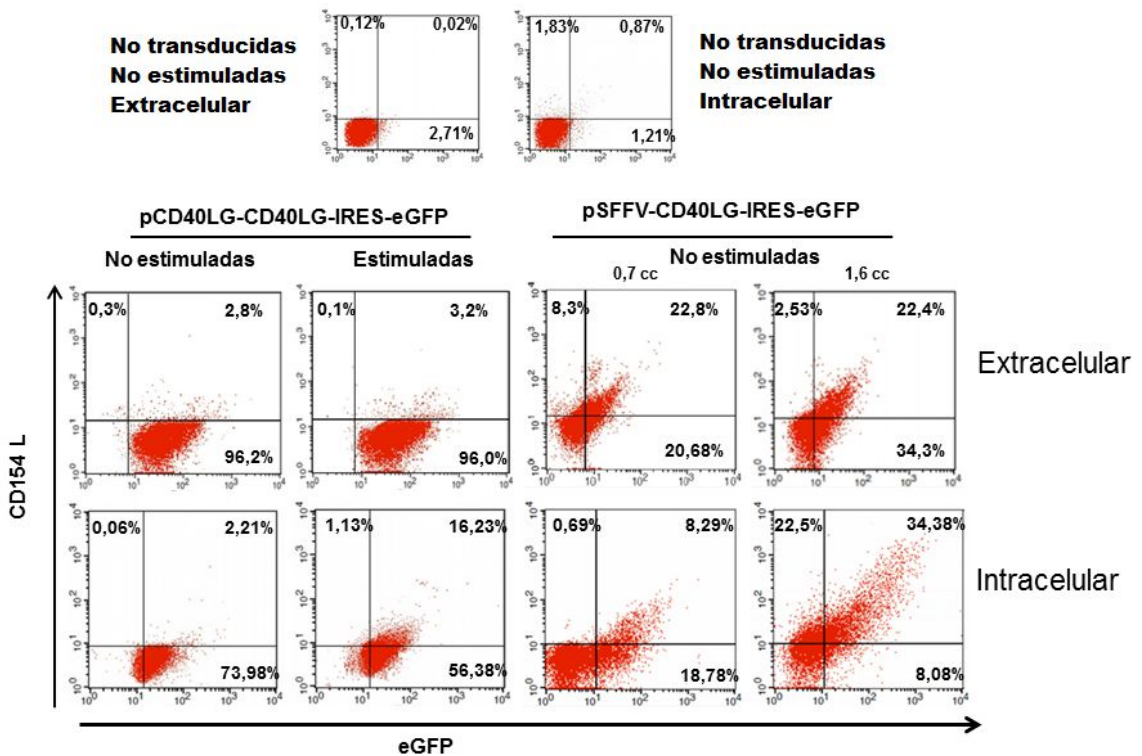


Figura 4.11 La proteína CD154 se acumula eficientemente en el citoplasma de células transducidas con los vectores lentivirales bicistrónicos, pero no en la superficie celular. Análisis por citometría de flujo de la expresión intra y extracitoplasmática de CD154 y eGFP en distintas líneas de células Jurkat resultantes de su transducción con los vectores bicistrónicos pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP y pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP. La fila superior muestra las células Jurkat control no transducidas. El panel izquierdo muestra los perfiles de expresión extracelular e intracelular de CD154 y eGFP en células Jurkat pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP (2,44 cc). El panel derecho muestra los patrones de expresión intracelular y extracelular de las células Jurkat pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP (0,77 cc y 1,6 cc).

4.4 La transducción eficiente de linfocitos primarios de pacientes de HIGM1 no logra la reconstitución de los niveles de expresión de CD154 dependientes de activación

Para determinar la eficacia de la terapia génica con vectores lentivirales sobre un modelo de HIGM1 más fisiológico, decidimos probar nuestras construcciones sobre linfocitos T primarios CD4⁺ de sangre periférica de pacientes de HIGM1. El paciente PH2 posee una mutación en la posición +5 del intrón 3 (IV3+5 g/a) del gen *CD40LG* y no presenta niveles detectables de CD154 en su superficie celular. Por su parte, el paciente PH3 tiene una mutación (Q174R) con niveles moderados de CD154 que, sin embargo, son funcionalmente defectuosos para su interacción con CD40. Las células PH2 fueron transducidas con el vector regulado pCD40LG-CD40LG (MOI=16) y posteriormente estimuladas con PMA+Io durante 20 h.

Los análisis por citometría de flujo indicaron que la transducción no logró restaurar la expresión de CD154 en células de paciente de HIGM1 (Fig.4.12A), valores que contrastan con los niveles alcanzados por los linfocitos T CD4⁺ primarios de sangre periférica de un donante sano (N1, datos no mostrados). El análisis por RT-PCR del mRNA total (Fig.4.12B) desveló la presencia de un patrón distinto de bandas en las células de paciente con respecto a los controles N1 y Jurkat no transducidas, lo que sugiere la existencia de distintos transcritos de mRNA de CD40LG. Más aún, las células de paciente transducidas con el vector pCD40LG-CD40LG muestran una tercera banda intermedia al ser estimuladas con PMA+Io, virtualmente atribuible a la expresión del transgén. La extracción y purificación, a partir del gel, de las tres bandas señaladas en las células PH2 TD⁺ permitió realizar un estudio diferencial por secuenciación de los transcritos

(Fig.4.12C), en el que la banda más pequeña (200 pb) es un transcrito al que le falta el exón 3.

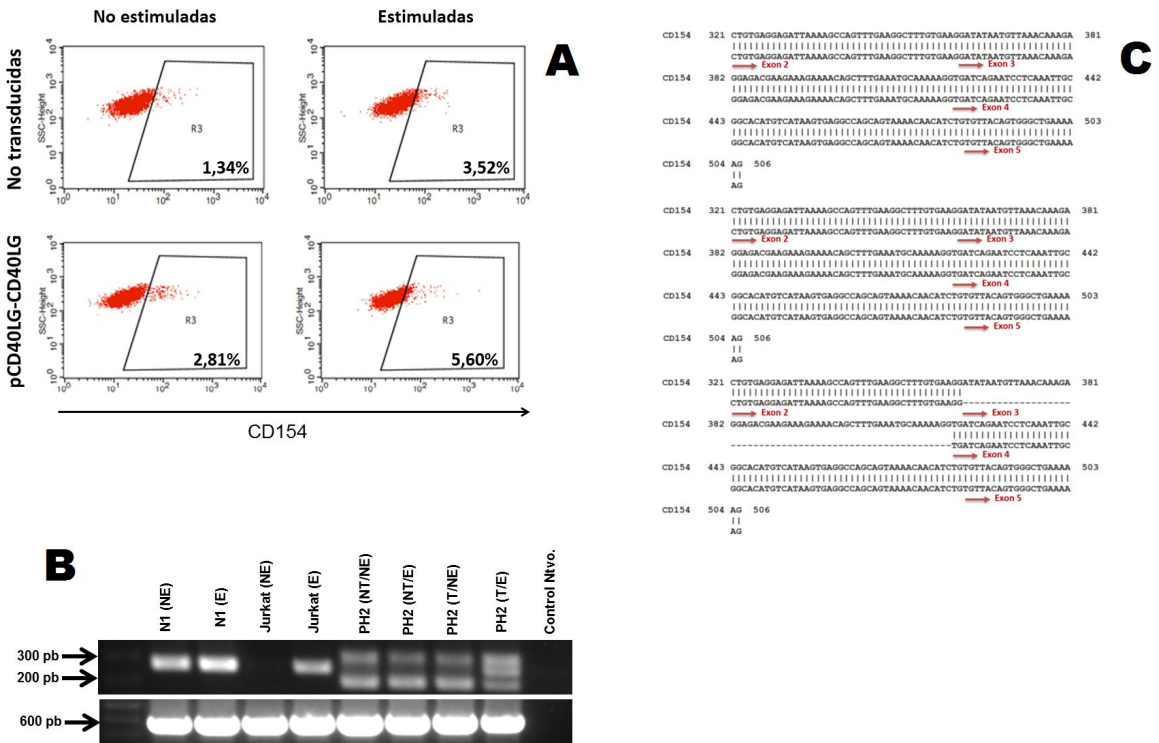


Figura 4.12 Expresión defectuosa de CD154 en la superficie de células T derivadas de un paciente de HIGM1 transducidas con el vector lentiviral de expresión regulada. A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD154 en linfocitos de paciente no transducidos (arriba) y transducidas con el vector pCD40LG-CD40LG (abajo). B) RT-PCR del mRNA de CD40LG en linfocitos T no estimulados (-) o 20h estimulados con PMA+Io (+) de un donante sano (N1), células Jurkat CD154⁺, linfocitos del paciente no transducidos (PH2) y transducidas con el vector pCD40LG-CD40LG (PH2TD). C) Secuenciación de las 3 bandas del mRNA de CD40LG observadas en las células PH2 transducidas y 20h estimuladas con PMA+Io (PH2TD⁺).

Sin embargo, las dos bandas de mayor tamaño (250 y 300 pb respectivamente) contienen exactamente la misma secuencia, incluyendo los cinco exones completos de CD40LG, pero notoriamente conservan un patrón migratorio distinto.

Resultados

En lo que refiere a las células obtenidas de un paciente HIGM1 transducidas con el vector constitutivo pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP (MOI=4,7) o con el regulado pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP (MOI=30), se logró una mayor eficacia en la transferencia génica en las células transducidas en estado de reposo (Fig.4.13A) que en las transducidas en su fase de crecimiento (Fig.4.13B), dado que el porcentaje de células eGFP⁺ en el primer caso fue de un 35-45% frente a un 10-15% en el segundo. En ambos casos, estas citometrías de flujo fueron realizadas cinco días post-transducción.

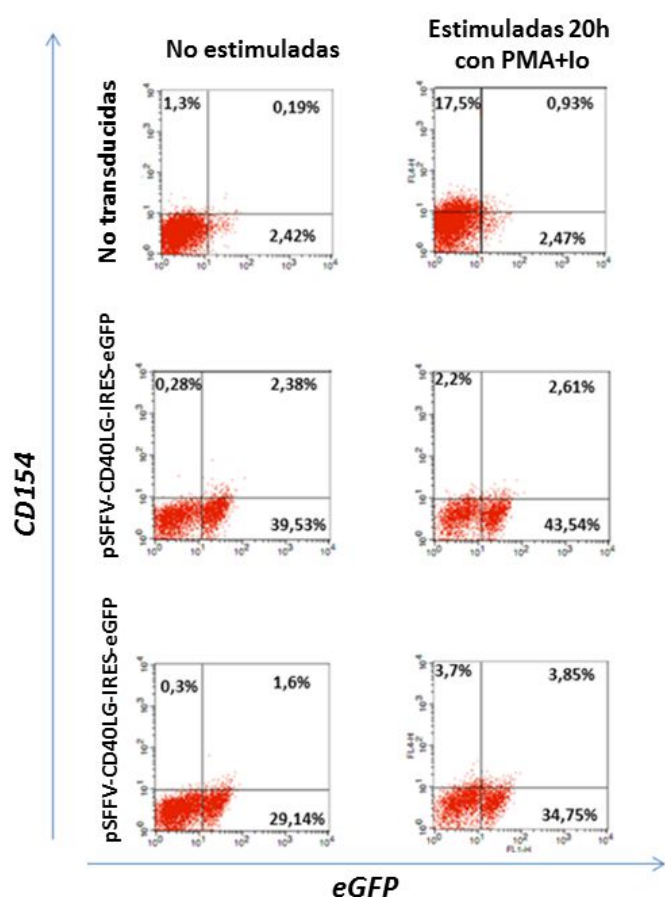


Figura 4.13 Expresión defectuosa de CD154 en la superficie de células T derivadas de un paciente de HIGM1 transducidas con los vectores bicistrónicos constitutivo pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP y regulado pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP. Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD154 y eGFP en células de paciente cinco días post-transducción. Células no transducidas o transducidas en reposo con el vector bicistrónico constitutivo pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP (MOI 4,7) y con el vector bicistrónico regulado pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP (MOI 30) no estimuladas o estimuladas 20h con PMA+Io.

El análisis por citometría de flujo de las células transducidas en reposo evidenció que las células procedentes de un paciente HIGM1 no transducidas presentan, bajo estimulación, un discreto 17,5% de células CD154⁺ (Fig.4.13A, fila superior). No obstante, al ser transducidas, esos niveles de CD154 desaparecieron, distinguiéndose con claridad dos poblaciones perfectamente definidas por la expresión del 40% y 30% eGFP⁺ respectivamente (Fig.4.13A, filas central e inferior). Por el contrario, cuando estas mismas células se encontraron en proliferación, las no transducidas mostraron tras su estimulación un 50% CD154⁺ en su superficie celular (Fig.4.13B, fila superior), en contraposición al 17% de las células no transducidas en reposo.

4.5 Altos niveles de mRNA de CD40LG no aseguran la expresión de la proteína en la superficie celular de linfocitos T transducidos con los vectores lentivirales

Para determinar si la baja expresión de proteína CD154 en células Jurkat y en líneas celulares de pacientes de HIGM1 transducidas con los vectores bicistrónicos estaba relacionada con una baja tasa de transcripción se realizó una determinación de los niveles de mRNA total mediante una PCR cuantitativa de cada tipo celular (Fig.4.14 y 4.15).

Las células Jurkat no transducidas y no estimuladas fueron empleadas como referencia para las demás líneas. Las células Jurkat no transducidas estimuladas presentaron mayores niveles de mRNA *CD40LG* respecto a las no estimuladas, algo que se repitió en todos los tipos celulares. Igualmente, todas las

Resultados

líneas transducidas mostraron niveles más altos de mRNA que sus contrapartes no transducidas (Fig. 4.14, 4.15 y 4.16).

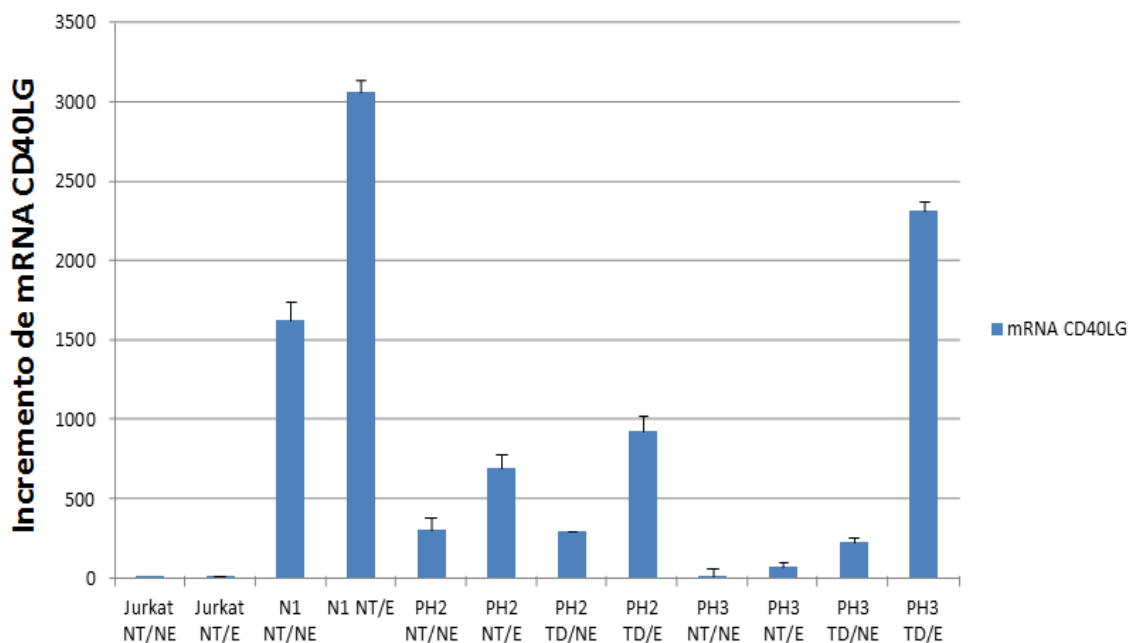


Figura 4.14 Las células Jurkat transducidas con los vectores lentivirales bicistrónicos muestran una alta tasa de transcripción de *CD40LG*. Cuantificación relativa del mRNA de CD40LG por qPCR de las células: Jurkat CD154⁻: no transducidas; transducidas con el vector bicistrónico regulado pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP; transducidas con el vector bicistrónico constitutivo pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP no estimuladas y estimuladas 20h con PMA+Io. Resultados normalizados respecto a los valores de mRNA de las células Jurkat no transducidas y no estimuladas. Entre paréntesis aparece el número de integraciones por célula (cc), que correlaciona con los niveles de expresión de mRNA.

Con respecto a sus controles, la cantidad de mRNA aumentó de manera significativa en las células de paciente PH3 TD⁺ (estimuladas) (Fig.4.15) y aún más en cualquiera de las líneas Jurkat transducidas con las construcciones bicistrónicas (Fig.4.14). De manera general, se puede considerar que las líneas con mayor número de inserciones están asociadas a mayores niveles de mRNA y que el vector bicistrónico de expresión constitutiva (pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP)

obtiene niveles superiores de mRNA que su equivalente de expresión regulada (pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP) (Fig.4.16).

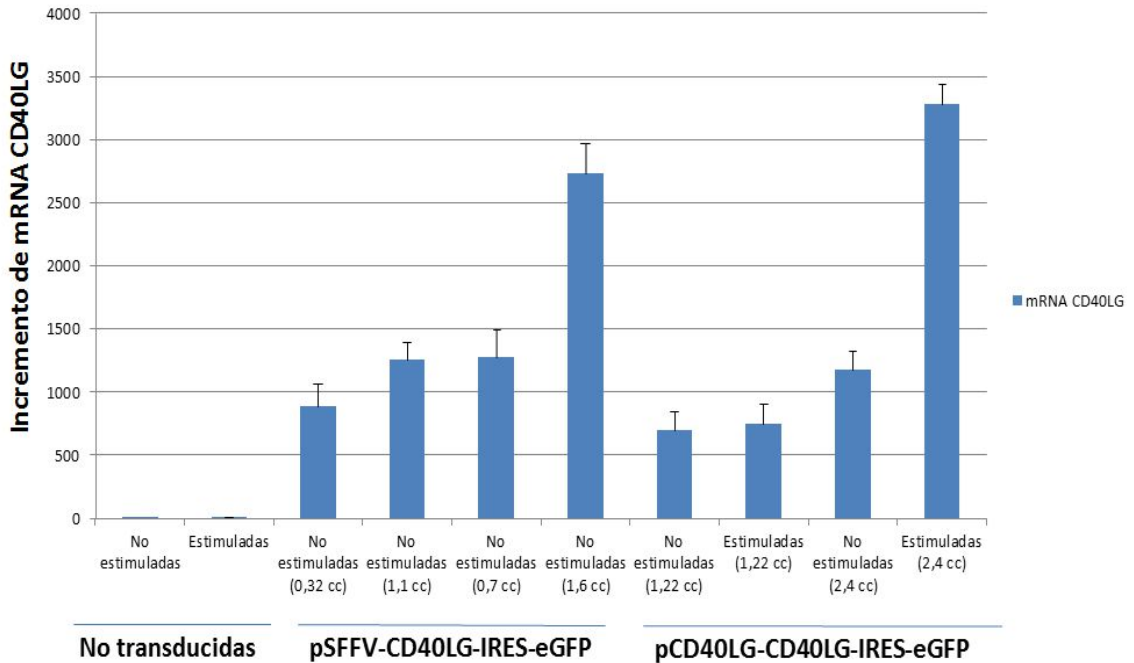


Figura 4.15 Las células derivadas de paciente de HIGM1 PH3 transducidas con el vector bicistrónico regulado pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP recuperan una alta tasa de transcripción de mRNA de CD40LG tras ser estimuladas con PMA+Io. Cuantificación relativa del mRNA de CD40LG por qPCR de linfocitos T periféricos de un donante sano (N1), de los pacientes PH2 y PH3 no transducidos y transducidos en reposo con el vector pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP sin estimular o estimuladas 20 h con PMA+Io. Resultados normalizados respecto a los valores de mRNA de las células Jurkat no transducidas y no estimuladas.

En relación con las células Jurkat transducidas con el vector pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP, destacó el notable aumento de mRNA *CD40LG* en las líneas resultantes tras los enriquecimientos mediante separación por citometría de flujo descritos en el punto 4.3.2. Sin embargo, elevados valores de mRNA no aseguraron una mayor expresión de la proteína, tal y como ocurrió con las células

Resultados

PH3TD⁺ y PH3⁺ (Fig.4.15A) o como sucedió con la serie de líneas Jurkat pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP, donde el aumento de RNA se corresponde con un incremento nulo o moderado de CD154 en la superficie celular (Fig4.10A y 4.10B).

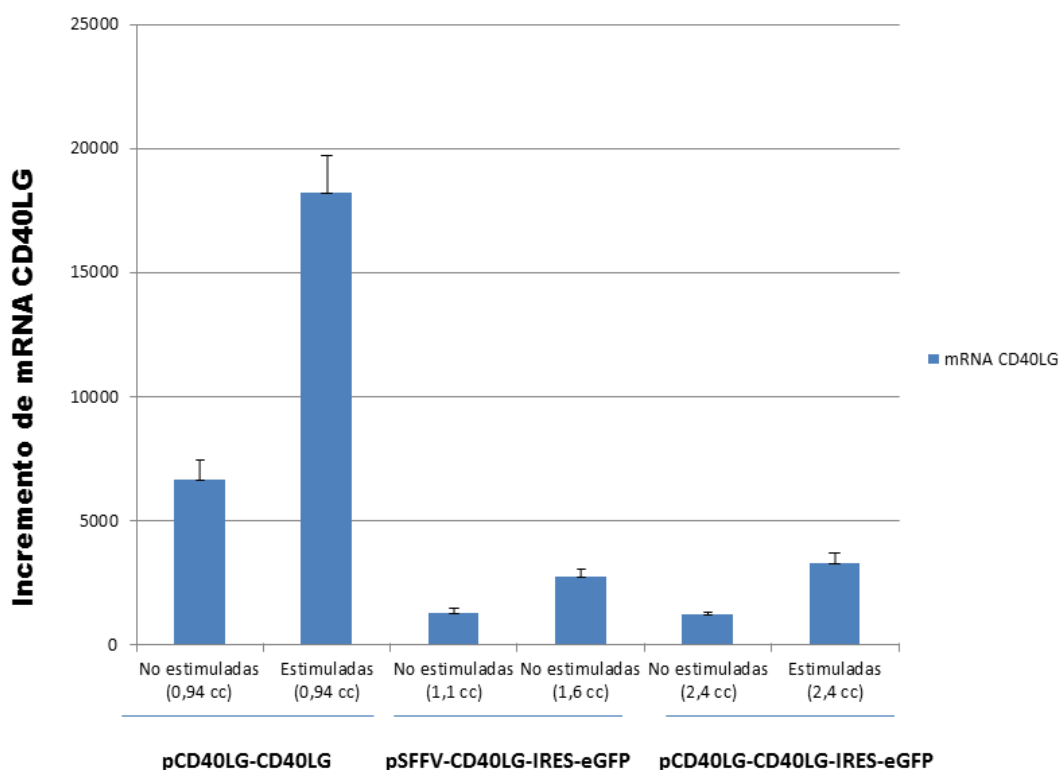


Figura 4.16 El vector lentiviral pCD40LG-CD40LG posee una tasa de expresión de mRNA de *CD40LG* más alta que sus contrapartes bicistrónicas constitutiva y regulada en células Jurkat transducidas. Resultados normalizados respecto a los valores de RNA de las células Jurkat no transducidas y no estimuladas. Entre paréntesis aparece el número de integraciones por célula (cc).

4.6. Modelo murino de HIGM1

4.6.1 El vector pCd40lg-Cd40lg muestra una expresión regulada y dependiente de activación en células BW5147 (CD154⁻)

Para comprobar si los patrones de expresión de CD154 obtenidos en células humanas con nuestras construcciones lentivirales eran reproducibles en células de otra especie de mamífero, como lo es el ratón, llevamos a cabo un ensayo *in vitro* con la línea BW5147, un timoma de células T murinas tempranas tumorales CD4⁺ y CD154⁻. Estas células no expresan la molécula CD154 ni tan siquiera cuando son estimuladas con PMA+Io durante 7 h, pero sí que se detectan niveles mRNA de *Cd40lg* por RT-PCR (datos no mostrados). Por este motivo seleccionamos estas células como un modelo murino *in vitro* de HIGM1. Los linfocitos BW5147 fueron transducidos con el vector lentiviral constitutivo pSFFV-Cd40lg y el vector regulado pCd40lg-Cd40lg con un MOI de 100. Las líneas resultantes fueron denominadas con los sufijos pSFFV-Cd40lg (con 4,715 inserciones/célula) y pCd40lg-Cd40lg (con 5,895 inserciones/célula). Los linfocitos T de ratón se caracterizan por poseer una cinética de expresión en superficie para CD154 más rápida que la humana (Armitage *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 1993), llegando a su máxima expresión entre 6 y 8 h después de ser estimuladas con PMA (u otro forbol de miristato como el PDB)+Io.

Mediante citometría de flujo se comprobó la expresión de la proteína CD154 (Fig.4.17), que alcanzó más de un 90% en las células BW5147 transducidas con el vector constitutivo pSFFV-Cd40lg independientemente de su activación (paneles centrales situados a la izquierda). Por el contrario, las células

Resultados

BW5147 transducidas con el vector regulado pCd40lg-Cd40lg (paneles inferiores izquierdos) mostraron un discreto 15% CD154⁺ sólo tras su activación.

No obstante, se consideró que esta expresión de CD154 murino en las células BW5147 pCd40lg-Cd40lg (5,895 cc) podría mejorarse para alcanzar valores más altos. Esto motivó que para obtener una expresión de CD154 más elevada, se realizara un enriquecimiento mediante separación celular por citometría de flujo sobre las células BW5147 pCd40lg-Cd40lg CD154⁺ estimuladas (PDB+Io), lo que llevó al establecimiento de una nueva línea BW5147 pCd40lg-Cd40lg (Fig.4.17, panel derecho). Esta línea enriquecida cuenta con 9,795 cc y tras su estimulación alcanzó un 50% de células CD154⁺ en su superficie. La expresión de CD154 por parte de todas las líneas BW5147 resultó estable en cultivos celulares prolongados.

Ahora bien, quisimos determinar si esa restitución de la expresión de CD154 era o no fisiológica. El PMA es un forbol de miristato, que junto a la ionomicina, logra una potentísima activación de los linfocitos, pero es muy difícil de desprender de las membranas celulares con las que se haya puesto en contacto, ni siquiera tras varios lavados. Esta situación impide observar una cinética completa de las células diana. Sin embargo, el PDB es otro forbol de miristato que por el contrario es fácilmente eliminado tras lavar las células con PBS. Se ha descrito que los linfocitos murinos así estimulados retiran progresivamente el CD154 de su superficie, internalizándolo, a partir de las 8 h de estimulación y es casi indetectable a las 20 h (Roy *et al.*, 1993). Por tanto, se determinó mediante citometría de flujo la expresión de CD154 en la superficie de las células BW5147 transducidas con el vector regulado pCd40lg-Cd40lg (9,795 cc) a las 7 h, 20 h y 30 h tras ser estimuladas con PDB+Io (Fig. 4.18) o PMA+Io (datos no mostrados).

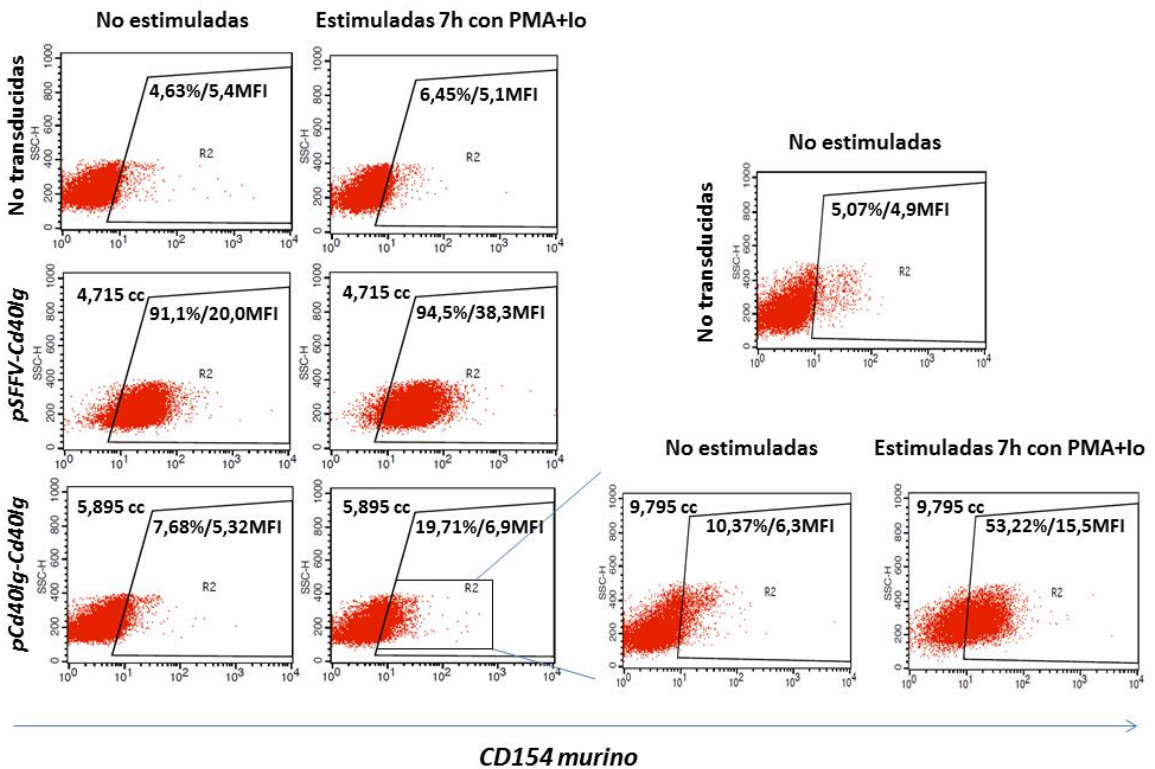


Figura 4.17. Expresión regulada de CD154 en la superficie de células BW5147 transducidas con el vector pCd40lg-Cd40lg. Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD154 murino en células BW5147: no transducidas, transducidas con el vector pSFFV-Cd40lg (4,715 cc) y transducidas con el vector pCd40lg-Cd40lg (5,895 cc) no estimuladas o estimuladas 7h con PMA+Io. A la derecha se muestra el análisis por citometría de flujo de la expresión de CD154 murino en células no estimuladas o estimuladas 7h con PMA+Io resultantes del enriquecimiento a partir de células pCd40lg-Cd40lg CD154⁺ estimuladas (9,795 cc). El número de inserciones/célula (cc) se refleja en cada caso en la esquina superior izquierda y a la derecha aparece el % de células CD154 positivas y la intensidad relativa de la población completa (%/MFI). La expresión en la superficie celular correlaciona con el número de integraciones por célula.

A las 7 h del inicio del tratamiento, se tomó una alícuota de células para que fueran lavadas con PBS, tras lo que fueron nuevamente puestas en cultivo con medio fresco hasta que se cumplieran 20 h o 30 h desde el comienzo del tratamiento, momento en que se determinó su expresión de CD154 por citometría de flujo. La línea celular BW5147 pCd40lg-Cd40lg (9,795 cc) expresó un 37,5%

Resultados

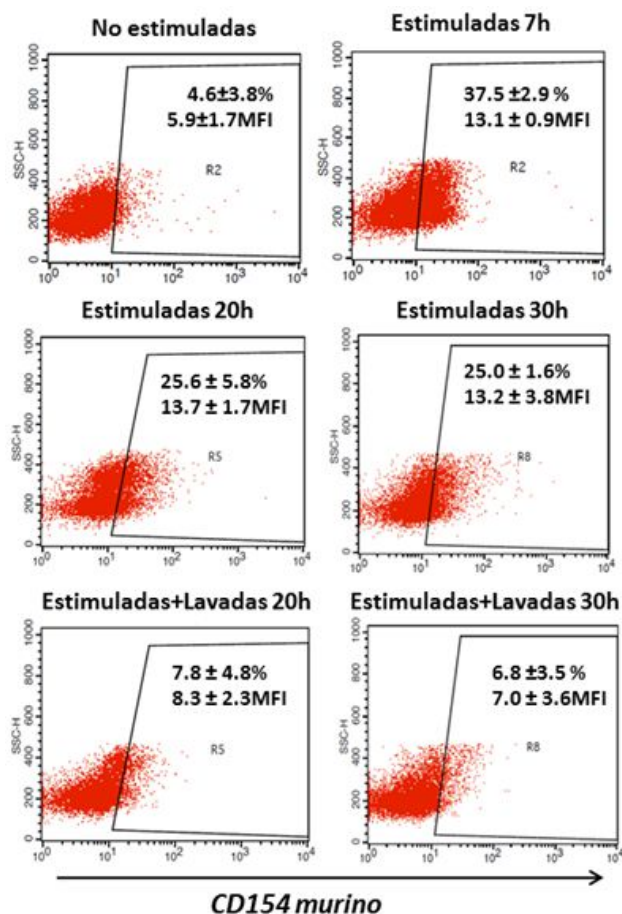


Figura 4.18. Expresión temporal de CD154 en células estimuladas BW5147 transducidas con el vector regulado pCd40lg-Cd40lg. La expresión de CD154 fue determinada a las 7 h (panel superior derecho), 20 h y 30 h (paneles centrales). Como alternativa, los agentes estimulantes (PDB+Io) fueron eliminados del medio mediante lavados 7 h después del comienzo del tratamiento, tras lo cual las células se mantuvieron en cultivo hasta llegar a una duración final de 20 h (panel inferior izquierdo) o de 30 h (panel inferior derecho), momento en el que se determinó la expresión de CD154 por citometría de flujo. Dentro de cada gráfica se incluyen el porcentaje de células CD154⁺ y la intensidad media de fluorescencia.

de expresión similar, pero con valores de CD154 más discretos (datos no mostrados).

de CD154⁺ 7 h tras su estimulación. Esta expresión se redujo a un 25% a las 20 h de estimulación y no varió de forma significativa a las 30 h.

Sin embargo, cuando las células fueron lavadas al cumplirse las 7 h de tratamiento para retirar los agentes estimulantes PDB+Io, la población CD154⁺ disminuyó hasta un 7,8% tras 20 h en cultivo tras el comienzo de la estimulación y hasta un 6,8% a las 30 h, siguiendo un patrón de expresión de proteína temporal. Esta reducción del CD154 expresado en la superficie celular no pudo observarse cuando los agentes estimulantes fueron PMA+Io, independientemente de que fueran lavadas o no 7 h después del inicio del cultivo, además de ser objeto de una alta toxicidad (datos no mostrados). También las células BW5147 pCd40lg-Cd40lg con sólo 5,895 cc demostraron poseer un patrón

4.6.2 Expresión funcional del transgén contenido en el vector lentiviral regulado pCd40lg-Cd40lg

Las líneas BW5147 vieron restituida su capacidad para expresar CD154 de forma dependiente de activación y regulada en el tiempo (pCd40lg-Cd40lg). Para comprobar si este CD154 era funcional, y por tanto, capaz de desencadenar la proliferación de células B a través de la interacción CD40-CD154, se procedió a evaluar su capacidad para promover la proliferación de linfocitos B primarios purificados de bazo de ratones C57Bl/6. Estos ensayos funcionales están basados en la pérdida de fluorescencia progresiva de los linfocitos B tratados con CFSE, pues cada división celular provoca el reparto del compuesto fluorescente entre las células hijas y la consecuente disminución de intensidad de fluorescencia. Las cuatro líneas de células T BW5147 (no transducidas; pSFFV-Cd40lg; pCd40lg-Cd40lg de 5,895 cc; y pCd40lg-Cd40lg de 9,795 cc) fueron estimuladas o no con PMA+Io durante 7 h y posteriormente expuestas a un tratamiento con mitomicina C. La mitomicina C es un antimetabólico que detiene el crecimiento celular e induce, al cabo de un tiempo, la apoptosis de las células tratadas, eliminándolas del cocultivo con los linfocitos B primarios. Por otro lado, la mitomicina C no detiene la transcripción de mRNA o la traducción de proteínas, al menos hasta que comience el proceso de apoptosis, por lo que cada célula tratada aún podrá realizar su tráfico de vesículas o mecanismos regulatorios post-transduccionales más inmediatos (Dardalhon *et al.*, 2001). Por tanto, el CD154 expresado en la membrana plasmática de las células BW5147, si es que lo hay, debería interaccionar con el CD40 de los linfocitos B primarios sólo durante las primeras horas de cocultivo, desencadenando los mecanismos celulares pertinentes, después de lo cual la célula T entrará en apoptosis. Por tanto, al cocultivar estas células BW5147 tratadas con mitomicina C junto a los linfocitos B primarios marcados con CFSE durante 72 h, se podrá determinar la funcionalidad biológica del CD154

Resultados

de origen transgénico por su capacidad para inducir proliferación en las segundas (Fig.4.19).

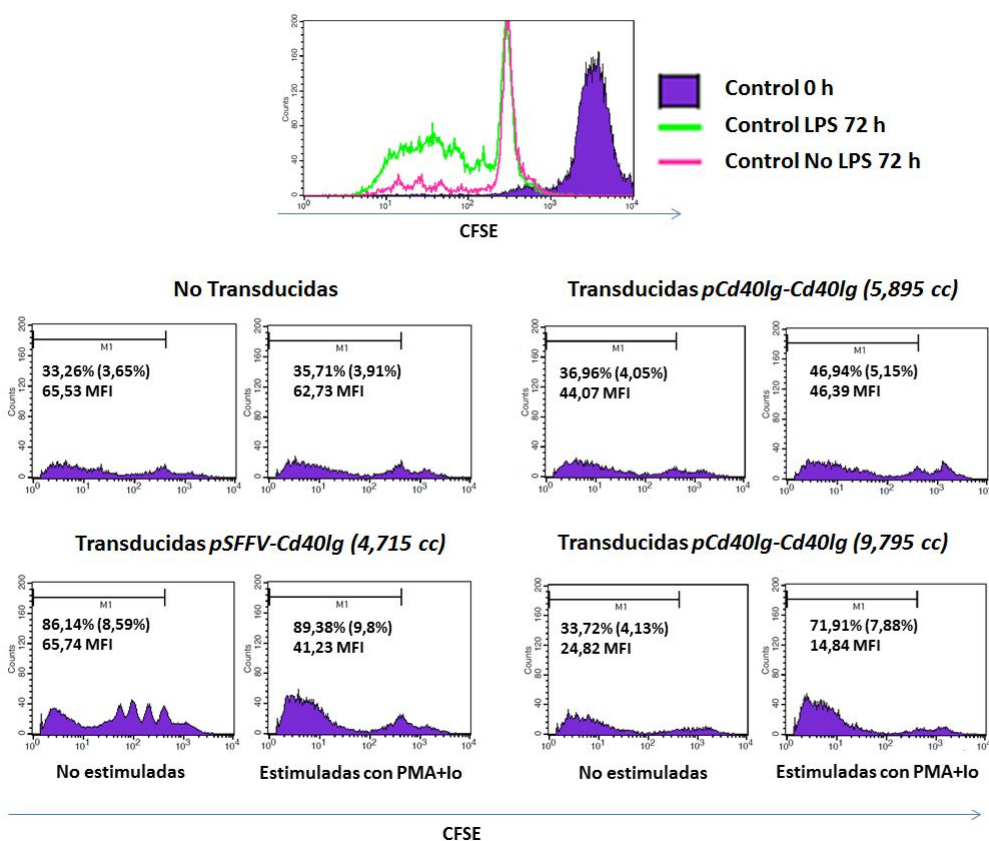


Figura 4.19. Las moléculas CD154 expresadas en la superficie de células BW5147 transducidas con el vector regulado pCd40lg-Cd40lg inducen la proliferación de células B. Ensayo funcional de proliferación de linfocitos B primarios tratados con CFSE y estimulados vía CD40-CD154 transgénico expresado por las diferentes líneas BW5147. A) Los linfocitos B primarios fueron tratados con CFSE y se midió su intensidad de fluorescencia a tiempo 0 como referencia, tras lo que fueron estimulados o no con 45 µg/ml de LPS (controles positivo y negativo respectivamente) durante 72 h. B) Los linfocitos B primarios fueron tratados con CFSE y cocultivados durante 72 h con células BW5147 tratadas con mitomicina C: no transducidas, pSFFV-Cd40lg (4,715 cc) o pCd40lg-Cd40lg (5,895 cc o 9,795 cc) no estimuladas o estimuladas durante 7 h con PMA+Io (histogramas de las filas media e inferior). La región M1 marca en estos últimos histogramas la población de células B primarias en proliferación (el primer número indica el % de células B en proliferación respecto al total de células viables, el segundo entre paréntesis el % de células B en proliferación respecto al número total de eventos y el tercero la intensidad de fluorescencia de las células B proliferantes).

Como controles se incluyeron linfocitos B primarios no estimulados a tiempo 0 y a las 72 h (controles negativos) y linfocitos B primarios tratados con lipopolisacárido bacteriano (LPS), que es un potente inductor de la proliferación de células B (control positivo). Las células BW5147 no transducidas y no estimuladas produjeron una proliferación basal de un 30% en los linfocitos B (Fig.4.19, fila central, histograma primero). Las células BW5147 no transducidas y estimuladas (Fig.4.19, fila central, histograma segundo) y las dos líneas BW5147 pCd40lg-Cd40lg (5,895 y 9,795 cc respectivamente) no estimuladas no indujeron la proliferación de las células B más allá del valor basal antes mencionado (Fig.4.19, filas central histograma tercero y fila inferior histograma tercero). Mientras que las células BW5147 pSFFV-Cd40lg no estimuladas causaron una proliferación de un 55% neto en linfocitos B (Fig.4.19, fila inferior, histograma primero), las células BW5147 pSFFV-Cd40lg estimuladas un 60% neto (Fig.4.19, fila inferior, histograma segundo), las células BW5147 pCd40lg-Cd40lg con 5,895 cc estimuladas un 10% neto (Fig.4.19, fila central, último histograma) y las células BW5147 pCd40lg-Cd40lg con 9,795 cc estimuladas una proliferación de linfocitos B de un 40% neto (Fig.4.19, fila inferior, último histograma).

En todos los ensayos se comprobó la expresión de CD154 en las cuatro líneas BW5147 por citometría de flujo. De la misma manera y para descartar cualquier posible interferencia de las células BW5147 en los datos relativos a la proliferación de las células B primarias, se realizó en paralelo el tratamiento con CFSE de estas células BW5147 previamente sometidas a tratamiento con mitomicina C. En ningún caso se hallaron alteraciones reseñables en la expresión de CD154 y la proliferación de las células BW5147 tratadas con mitomicina C fue negativa, datos que se confirmaron mediante ensayo con MTT (datos no mostrados).

Resultados

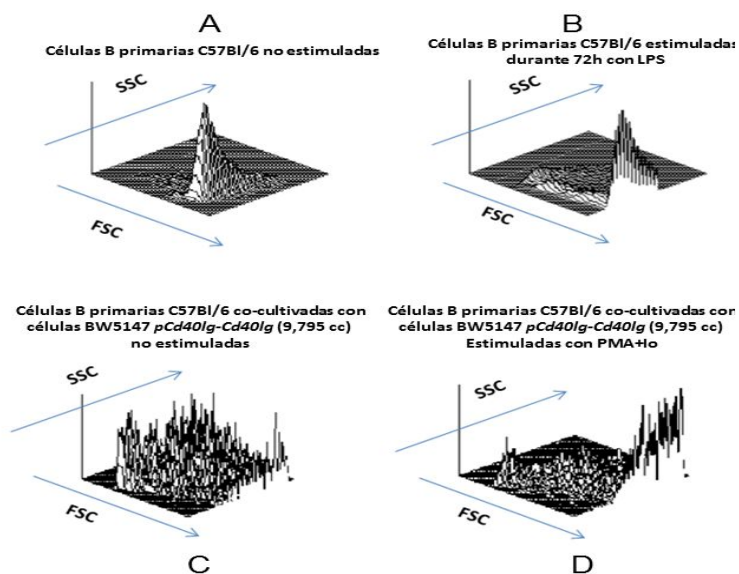


Figura 4.20 Las moléculas CD154 expresadas en la superficie de células BW5147 transducidas con el vector regulado pCd40lg-Cd40lg provocan cambios de la complejidad de la superficie (SSC) y el tamaño (FSC) celulares de linfocitos B primarios murinos vía CD40-CD154: no estimulados (A), estimulados durante 72 h con 45 µg/ml de LPS (B) y cocultivados durante 72 h con células tratadas con mitomicina BW5147 pCd40lg-Cd40lg (9,795 cc) no estimuladas (C) o estimuladas 7 h con PMA+Io (D)

También se pudo comprobar la activación de los linfocitos B en estos cultivos al observar la transformación en linfoblasto que experimenta un linfocito B al ser estimulado con LPS o por la vía del CD40-CD154. Tras su estimulación con LPS, el tamaño de las células B y la complejidad de su superficie aumentan notablemente (Fig.4.20, fila superior). Estos cambios también se aprecian en el caso de los linfocitos B primarios cocultivados con células BW5147 pCd40lg-Cd40lg (9,795 cc) no estimuladas, pero son mucho más pronunciados cuando el cocultivo se hace con esas mismas células estimuladas (Fig.4.20, fila inferior).

4.7 La expresión del vector regulado pCd40lg-Cd40lg está restringida al linaje hematopoyético, a diferencia del vector constitutivo pSFFV-Cd40lg

El vector regulado pCd40lg-Cd40lg se expresa de forma regulada en el tiempo y dependiente de activación en linfocitos BW5147 (Fig.4.17 y 4.18), pero era necesario comprobar cuál es su comportamiento en otros linajes celulares, especialmente en los linajes no hematopoyéticos. Por ello se seleccionó un panel de líneas celulares de diferentes linajes, que fueron transducidas con los vectores pSFFV-Cd40lg y pCd40lg-Cd40lg.

Línea celular	Tipo Celular	MOI	Copias/célula (cc)	Desviación estándar
BW5147	Linfocitos T (ratón)	100	5,895	±2,36
BW5147	Linfocitos T (ratón)	100	9,795	±2,96
LL2LLc	Carcinoma pulmonar (ratón)	100	1,8	±0,33
C2C12	Mioblastos (ratón)	30	1,16	±0,02
C2C12	Mioblastos (ratón)	100	2,1	±0,51

Tabla 4.1 Líneas celulares murinas transducidas con el vector constitutivo pSFFV-Cd40lg.

El vector constitutivo pSFFV-Cd40lg fue capaz de transducir tres líneas murinas distintas (Tabla 4.1) obteniendo un número notable de inserciones por célula: linfocitos T (BW5147), mioblastos (C2C12) y células epiteliales pulmonares (LL2LLc).

En lo que refiere a su patrón de expresión de CD154, el vector pSFFV-Cd40lg mostró una potente señal de la proteína en casi todas las líneas

Resultados

mencionadas, como sucedió con las células BW5147 (Fig.4.17, fila central). Por otro lado, en células de epitelio pulmonar transducidas (LL2LLc, Fig. 4.21, fila primera) se logró una expresión moderada del transgén, tanto con células no estimuladas (11,2%), como estimuladas (19,3%). Al margen de esto se ha podido comprobar que el vector constitutivo pSFFV-Cd40lg desencadena una potente expresión de CD154 en mioblastos (C2C12, Fig.4.21, fila segunda) y en fibroblastos humanos (293T, Fig. 4.21, última fila).

Línea celular	Tipo Celular	MOI	Copias/célula (cc)	Desviación estándar
BW5147	Linfocitos T (ratón)	100	4,715	±1,89
LL2LLc	Carcinoma pulmonar (ratón)	100	1,2	±0,09
C2C12	Mioblastos (ratón)	30	2,52	±0,13
C2C12	Mioblastos (ratón)	100	3,72	±0,09

Tabla 4.2 Líneas celulares murinas transducidas con el vector regulado pCd40lg-Cd40lg

Un análisis parecido se realizó con el vector regulado pCd40lg-Cd40lg (Tabla 4.2), cuyas transducciones fueron tan eficientes como aquellas efectuadas con el vector constitutivo pSFFV-Cd40lg. Al margen de las células T BW5147 pCd40lg-Cd40lg (Fig.4.17 y 4.18), los demás tipos celulares, a saber; células de epitelio pulmonar LL2LLc, mioblastos C2C12 y fibroblastos humanos 293T, no modificaron sustancialmente su patrón de expresión de CD154 al ser transducidas con el vector pCd40lg-Cd40lg (Fig.4.21, panel derecho, filas primera, segunda y tercera respectivamente), independientemente de su estimulación.

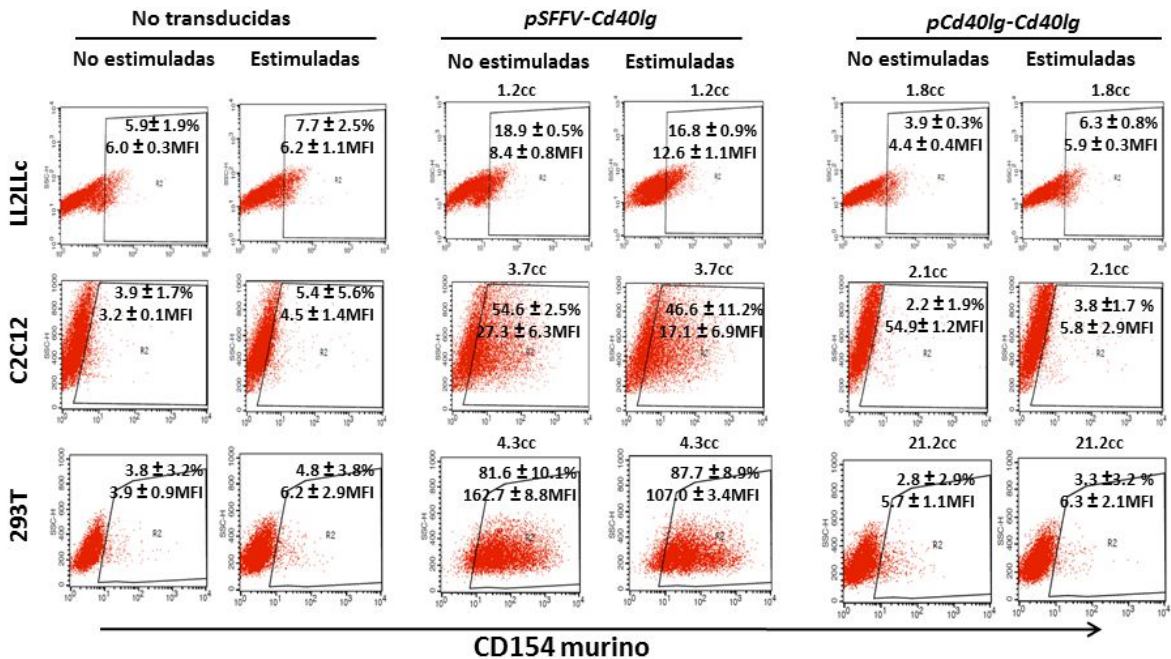


Figura 4.21. Células no hematopoyéticas transducidas con el vector regulado pCd40lg-Cd40lg no expresan CD154 en su superficie celular. Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD154 murino en las líneas celulares murinas LL2LLc (carcinoma pulmonar), C2C12 (mioblastos) y en la línea humana 293T (fibroblastos embrionarios) no transducidas (columnas de la izquierda) o transducidas con los vectores pSFFV-Cd40lg (columnas centrales) y pCd40lg-Cd40lg (columnas de la derecha) tras su estimulación de 7 h con PMA+Io. El número de inserciones/célula (cc) queda reflejado encima de cada gráfica. Además, cada citometría incluye el porcentaje de células CD154⁺ y la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la población completa (%/MFI±S.D.). La expresión de CD154 en la superficie celular de cada línea ha sido comprobada por citometría de flujo un mínimo de tres veces y los datos mostrados corresponden a su media aritmética.

En líneas celulares murinas de linaje no hematopoyético como LL2LLc y C2C12 (Fig.4.21, filas primera y segunda) o en el caso de fibroblastos humanos 293T (Fig.4.21, fila tercera) el vector regulado pCd40lg-Cd40lg (Fig.4.21, panel derecho) no indujo expresión significativa de CD154 en su superficie celular, ni tan siquiera tras una estimulación de 7 h con PMA+Io (Fig.4.21, filas primera a tercera). Por el contrario, el vector constitutivo pSFFV-Cd40lg sí que logró una expresión importante de CD154 en estas líneas celulares (Fig.4.21, panel central), sobre todo en células C2C12 y 293T (Fig.4.21, filas segunda y tercera).

Resultados

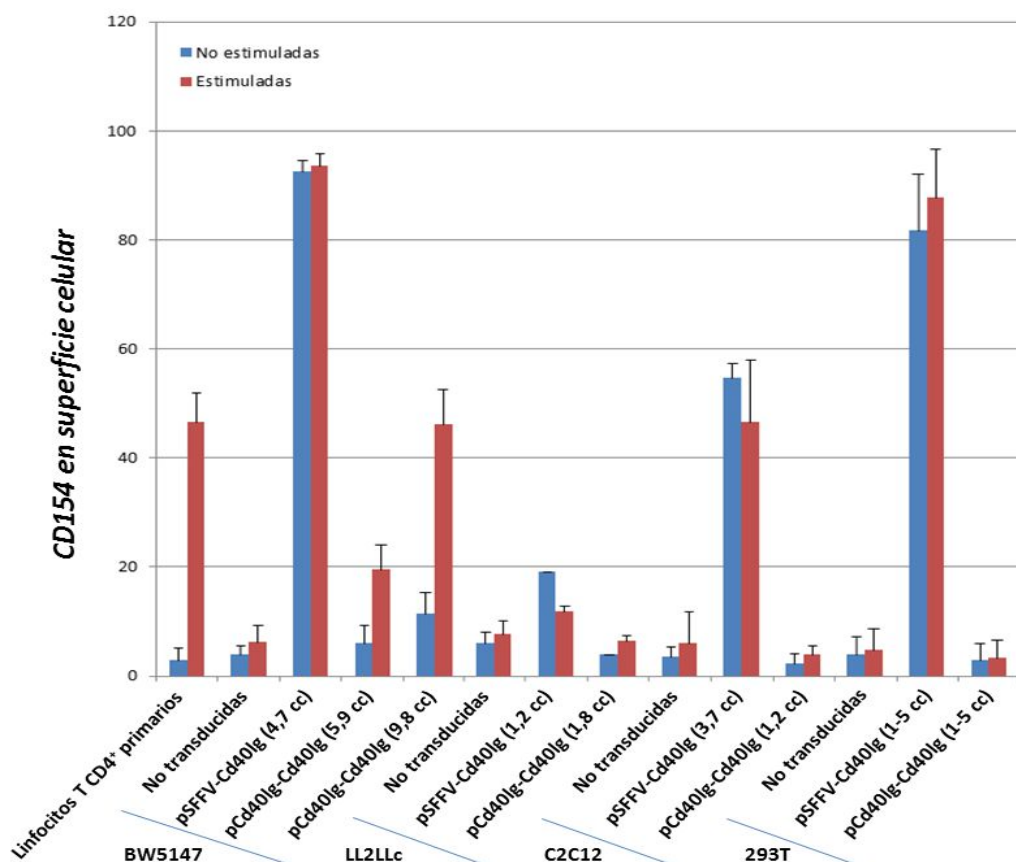


Figura 4.22. El vector regulado pCd40lg-Cd40lg sólo permite la expresión de CD154 en linfocitos T murinos estimulados. Recopilación de todos los ensayos de determinación de la expresión de CD154 murino por citometría de flujo en el panel completo de líneas celulares no transducidas, transducidas con el vector pSFFV-Cd40lg y transducidas con el vector pCd40lg-Cd40lg no estimuladas o estimuladas 7 h con PMA+Io. A excepción de los fibroblastos humanos 293T todas las líneas son de origen murino: esplenocitos CD4⁺ de ratón C57Bl/6 y BW5147 (linfocitos T), LL2LLc (células epiteliales de pulmón) y C2C12 (mioblastos). Cada experimento se ha repetido en cada caso un mínimo de tres veces. Entre paréntesis aparece el número de inserciones por célula (cc).

Una comparativa completa de la expresión de CD154 en la superficie en linfocitos murinos T primarios y en las líneas celulares BW5147, LL2LLc, C2C12 y 293T transducidas con los vectores pSFFV-Cd40lg y pCd40lg-Cd40lg se puede observar en la Figura 4.22, donde se incluyen los diferentes MOI. En este

diagrama de barras se puede apreciar como las células transducidas con el vector constitutivo pSFFV-Cd40lg presentan una población CD154⁺ mayor que aquellas no transducidas o transducidas con el vector regulado pCd40lg-Cd40lg. Además, la estimulación con PMA+Io provoca un incremento en la expresión en membrana de CD154, especialmente en linfocitos T no transducidas o transducidas con el vector regulado pCd40lg-Cd40lg (Fig.4.22, linfocitos T primarios y células BW5147, barras rojas).

Discusión

5. Discusión

El Síndrome de Híper-IgM ligado al cromosoma X (HIGM1) es una inmunodeficiencia primaria causada por mutaciones en el gen codificante para CD154 que provocan una señalización defectuosa en la ruta CD40-CD154 entre linfocitos T y B (Foy *et al.*, 1996). Este síndrome causa que el sistema inmunológico de los afectados sea incapaz de realizar el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas o la formación de centros germinales, entre otros problemas, lo que se traduce en que los pacientes sufren profundas y graves alteraciones de la inmunología humoral y celular, que los hacen sensibles a infecciones recurrentes, patologías autoinmunológicas y al desarrollo de tumores (Etzioni and Ochs, 2004). Las opciones terapéuticas son escasas y generalmente de carácter profiláctico y paliativo y las perspectivas de supervivencia de los pacientes no superan la segunda década de vida. El único tratamiento efectivo es el trasplante HLA- idéntico de médula ósea, pero las especiales características de este protocolo lo convierten en un recurso de difícil acceso para la mayoría de pacientes de HIGM1.

Desde hace años se vienen explorando las posibilidades de la transferencia génica a células de pacientes con enfermedades de carácter monogénico. La aplicación de protocolos de terapia génica a inmunodeficiencias primarias ha logrado una mejora clínica significativa para una centena de pacientes tras su tratamiento (Mukherjee *et al.*, 2013; Ghosh *et al.*, 2015). Especialmente, pero no únicamente, el empleo de vectores virales en terapia génica ha obtenido buenos resultados en el tratamiento de inmunodeficiencias primarias como el déficit de ADA o SCID-X1 (Cavazzana *et al.*, 2016). Sin embargo, estos protocolos han tenido que ser perfeccionados tras presentarse severos efectos adversos en pacientes y modelos animales. Algunos de los factores más importantes que han debido ser revisados han sido la naturaleza del virus en el que está basado el

Discusión

vector, el patrón de inserción en el núcleo de la célula huésped y los mecanismos de regulación del transgén. Las modificaciones en el diseño de los vectores terapéuticos han conseguido mejorar el resultado de estos protocolos al reducir dichos efectos adversos sin perjudicar su eficacia terapéutica (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2014).

HIGM1 es un ejemplo excelente de una enfermedad que requiere medidas de bioseguridad muy elevadas para la aplicación de la terapia génica. CD154 se expresa de manera transitoria en la superficie de células T CD4⁺ activadas en forma de homotrimeros, aunque se ha identificado su capacidad para formar heterotrimeros con otras variedades de monómeros CD154 resultantes de *splicing* alternativo (Karpusas *et al.*, 1995; Mazzei *et al.*, 1995). El gen codificante para CD154, ya sea el humano (*CD40LG*) o el murino (*Cd40lg*), se encuentra en el brazo largo del cromosoma X y está sometido a potentes mecanismos regulatorios, sobre todo de carácter transcripcional (Roy *et al.*, 1993). Esta potente regulación ha sido a su vez uno de los principales inconvenientes para el desarrollo de un modelo de terapia génica para la enfermedad. Los ensayos practicados en un modelo murino de la enfermedad (Brown *et al.*, 1998) usando un vector terapéutico de expresión constitutiva lograron la reconstitución de todo el sistema inmunológico de aquellos ratones CD154 deficientes, pero también fue la causa que provocó seis meses después linfoproliferación descontrolada. La necesidad de rigurosos mecanismos de bioseguridad para la terapia génica de HIGM1 fue posteriormente confirmada por el hecho de que una expresión no regulada y ectópica de *Cd40lg* en ratones transgénicos fue letal (Sacco *et al.*, 2000). Además, aunque este tipo de expresión de CD154 fue tolerada en células T maduras, la linfoproliferación no controlada continuó siendo un efecto adverso detectado en los animales supervivientes (Sacco *et al.*, 2000), dada su implicación en mecanismos de muerte celular programada de timocitos TCRαβ⁺CD40⁺. Al utilizar

transgenes dirigidos por un promotor viral fuerte se corre el riesgo de provocar eventos de trans-activación de genes cercanos al lugar de inserción del transgén, situación de alto riesgo no sólo por el caos molecular que causaría en las inmediaciones de la integración, sino porque hay puntos calientes del genoma tremendamente atractivos para según qué vector y que podría dar pie a eventos de transformación neoplásica. Más aún, los vectores onco-retrovirales tradicionalmente empleados en ensayos de terapia génica han probado tener un patrón de inserción poco seguro por su tendencia a provocar eventos de mutagénesis insercional, especialmente cerca de proto-oncogenes como LMO-2 (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003b), y su propensión a ser silenciados al insertarse en regiones proclives a ello (Suerth *et al.*, 2012).

A pesar de estas observaciones, hay que destacar que la terapia génica ya ha sido formalmente validada en modelos preclínicos como una alternativa terapéutica para el tratamiento de HIGM1 siempre que se conserven unos mecanismos regulatorios estrictos. Así se comprobó en un trabajo que cambió la estrategia del reemplazamiento génico por otra de reparación génica dirigida por *trans-splicing* (Tahara *et al.*, 2004), donde se consiguió la corrección funcional de la enfermedad en ratones *Cd40lg-knock out* sin la aparición de ningún síndrome linfoproliferativo. Sin embargo, ésta es una estrategia compleja que requiere además la identificación de la mutación causante de la deficiencia de CD154, lo que implica necesariamente individualizar las herramientas terapéuticas para cada paciente. Además, en el mencionado trabajo, primero debió elaborarse un conjunto de vectores lentivirales con diferentes dominios de hibridación con el intrón 1 de *Cd40lg* para seleccionar el más eficiente, el cual logró corregir el 10% de los transcritos producidos. Este porcentaje fue suficiente para reconstituir la expresión de CD154 en linfocitos de ratón deficientes para CD154. En células humanas esto podría no bastar, tal y como sugieren nuestros ensayos con las células los pacientes

Discusión

de HIGM1 transducidas con los vectores regulados pCD40LG-CD40LG y pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP, porque se ha descrito que hasta un 90% de los transcritos de *CD40LG* hallados en células de pacientes pertenecen a especies de mRNA endógenas no corregidas que tienen la capacidad de interferir con el mRNA terapéutico, dificultando su expresión y su regulación (Seyama *et al.*, 1998). Además, estos transcritos anormales de carácter endógeno en las células de pacientes HIGM1 también pueden traducirse, dando lugar a distintos monómeros de proteína defectuosa que dificulten el correcto ensamblaje de los monómeros CD154 corregidos (Seyama *et al.*, 1999) al inducir la formación de trímeros híbridos de CD154 no funcionales, incapaces de interactuar adecuadamente en la membrana plasmática de linfocitos T CD4⁺ activados o en forma soluble segregada con las moléculas CD40 presentes en la superficie de células B u otros tipos celulares, o incluso siendo objeto de un transporte defectuoso a la superficie celular a causa de la inestabilidad estructural de dichos heterotrímeros o a una inadecuada interacción molecular con los distintos elementos que constituyen el sistema de transporte vesicular.

Para responder a las exigentes condiciones de bioseguridad para tratar pacientes de HIGM1 con terapia génica, hemos construido un conjunto de vectores lentivirales autoinactivables de segunda generación (Fig. 4.1), dirigidos por el promotor endógeno de *CD40LG* (Romero *et al.*, 2011), con un integroma más bioseguro que el de los onco-retrovirus. Estos vectores conservan los elementos regulatorios del gen para establecer una expresión de CD154 tejido-específica, fisiológica y dependiente de activación. Los ensayos realizados en este trabajo nos han permitido corroborar la funcionalidad de dicho vector, destacando además una apreciación relevante para la aplicación clínica de la terapia génica para HIGM1: el minigén *CD40LG* dirigido por su promotor endógeno restringe su expresión al linaje hematopoyético y sólo se hace efectiva tras una estimulación celular previa,

lo que salva los peligros asociados a una expresión desregulada y ectópica del transgén (Sacco *et al.*, 2000).

No obstante, nos intrigó que, a pesar de la eficiente integración del transgén en las células transducidas, la expresión de CD154 en la superficie celular fuese tan escasa, mientras que la expresión de eGFP en células transducidas con un vector lentiviral equivalente portador del gen reportero, pero también dirigido por el promotor endógeno de *CD40LG*, fuera muy intensa (Romero *et al.*, 2011). Por este motivo decidimos estudiar en detalle las causas de la ineficiente expresión superficial de CD154, dado que consideramos que los niveles de expresión logrados serían probablemente insuficientes para acceder a una aplicación clínica de los vectores. Diseñamos los ensayos de esta tesis doctoral con la intención de alcanzar en la población de células transducidas un número de inserciones fisiológica de 1 copia del vector por célula (1 cc), ya que supusimos que una cantidad más elevada de inserciones podría provocar efectos indeseados (Chang *et al.*, 2007; Charrier *et al.*, 2011). Por tanto, se transdujeron células Jurkat CD154⁻ con los vectores pSFFV-CD40LG y pCD40LG-CD40LG, de expresión constitutiva y regulada, respectivamente. Sólo se observó una buena expresión de la proteína en la superficie celular en una fracción de células transducidas con el vector constitutivo. Una situación semejante se pudo apreciar en una línea transducida de células T aloespecíficas derivadas de un paciente de HIGM1, que posee una mutación confirmada que da lugar a transcritos de *CD40LG* carentes del exón 3. El vector regulado pCD40LG-CD40LG transcribe su mRNA de forma dependiente de activación en células Jurkat, tal y como requiere nuestro modelo de terapia génica, pero el hecho de que no logre una expresión significativa de la proteína en su superficie celular sugiere la existencia de un valor umbral de mRNA mínimo que debe sobrepasarse para que la traducción de la proteína sea efectiva y pueda traslocarse a la membrana celular. Esta hipótesis está respaldada por los

Discusión

niveles de mRNA alcanzados en células Jurkat pSFFV-CD40LG, cuya expresión constitutiva es casi 10 veces superior a la de las células Jurkat pCD40LG-CD40LG.

A su vez, para realizar una interpretación más global de los patrones de transcripción de *CD40LG*, sería preciso considerar la influencia que podrían ejercer la presencia de distintas formas de RNA de CD154 en células T sometidas a procedimientos de transferencia génica. Algunos estudios atestiguan la existencia de al menos 2 isoformas de mRNA del gen *CD40LG* en linfocitos T primarios humanos (Spriggs *et al.*, 1992), lo que parece correlacionar con el doblete de *CD40LG* que detectamos en la amplificación de bandas en los carriles donde fueron cargados productos de la retrotranscripción de células derivadas de un paciente con HIGM1, donde coexisten dos especies de mRNA de *CD40LG*, una más pequeña que carece del exón 3 y otra mayor que contiene la secuencia completa. Más aún, en linfocitos de paciente de HIGM1 transducidas con el vector regulado pCD40LG-CD40LG detectamos una tercera banda de mRNA *CD40LG*, cuya secuenciación desveló que también contenía la secuencia exónica completa, pero con un patrón de migración distinto. Estos hallazgos indican que algunas células derivadas de este paciente no transcriben el exón 3 de *CD40LG*, tal y como se predice por su mutación, pero que hay otra población celular que, aunque transcribe la secuencia normal de mRNA, ésta migra de forma anormal. La presencia de varias especies de mRNA de *CD40LG* en células derivadas de pacientes transducidas y no transducidas invita a considerar las consecuencias de las posibles interacciones entre ellas en un marco lentiviral. De hecho, y tal y como se ha comentado anteriormente, algunos estudios ya describieron que en linfocitos de individuos sanos existen diversas especies de mRNA de *CD40LG* procedentes de distintos mecanismos de *splicing* alternativo (Seyama *et al.*, 1998), lo que podría dar lugar a conformaciones tridimensionales distintas a cada variante

de mRNA que alteren su movilidad electroforética. Una variedad que se incrementa en las células de muchos pacientes de HIGM1, donde coexisten especies mutadas y normales de mRNA de *CD40LG*, de cuya interacción se ha sugerido que pueden desprenderse serios inconvenientes (Seyama *et al.*, 1998; Seyama *et al.*, 1999) como puede ser el bloqueo parcial de la traducción a proteína CD154 por hibridación de especies de mRNA. Igualmente, conviene recordar que cada trímero funcional de CD154 tiene capacidad para unirse con sólo dos moléculas de CD40 (An *et al.*, 2011). La mayoría de mutaciones en el gen *CD40LG* en pacientes de HIGM1 da lugar a niveles casi indetectables de trímeros funcionales, lo que en realidad no implica necesariamente que no se produzcan monómeros de CD154, sino que generalmente son monómeros defectuosos incapaces de formar trímeros o, si son capaces, que dan lugar a trímeros no funcionales (Seyama *et al.*, 1999). Esto podría explicar las observaciones anteriores sobre células Jurkat y líneas derivadas de paciente transducidas con los vectores Lentivirales regulados, puesto que permite sostener la idea de que existan una serie de valores umbral de mRNA y proteína transgénica mínima que deban superarse para sobreponerse al material endógeno defectuoso e interferente. Los anticuerpos monoclonales anti-CD154 suelen tener como epítipo el sitio de unión a CD40 de los trímeros CD154 funcionales, igual que sucede con las proteínas de fusión CD40-Ig, por lo que no es probable que detecten monómeros o trímeros afuncionales que no conforman correctamente la topología tridimensional de unión a CD40, algo que, sin embargo, sí puede lograrse empleando sueros policlonales anti-CD154 (Seyama *et al.*, 1998). En ninguna de las líneas de paciente con HIGM1, transducidas o no, se detectaron unos niveles significativos de proteína CD154 en la superficie celular tras su activación con PMA+Io (Fig. 4.12A), lo que encaja con los estudios que afirman que, en el caso de pacientes de HIGM1 con niveles endógenos de mRNA o de proteína defectuosa, existe la posibilidad de que las especies de mRNA o los monómeros de distinta procedencia interactúen

Discusión

impidiendo la formación de trímeros o dando lugar a heterotrímeros no funcionales (Seyama *et al.*, 1998; Seyama *et al.*, 1999). Es decir, este trabajo respalda las observaciones hechas en pacientes de HIGM1 en la bibliografía científica previa.

Los vectores lentivirales autoinactivables presentan cierta tendencia a ser silenciados por metilación (Kildebeck *et al.*, 2012). Sin embargo, los ensayos realizados con células Jurkat y de pacientes con HIGM1, transducidas con el vector regulado pCD40LG-CD40L y el vector constitutivo pSFFV-CD40LG, tratadas con el agente hipometilante 5-decitabine no revelaron diferencias significativas en la expresión de CD154, lo que nos permitió descartar esta posibilidad en nuestras células transducidas (datos no mostrados). Por tanto, para tratar de esclarecer si los resultados que observamos en células Jurkat y derivadas de pacientes de HIGM1 transducidas se debían a una transducción génica insuficiente (incluso considerando los altos niveles de mRNA de *CD40LG* detectados por PCR cuantitativa) o a otros factores, como podría ser la interferencia del mRNA normal con los transcritos anormales nativos, mediante la producción de vectores lentivirales de carácter bicistrónico. La expresión del gen reportero eGFP en nuestras construcciones bicistrónicas, situado en 3' tras la secuencia del gen terapéutico e IRES, está ligada a la de *CD40LG*, ya que la transcripción de uno está acoplada a la del otro. Por este motivo, fue muy interesante que la línea Jurkat transducida con el vector bicistrónico de expresión regulada (2,5 copias por célula) tuviera una población eGFP⁺ del 85%, pero que apenas presentara CD154 en su superficie celular, tanto en células en reposo, como en células estimuladas. Al tratarse de una construcción bicistrónica, la expresión de proteína eGFP en células Jurkat estimuladas tiene necesariamente que estar ligada, al menos, a la transcripción del *CD40LG* terapéutico, algo que se pudo confirmar por PCR a tiempo real. La cuestión obvia es por qué entonces se detecta proteína eGFP, pero no CD154, lo que parece indicar algún impedimento

de carácter postranscripcional. Por el contrario, sí que se detectó una pequeña población celular CD154⁺/eGFP⁺ en células transducidas con el vector bicistrónico de expresión constitutiva. Tras realizar sucesivos enriquecimientos celulares mediante separación por citometría de flujo sobre células Jurkat pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP (0,32 cc y 0,7 cc respectivamente), que teóricamente debían expresar CD154 y eGFP constitutivamente, se pudo observar que existe una tendencia general de que a mayor número de inserciones se alcance una mayor expresión de los transgenes, aunque de forma moderada, pues si bien es cierto que los datos volvieron a sugerir la existencia de un valor umbral de mRNA mínimo para detectar proteína, no hubo una proporcionalidad directa en todos los casos, como sucedió entre las líneas Jurkat pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP con 0,7 cc y aquellas con 1,1 cc (Fig. 4.14).

Así pues, los datos recabados por estos ensayos apuntan a que una expresión constitutiva del transgén logra expresar eficientemente CD154 en la superficie celular, mientras que una regulada, evidentemente de una intensidad menor, presenta más dificultades para alcanzar ese objetivo. Todo parece indicar que para que el gen terapéutico consiga localizar CD154 en la superficie celular, su expresión debe imponerse a los bloqueos e interferencias causados por el material endógeno celular, ya sea mRNA o proteína CD154 (Seyama *et al.*, 1999). La suposición de una inconveniente interacción entre proteína nativa defectuosa y terapéutica pareció quedar respaldada por los datos obtenidos con los vectores bicistrónicos en células de paciente, en este caso PH3. Las células PH3 tienen una sustitución Q174R, que no impide la formación de trímeros CD154 que pueden detectarse tras su estimulación (Fig. 4.13A), pero que no son funcionales, razón por la que el paciente presenta el fenotipo de la enfermedad. La transducción de estas células en estado de reposo, con cualquiera de los dos vectores bicistrónicos, permitió observar una clara expresión de proteína eGFP, mientras que no sólo no

Discusión

se detectaron mayores niveles de CD154 en la superficie celular, sino que los niveles endógenos de las células PH3 fueron reducidos drásticamente de manera similar a lo que sucedió al transducirlas con el vector pCD40LG-CD40LG (datos no mostrados), lo que de nuevo sugiere la interferencia de los monómeros nativos defectuosos con los procedentes de la traducción del gen terapéutico al ensamblar los trímeros de CD154. Por otro lado, sí que es evidente que la expresión de CD154 requiere un mayor número de integraciones que las necesarias para la expresión de proteína eGFP.

No obstante, las citometrías intracelulares de las líneas Jurkat transducidas con los vectores bicistrónicos permitieron evidenciar la existencia de al menos otro bloqueo importante en la expresión de CD154 en la membrana plasmática, ya que las células Jurkat pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP estimuladas expresaron proteína CD154 intracelularmente, a diferencia de las no estimuladas, pero apenas se pudo detectar en su superficie celular. En estas condiciones esta línea contó con un bajo porcentaje de células CD154⁺ (un 16%), que sin embargo contrastó con la mínima expresión de la molécula en dichas células en estado de reposo (Fig. 4.11). Por tanto, se puede concluir que el CD154 transgénico no sólo se transcribe, sino que también se traduce, pero que es incapaz de alcanzar una localización en la superficie celular. Todo parece indicar que existe un defecto en la traslocación del CD154 desde el citoplasma a la membrana plasmática, quizás causado por un ensamblaje inadecuado de los homotrímeros que conforman el ligando de CD40, aunque en este caso habría que tener en cuenta los resultados publicados en varios estudios, donde se han podido identificar ciertas especies de heterotrímeros de CD154, formados por monómeros normales y algunos de los monómeros mutados correspondientes a pacientes de HIGM1, en la superficie celular (Seyama *et al.*, 1998; Seyama *et al.*, 1999). En cualquier caso, si los trímeros de CD154 detectados intracelularmente no alcanzan la superficie de las células T,

probablemente se deba a la existencia de un defecto en el sistema de transporte vesicular que impida la correcta traslocación a la membrana de la proteína, aunque otros factores, tales como un incorrecto ensamblaje entre monómeros mutados y terapéuticos de CD154 o una manifiesta inestabilidad de los heterotrímeros resultantes (Seyama *et al.*, 1999), también podrían estar implicados en este último bloqueo de la expresión de CD154 en la superficie celular. Dado que CD154 se expresa fundamentalmente en la superficie de linfocitos T CD4⁺ activados y tiene un papel destacado en la estimulación de linfocitos B mediante el establecimiento de la sinapsis inmunológica, su incorrecto transporte desde el citoplasma a la membrana es un grave problema para cualquier aproximación terapéutica de la enfermedad.

Por otro lado, hemos demostrado que, al igual que en un contexto humano (Romero *et al.*, 2011), es posible inducir una expresión regulada dependiente de activación de CD154 murino en células T BW5147 CD154⁻ transducidas con el vector regulado, lo que refuerza las ventajas proporcionadas por una estrategia de terapia génica basada en la regulación de un transgén por su propio promotor endógeno. Por tanto, este objetivo no queda restringido a nuestro modelo *in vitro* en células humanas, sino que puede extenderse a otros contextos no humanos, lo que en sí mismo puede promover el impulso de ahondar y explorar nuevas posibilidades clínicas de la terapia génica. Mientras que la transducción de células de timoma BW5147 CD4⁺ transducidas con el vector constitutivo pSFFV-Cd40lg dio lugar a casi un 100% de expresión de CD154 en la superficie celular, tanto de células estimuladas como no estimuladas, su contraparte regulada pCd40lg-Cd40lg sólo expresó proteína en células BW5147 transducidas tras su activación y de forma temporal, de modo que al retirar del cultivo el agente causante de la estimulación cesó la expresión de CD154 (Fig.4.17). No obstante, a igualdad de integraciones del vector por célula, la expresión de CD154 en aquellas

Discusión

transducidas con el vector regulado fue menor que la observada en sus contrapartes transducidas con el vector constitutivo. Este hecho probablemente esté relacionado con una potencia menor del promotor endógeno de *Cd40lg*, tal y como sucede con los vectores pCD40LG-CD40LG y pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP (Fig. 4.7, 4.10, 4.11 y 4.13) dado que al realizar un enriquecimiento en células CD154⁺ se produjo una población con un mayor número de inserciones por célula (de casi 6 cc en las células anteriores al enriquecimiento a 10 cc en las células resultado de dicho procedimiento), donde se observó un considerable aumento de la expresión de la proteína.

De este modo, estos datos concuerdan con las observaciones realizadas con el vector regulado humano pCD40LG-CD40LG, puesto que tal y como hemos visto, un número bajo de inserciones produce una expresión ineficiente de CD154 en un contexto humano. Por tanto, obtener múltiples inserciones para lograr una expresión eficiente del transgén puede representar otro severo inconveniente para una futura aplicación de la terapia génica a pacientes con HIGM1, no únicamente por las dificultades técnicas relacionadas con una transducción eficaz de células progenitoras, sino también por el incremento de las probabilidades de generar efectos adversos. La población de células BW5147 transducidas con el vector regulado, enriquecida en CD154 mediante separación celular permitió identificar claramente dos aspectos clave en la regulación de este minigén. En primer lugar, la expresión de la proteína ocurre sólo en células estimuladas, dado que el porcentaje de células CD154⁺ en los cultivos en reposo es semejante a la observada en células no transducidas. Y en segundo lugar, la expresión de CD154 dependiente de activación decae rápidamente tras eliminar el agente estimulante del cultivo. Este patrón de la regulación de la proteína se asemeja mucho a la dinámica de expresión y desaparición de CD154 tras el encuentro con el antígeno y su posterior retirada (Castle *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 1993). Esto tiene una importancia

particular para la terapia génica de HIGM1, ya que nuestros vectores cumplen dos requisitos indispensables en este sentido: expresión transitoria y dependiente de activación de la proteína terapéutica.

Otro dato importante es que la expresión de estos vectores regulados queda restringida al linaje hematopoyético, condición fundamental para eludir efectos adversos asociados a una expresión ectópica del transgén (Sacco *et al.*, 2000). Se ha comprobado que el panel de vectores lentivirales con el transgén *CD40LG* (pSFFV-CD40LG, pCD40LG-CD40LG, pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP y pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP) mostró unos patrones de expresión similares a los de los vectores conteniendo el transgén murino (pSFFV-Cd40lg y pCd40lg-Cd40lg) (Fig. 4.2 y 4.3); donde las construcciones con el promotor viral fuerte SFFV carecieron de restricciones en diferentes linajes celulares en su expresión, mientras que aquellas con el promotor endógeno humano de *CD40LG* o murino de *Cd40lg* no se expresaron fuera del linaje hematopoyético, a pesar de contar con un número relevante de integraciones por célula, lo que es uno de los logros más interesantes dentro del marco de la terapia génica que hemos alcanzado con el presente trabajo. Más aún, estos ensayos nos han permitido llegar a la conclusión de que una expresión fuertemente regulada y fisiológica del transgén capaz de corregir el fenotipo de HIGM1 sólo se alcanza cuando se cumplen dos premisas:

a) El promotor endógeno debe dirigir la expresión de su propio gen (Romero *et al.*, 2011) en líneas celulares pertenecientes a su mismo linaje y a su misma especie. En lo que respecta al linaje, un buen ejemplo lo suponen las células 293T transfectadas con los elementos bicistrónicos, pues durante los primeros días de producción viral la expresión episomal de los transgenes evadió los mecanismos de regulación nucleares o intragénicos, mostrando altos niveles de proteínas CD154 y eGFP en ambos vectores (Fig. 4.8). Por el contrario, al cabo de

Discusión

10 días post-transfección los elementos episomales disminuyeron su concentración por el crecimiento del cultivo por lo que la expresión desregulada se desvaneció dejando paso a los patrones de expresión causados directamente por el efecto de los promotores transgénicos, que efectivamente fue la situación de partida de las células 293T transducidas (Fig. 4.9). A partir de ese momento sólo el vector pSFFV-CD40LG-IRES-eGFP expresó CD154 de forma constitutiva y el vector pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP, dirigido por el promotor endógeno de CD40LG, silenció sus acciones con dicha proteína por ser tejido-específico, ya que los fibroblastos no pertenecen al linaje hematopoyético. Por otra parte, en lo referente a la especie de origen de la que procede el transgén, se ha comprobado que las células BW5147 transducidas con los vectores regulados pCD40LG-CD40LG y pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP son incapaces de expresar en su membrana CD154 humano, a pesar de tener un buen número de integraciones por célula (datos no mostrados).

b) Tanto el vector como los monómeros de CD154 terapéuticos que produzca deben ser funcionales, esto es, que sean capaces de ensamblarse en trímeros biológicamente activos que al interactuar con las moléculas CD40 (o cualquiera de sus otros receptores naturales) expresadas en la superficie celular de los linfocitos B puedan desencadenar su proliferación y el cambio de isotipo. Si bien la funcionalidad del vector humano pCD40LG-CD40LG (Romero *et al.*, 2011) y de los trímeros CD154 humanos terapéuticos producidos en células Jurkat transducidas con nuestros vectores (Romero *et al.*, 2009) ya había sido previamente demostrada, este trabajo ha permitido extender esa misma propiedad en el vector murino pCd40lg-Cd40lg (Fernández-Rubio *et al.*, 2015), puesto que los linfocitos T BW5147 pCd40lg-Cd40lg estimulados han sido capaces de inducir la proliferación de células B purificadas de bazo de ratón C57Bl/6 (Fig. 4.19) mediante la interacción CD40-CD154. En particular, hallamos una proliferación

neta muy potente en aquellas células B cocultivadas con las células T BW5147 pCd40lg-Cd40lg estimuladas, cuya inducción de la proliferación siguió una escala creciente en comparación con el porcentaje de células CD154⁺ de cada población (15% aquellas con 5,895 cc y 45% las que contaron con 9,985 cc). De este modo, hemos podido confirmar que la reconstitución de una expresión regulada y fisiológica de trímeros CD154 funcionales, empleando una construcción lentiviral controlada por el promotor endógeno del gen, no es una peculiaridad exclusiva de células humanas, sino que es posible extenderla a otros modelos de la enfermedad en contextos no humanos. Como un detalle técnico queda la tasa de proliferación basal observada en los linfocitos B primarios independientemente de la línea de células BW5147 con las que se cocultivaron. Sin embargo, esta proliferación de fondo no guarda relación con la interacción CD40-CD154, sino con el tratamiento con mitomicina C al que fueron sometidas las células BW5147, que si bien ralentiza y finalmente detiene su ciclo celular (Nieto *et al.*, 2007), también desencadena procesos de muerte celular en los que se liberan materiales intracelulares que estimulan el metabolismo de los linfocitos B (Pirnia *et al.*, 2002; Schiller *et al.*, 2008; Hochreiter-Hufford *et al.*, 2013).

Por consiguiente, en este trabajo se han proporcionado evidencias que demuestran el amplio rango de posibilidades terapéuticas proporcionadas por las estrategias basadas en la construcción de vectores regulados, donde la expresión del gen terapéutico queda controlada por su promotor endógeno. Como ya se ha comentado anteriormente, la mayoría de los vectores regulados publicados usan un promotor tejido-específico que controla el gen heterólogo seleccionado (Hanawa *et al.*, 2002; Marodon *et al.*, 2003; Werner *et al.*, 2004; Laurie *et al.*, 2007) para que muestre la potencia adecuada al dirigir la transcripción del gen. Esta aproximación, no obstante, no siempre da lugar a una buena expresión regulada. Por ejemplo, nuestro grupo de investigación ha demostrado que incluso si los promotores de

Discusión

WASP y *CD40LG* controlan de forma eficiente la expresión de sus propios genes dentro de un contexto lentiviral, no son capaces de regular con la misma precisión al gen reportero eGFP (Martín *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2011), ya que han podido apreciarse fugas en su expresión. Debido a que la restricción del transgén es óptima cuando está dirigida por su promotor endógeno, hay un número de alternativas que pueden compensar los defectos de un promotor débil. Por ejemplo, el uso de potenciadores u otros complementos como el elemento regulatorio postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota, que ha sido empleado con éxito (Lotti *et al.*, 2002). Por tanto, la combinación de promotores endógenos y otros elementos regulatorios puede ayudar a extender esta aproximación para desarrollar vectores regulados precisos, cuya disponibilidad será fundamental para abordar el tratamiento de enfermedades donde los genes implicados estén sujetos a una estricta regulación.

En definitiva, a lo largo de esta tesis hemos conseguido la reconstitución de la expresión tejido-específica, dependiente de activación y regulada en el tiempo de CD154 humano, en células Jurkat transducidas con los vectores regulados pCD40LG-CD40LG y pCD40LG-CD40LG-IRES-eGFP, y murino, en linfocitos T BW5147 transducidos con el vector regulado pCd40lg-Cd40lg, donde los mecanismos de regulación de *Cd40lg* y *CD40LG* han demostrado ser muy eficientes. No obstante, mientras que la reconstitución en células BW5147 ha sido muy eficaz, sólo ha sido posible lograr una ineficiente reconstitución de la expresión regulada de CD154 en la superficie de células Jurkat o en linfocitos T derivados de pacientes de HIGM1. Los ensayos efectuados en esta tesis doctoral sobre células Jurkat y células de pacientes de HIGM1 con los vectores regulados tenían como objeto precisar si era factible reconstituir dicha expresión alcanzando un número de 1 integración por célula (1 cc), algo que a la vista de los resultados obtenidos con el vector regulado bicistrónico sólo se ha cumplido de forma

ineficiente (Fig. 4.11 y 4.14). Además, es probable que la situación sea muy parecida en ambos modelos *in vitro*, murino y humano, dado que las células BW5147 (pSFFV-Cd40lg y pCd40lg-Cd40lg) tienen casi 3 veces más integraciones que cualquiera de las líneas celulares Jurkat transducidas mostradas en esta tesis, cifra que se eleva hasta casi 8 veces en relación a las células BW5147 pCd40lg-Cd40lg con casi 10 inserciones por célula. Por este motivo, es asumible que su éxito relativo se deba a que un número de inserciones tan elevado sea suficiente para superar el umbral necesario para que la expresión del transgén se imponga a la endógena. No es aceptable llegar a casi 10 cc para una aplicación terapéutica real en pacientes (Chang *et al.*, 2007; Charrier *et al.*, 2011), al tiempo que unos valores fisiológicos próximos a 1 cc, son insuficientes.

En conclusión, si bien nuestro actual modelo de terapia génica para HIGM1, en el que el transgén está dirigido por un promotor endógeno, corrobora las ventajas de un protocolo empleado con éxito en otras inmunodeficiencias primarias de carácter monogénico como WAS (Martín *et al.*, 2005; Aiuti *et al.*, 2013) al haber sido capaz de restituir una expresión tejido-específica, dependiente de activación y regulada en el tiempo de CD154 en modelos murino y humano de HIGM1, su actual baja eficacia en la expresión y las interferencias secundadas por los niveles de mRNA o proteína endógenos (Seyama *et al.*, 1999) hacen muy difícil su aplicación clínica. Sería preciso una mejora radical del diseño de los vectores, que como poco suponga un aumento de la tasa de su transcripción o una mayor eficiencia de su traducción (sin perder su carácter regulado) y de los vectores lentivirales utilizados, quizás mejorando su capacidad de transferencia génica o dotándolos de recursos para dirigir su inserción, para poder resolver la patología propia del paciente de HIGM1 mediante esta estrategia de terapia génica. Empero, existen otros protocolos en terapia génica muy prometedores que podrían ser explorados en un futuro próximo y que pueden dar respuesta a las necesidades

Discusión

de pacientes de inmunodeficiencias primarias como el HIGM1. El uso de nucleasas específicas para secuencias concretas de DNA con propósitos terapéuticos ha constituido un cambio paradigmático, ya que permite la corrección *in situ* de los defectos moleculares causantes de distintas enfermedades hereditarias: nucleasas “dedos de zinc” o ZNFs (Urnov *et al.*, 2005), activadores transcripcionales similares a nucleasas efectoras o TALENs (Lai *et al.*, 2016), sistemas de endonucleasas de DNA guiadas por RNA programable o CRISPR/Cas9 (Cong *et al.*, 2013) entre otras. Esta propuesta terapéutica podría resolver los inconvenientes causados por la interacción entre el material endógeno defectuoso de pacientes de HIGM1 (mRNA y proteína) y el gen terapéutico, que posiblemente impiden el ensamblaje de trímeros funcionales de CD154 y su transporte a la superficie celular, ya que en este caso se convertirían en un mismo elemento, donde el gen terapéutico sería el propio gen endógeno corregido. El gen endógeno reparado ya no produciría el mencionado material molecular defectuoso y como consecuencia desaparecerían los problemas de ensamblaje y de expresión superficial de CD154. Actualmente el campo de aplicación de las nucleasas de diseño dirigidas se limita a células somáticas, pero si se continúa avanzando en la investigación con células troncales, como los trabajos realizados con células madre inducidas (iPS) (Soldner *et al.*, 2011), podría no estar muy lejos el protocolo que permita su utilización en células progenitoras hematopoyéticas, aunque al igual que otras estrategias terapéuticas aún adolecen de una baja eficiencia que dificulta su aplicación clínica, siendo éste el obstáculo más importante que aún ha de salvar la terapia génica. Por ejemplo, las ZNFs ya han demostrado ser capaces de corregir mutaciones asociadas con SCID (Urnov *et al.*, 2005), la hemofilia B (Li *et al.*, 2011) o la enfermedad de Parkinson (Soldner *et al.*, 2011). Además, la investigación y mejora del diseño de sistemas CRISPR/Cas9 puede ser una vía terapéutica alternativa a las ZNFs en un futuro si sus éxitos en la edición génica de células humanas somáticas e iPS (Cong *et al.*, 2013, Mali *et al.*, 2013) y modelos

animales sencillos como el pez cebra (Hwang *et al.*, 2013) o bacterias (Jiang *et al.*, 2013) demuestran poseer una capacidad selectiva para el reconocimiento específico e individual de sitios concretos en genomas complejos. Es decir, la terapia génica aún puede ofrecer un buen número de vías alternativas para el tratamiento de pacientes de HIGM1.

Conclusions

6. Conclusions

- 1) A gene therapy strategy based on the transfer of a therapeutic gene driven by a fragment of its endogenous promoter by means of SIN lentiviral vectors is able to achieve a tissue-specific, transient and activation-dependent expression of CD154 in different *in vitro* models of HIGM1.
- 2) A high number of integrations per cell of the regulated vector pCD40LG-CD40LG are required to achieve a meaningful amount of protein on the cellular surface.
- 3) Although cells transduced with the regulated vector have significant amounts of *CD40LG* mRNA, surface expression of the CD154 protein is relatively inefficient. Interestingly, CD154 is accumulated intracellularly in activated cells instead of being exported to the membrane. This may indicate abnormalities in the protein transport mechanisms or in the correct assembly of CD154 trimers in transduced cells.
- 4) In a murine context, the regulated vector pCd40l-Cd40l is able to accomplish a tissue-specific, transient and activation-dependent expression of CD154, which mimics the results obtained in human cells transduced with the regulated vector pCD40LG-CD40LG.
- 5) The paralleled expression patterns of human and mouse transgenes controlled by their endogenous promoters indicate that the fine regulation achieved by lentiviral vectors is not restricted to human cells. This observation may be of importance for the development of applications of genetic technologies in other species in cases where strict mechanisms of gene regulation might be required.

Bibliografia

7. Bibliografia

1. Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, MP., Baricordi, C., Dionisio, F., Calabria, A., Giannelli, S., Castiello, MC., Bosticardo, M., Evangelio, C., Assanelli, A., Casiraghi, M., Di Nunzio, S., Callegaro, L., Benati, C., Rizzardi, P., Pellin, D., Di Serio, C., Schmidt, M., Von Kalle, C., Gardner, J., Mehta, N., Neduva, V., Dow, DJ., Galy, A., Miniero, R., Finocchi, A., Metin, A., Banerjee, PP., Orange, JS., Galimberti, S., Valsecchi, MG., Biffi, A., Montini, E., Villa, A., Ciceri, F., Roncarolo, MG., Naldini, L., 2013: Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*, 23;341(6148):1233151.
2. Aiuti, A., Cattaneo, F., Galimberti, S., Benninghoff, U., Cassani, B., Callegaro, L., Scaramuzza, S., Andolfi, G., Mirolò, M., Brigida, I., Tabucchi, A., Carlucci, F., Eibl, M., Aker, M., Slavin, S., Al-Mousa, H., Al Ghonaium, A., Ferster, A., Duppenhaler, A., Notarangelo, L., Wintergerst, U., Buckley, RH., Bregni, M., Markt, S., Valsecchi, MG., Rossi, P., Ciceri, F., Miniero, R., Bordignon, C., Roncarolo, MG., 2009a: Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N. Engl. J. Med.*, 360, 447-458.
3. Aiuti, A., Roncarolo, MG., 2009b: Ten years of gene therapy for primary immune deficiencies. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 682-689.
4. Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Marinello, E., Cattaneo, F., Vai, S., Servida, P., Miniero, R., Roncarolo, MG., Bordignon, C., 2002: Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*, 2410-2413.
5. Allen, R., Armitage, RJ., Conley, ME., Rosenblatt, H., Jenkins, NA., Copeland, NG., Bedell, MA., Edelhoff, S., Distche, CM., Simoneaux, DK., *et al.*, 1993:

Bibliografia

- CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science*, 990-993.
6. An, H., Kim, YJ., Song, DH., Park, BS., Kim, HM., Lee, JD., Paik, SG., Lee, JO., Lee, H., 2011: Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation. *J. Biol. Chem.*, 11226-11235.
 7. Andre, P., Prasad, KS., Denis, CV., He, M., Papalia, JM., Hynes, RO., Phillips, DR., Wagner, DD., 2002: CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism. *Nat. Med.*, 247-252.
 8. Andreadis, S., Brott, D., Fuller, AO., Palsson, BO., 1997: Moloney murine leukemia virus-derived retroviral vectors decay intracellularly with a half-life in the range of 5.5 to 7.5 hours. *J. Virol.*, 71, 7541-7548.
 9. Antoine, C., Müller, S., Cant, A., Cavazzana-Calvo, M., Veys, P., Vossen, J., Fasth, A., Heilmann, C., Wulffraat, N., Seger, R., Blanche, S., Friedrich, W., Abinun, M., Davies, G., Bredius, R., Schulz, A., Landais, P., Fischer, A., 2003: Long-term survival and transplantation of haemopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience 1968-99. *Lancet*, 553-560.
 10. Armitage, R., Fanslow, WC., Strockbine, L., Sato, TA., Clifford, KN., Macduff, BM., Anderson, DM., Gimpel, SD., Davis-Smith, T., Maliszewski, CR. *et al.*, 1992: Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*, 80-82.
 11. Armitage, R., Maliszewski, C., Alderson, M., Grabstein, K., Spriggs, M., Fanslow, W., 1993: CD40L: a multi-functional ligand. *Semin. Immunol.*, 5, 401-412.
 12. Aruffo, A., Farrington, M., Hollenbaugh, D., Li, X., Milatovich, A., Nonoyama, S., Bajorath, J., Grosmaire, LS., Stenkamp, R., Neubauer, M. *et al.*, 1993: The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell*, 72, 291-300.

13. Avedillo Díez, I., Zychlinski, D., Coci, EG., Galla, M., Modlich, U., Dewey, RA., Schwarzer, A., Maetzig, T., Mpofo, N., Jaeckel, E., Boztug, K., Baum, C., Klein, C., Schambach, A., 2011: Development of novel efficient SIN vectors with improved safety features for Wiskott-Aldrich syndrome stem cell based gene therapy. *Mol. Pharm.*, 8, 1525-1537.
14. Barr, S., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, JR., Bushman, FD., 2005: Integration targeting by avian sarcoma-leukosis virus and human immunodeficiency virus in the chicken genome. *J. Virol.*, 79, 12035-12044.
15. Batista, F., Iber, D., Neuberger, MS., 2001: B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature*, 489-494.
16. Baum, C., Düllmann, J., Li, Z., Fehse, B., Meyer, J., Williams, DA., von Kalle, C., 2003: Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood*, 101, 2099-2114.
17. Baumann, J., Unutmaz, D., Miller, MD., Breun, SK., Grill, SM., Mirro, J., Littman, DR., Rein, A., KewalRamani, VN., 2004: Murine T cells potently restrict human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.*, 78, 12537-12547.
18. Beard, B., Dickerson, D., Beebe, K., Gooch, C., Fletcher, J., Okbinoglu, T., Miller, DG., Jacobs, MA., Kaul, R., Kiem, HP., Trobridge, GD., 2007: Comparison of HIV-derived lentiviral and MLV-based gammaretroviral vector integration sites in primate repopulating cells. *Mol. Ther.*, 15, 1356-1365.
19. Bedell, V., Wang, Y., Campbell, JM., Poshusta, TL., Starker, CG., Krug, RG., Tan, W., Penheiter, SG., Ma, AC., Leung, AY., Fahrenkrug, SC., Carlson, DF., Voytas, DF., Clark, KJ., Essner, JJ., Ekker, SC., 2012: In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 491, 114-118.
20. Bi, K., Altman, A., 2001: Membrane lipid microdomains and the role of PKC θ in T cell activation. *Semin. Immunol.*, 13, 139-146.
21. Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, JK, Carroll, D., 2003: Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 300, 764.

Bibliografia

22. Blaese, R., Culver, KW., Miller, AD., Carter, CS., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, JJ., Rosenberg, SA., Klein, H., Berger, M., Mullen, CA., Ramsey, WJ., Muul, L., Morgan, RA., Anderson, WF., 1995: T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, 475-480.
23. Bloom, K., Ely, A., Mussolino, C., Cathomen, T., Arbuthnot, P., 2013: Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases. *Mol. Ther.*, 21, 1889-1897.
24. Booth, C., Gaspar, HB., Thrasher, AJ., 2011: Gene therapy for primary immunodeficiency. *Curr. Opin. Pediatr.*, 23, 659-666.
25. Bordignon, C., Mavilio, F., Ferrari, G., Servida, P., Ugazio, AG., Notarangelo, LD., Gilboa, E., Rossini, S., O'Reilly, RJ., Smith, CA. *et al.*, 1993: Transfer of the ADA gene into bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes for the treatment of patients affected by ADA-deficient SCID. *Hum. Gene Ther.*, 4, 513-520.
26. Bordignon, C., Notarangelo, LD., Nobili, N., Ferrari, G., Casorati, G., Panina, P., Mazzolari, E., Maggioni, D., Rossi, C., Servida, P., Ugazio, AG., Mavilio, F., 1995: Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science*, 270, 470-475.
27. Bosticardo, M., Marangoni, F., Aiuti, A., Villa, A., Grazia Roncarolo, M., 2009: Recent advances in understanding the pathophysiology of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, 113, 6288-6295.
28. Boucher, RC., 1996: Current status of CF gene therapy. *Trends. Genet.*, 12, 81-84.
29. Bouso, P., Whan, V., Douagi, I. Horneff, G., Pannetier, C., Le Deist, F., Zepp, F., Niehues, T., Kourilsky, P., Fischer, A., de Saint Basile, G., 2000: Diversity, functionality, and stability of the T cell repertoire derived in vivo from a single human T cell precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 274-278.

30. Boztug, K., Schmitd, M., Schwarzer, A. *et al.*, 2010: Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. 1918-1927ff. *N. Engl. J. Med.*
31. Braun, C., Boztug, K., Paruzynski, A., Banerjee, PP., Avedillo Díez, I., Dewey, RA., Böhm, M., Nowrouzi, A., Ball, CR., Glimm, H., Naundorf, S., Kühlecke, K., Blasczyk, R., Kondratenko, I., Maródi, L., Orange, JS., von Kalle, C., Klein, C., 2014: Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome – long-term efficacy and genotoxicity. *Sci. Trans. Med.*, 227-233.
32. Breckpot, K., Aerts, JL., Thielemans, K., 2007: Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics. *Gene Ther.*, 14, 847-862.
33. Brown, M., Topham, DJ., Sangster, MY., Zhao, J., Flynn, KJ., Surman, SL., Woodland, DL., Doherty, PC., Farr, AG., Pattengale, PK., Brenner, MK., 1998: Thymic lymphoproliferative disease after successful correction of CD40 ligand deficiency by gene transfer in mice. *Nat. Med.*, 4, 1253-1260.
34. Buchschacher, G., Wong-Staal, F., 2001: Approaches to gene therapy for human immunodeficiency virus infection. *Hum. Gene Ther.*, 12, 1013-1019.
35. Buckley, R., Schiff, SE., Schiff, RI., Markert, L., Williams, LW., Roberts, JL., Myers, LA., Ward, FE., 1999: Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.*, 508-516.
36. Budman, J., Chu, G., 2005: Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract. *EMBO J.*, 23;24(4), 849-860.
37. Bukrinsky, M., Sharova, N., Dempsey, MP., Stanwick, TL., Bukrinskaya, AG., Haggerty, S., Stevenson, M., 1992: Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 6580-6584.
38. Bukrinsky, M., Haggerty, S., Dempsey, MP., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., Stevenson, M., 1993: A nuclear

Bibliografia

- localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature*, 365, 666-669.
39. Burns, J., Friedmann, T., Driever, W. Burrascano, M., Yee, JK., 1993: Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Acad. Sci. U.S.A.*, 8033-8037.
40. Cai, M., Yang, Y., 2014: Targeted genome editing tools for disease modeling and gene therapy. *Curr. Gene Ther.*, 14, 2-9.
41. Camargo, F., Green, R., Capetanaki, Y., Jackson, KA., Goodell, MA., 2003: Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat. Med.*, 9, 1520-1527.
42. Candotti, F., Shaw, KL., Muul, L., Carbonaro, D., Sokolic, R., Choi, C., Schurman, SH., Garabedian, E., Kesserwan, C., Jagadeesh, GJ., Fu, PY., Gschweng, E., Cooper, A., Tisdale, JF., Weinberg, KI., Crooks, GM., Kapoor, N., Shah, A., Abdel-Azim, H., Yu, XJ., Smogorzewska, M., Wayne, AS., Rosenblatt, HM., Davis, CM., Hanson, C., Rishi, RG., Wang, X., Gjertson, D., Yang, OO., Balamurugan, A., Bauer, G., Ireland, JA., Engel, BC., Podsakoff, GM., Hershfield, MS., Blaese, RM., Parkman, R., Kohn, DB., 2012: Gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency: clinical comparison of retroviral vectors and treatment plans. *Blood*, 120, 3635-3646.
43. Carbone, E., Ruggiero, G., Terrazzano, G., Palomba, C., Manzo, C., Fontana, S., Spits, H., Kärre, K., Zappacosta, S., 1997: A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J. Exp. Med.*, 2053-2060.
44. Casamayor-Pelleja, M., Kahn, M., MacLennan, ICM., 1995: A subset of CD4⁺ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently

- expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. *J. Exp. Med.*, 1293–1301.
45. Castiello, M., Scaramuzza, S., Pala, F., Ferrua, F., Uva, P., Brigida, I., Sereni, L., van der Burg, M., Ottaviano, G., Albert, MH., Grazia Roncarolo, M., Naldini, L., Aiuti, A., Villa, A., Bosticardo, M., 2015: B-cell reconstitution after lentiviral vector-mediated gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 136(3), 692-702.
 46. Castle, B., Kishimoto K., Stearns C., Brown, ML., Kehry, MR., 1993: Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes. *J. Immunol.*, 1777-1788.
 47. Cavalieri, S., Cazzaniga, S., Geuna, M., Magnani, Z., Bordignon, C., Naldini, L., Bonini, C., 2003: Human T lymphocytes transduced by lentiviral vectors in the absence of TCR activation maintain an intact immune competence. *Blood.*, 497-505.
 48. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, JL., Bousso, P., Deist, FL., Fischer, A. , 2000: Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 669-672.
 49. Cavazzana-Calvo, M., Six, E., Lagresle-Peyrou, C., André-Schmutz, I., Hacein-Bey-Abina, S., 2016: Gene therapy for X-linked Severe Combined Immunodeficiency: Where do we stand? *Hum. Gene Ther.*, 27:2, 108-116.
 50. Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., Down, J., Denaro, M., Brady, T., Westerman, K., Cavalleco, R., Gillet-Legrand, B., Caccavelli, L., Sgarra, R., Maouche-Chrétien, L., Bernaudin, F., Girot, R., Dorazio, R., Mulder, GJ., Polack, A., Bank, A., Soulier, J., Larghero, J., Kabbara, N., Dalle, B., Gourmel, B., Socie, G., Chrétien, S., Cartier, N., Aubourg, P., Fischer, A., Cornetta, K., Galacteros, F., Beuzard, Y., Gluckman, E., Bushman, F., Hacein-Bey-Abina, S., Leboulch, P. , 2010: Transfusion

Bibliografia

- independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*, 467, 318-322.
51. Chang, A., Sadelain, M., 2007: The genetic engineering of hematopoietic stem cells: the rise of lentiviral vectors, the conundrum of the ltr, and the promise of lineage-restricted vectors. *Mol. Ther.*, 445-456.
 52. Charrier, S., Ferrand, M., Zerbato, M., Précigout, G., Viornery, A., Bucher-Laurent, S., Benkhelifa-Ziyyat, S., Merten, OW., Perea, J., Galy, A., 2011: Quantification of lentiviral vector copy numbers in individuals hematopoietic colony-forming cells shows vector dose-dependent effects on the frequency and level of transduction. *Gene Ther.*, 479-487.
 53. Check, E., 2005: Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature*, 433, 561.
 54. Chen, C., Rivera A, Ron, N., Dougherty, JP., Ron, Y., 2001: A gene therapy approach for treating T-cell-mediated autoimmune diseases. *Blood*, 97, 886-894.
 55. Ciuffi, A., Mitchell, RS., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, JR., Bushman, FD., 2006: Integration site selection by HIV-based vectors in dividing and growth-arrested IMR-90 lung fibroblasts. *Mol Ther*, 13, 366-373.
 56. Clegg, CH., Rulffes, JT., Haugen, HS., Hoggatt, IH., Aruffo, A., Durham, SK., Farr, AG., Hollenbaugh, D., 1997: Thymus dysfunction and chronic inflammatory disease in g39 transgenic mice. *Int. Immunol.*, 1111-1122.
 57. Cocca, B., Cline, AM., Radic, MZ., 2002: Blebs and Apoptotic Bodies Are B Cells Autoantigens. *J. Immunol.*, 159-166.
 58. Coil, D., Miller, AD., 2004: Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, 78(20), 10920-10926.
 59. Cong, L., Ran, FA., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, PD., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, LA., Zhang, F., 2013: Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.*, 823-826.

60. Coster, H., 1965: A quantitative analysis of the voltage-current relationships of fixed charge membranes and the associated property of "punch-through". *Biophys. J.*, 5, 669-686.
61. Court, DL., Sawitzke, JA., Thomason, LC., 2002: Genetic engineering using homologous recombination. *Annu. Rev. Gen.*, 36: 361-388.
62. Croyle, M., Callahan, SM., Auricchio, A., Schumer, G., Linse, KD., Wilson, JM., Brunner, LJ., Kobinger, GP., 2004: PEGylation of a vesicular stomatitis virus G pseudotyped lentivirus vector prevents inactivation in serum. *J. Virol.*, 78(2), 912-921.
63. Dardalhon, V., Jaleco, S., Kinet, S., Herpers, B., Steinberg, M., Ferrand, C., Froger, D., Leveau, C., Tiberghien, P., Charneau, P., Noraz, N., Taylor, N., 2001, 2001: IL-7 differentially regulates cell cycle progression and HIV-1-based vector infection in neonatal and adult CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 9277-9282.
64. De Palma, M., Venneri, MA., Naldini, L., 2003: In vivo targeting of tumor endothelial cells by systemic delivery of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.*, 14, 1193-1206.
65. Delenda, C., 2004: Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J. Gene Med.*, 6 Suppl 1, S125-138.
66. Demaison, C., Parsley, K., Brouns, G., Scherr, M., Battmer, K., Kinnon, C., Grez, M., Thrasher, AJ., 2002: High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum. Gene Ther.*, 803-813.
67. DePolo, N., Reed, JD., Sheridan, PL., Townsend, K., Sauter, SL., Jolly, DJ., Dubensky, TW. Jr. , 2000: VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol. Ther.*, 2, 218-222.

Bibliografia

68. Derse, D., Martarano, L., 1990: Construction of a recombinant bovine leukemia virus vector for analysis of virus infectivity. *J. Virol.*, 64, 401-405.
69. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., Naldini, L., 1998: A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.*, 72, 8463-8471.
70. Dunn, R., Luedecker, C.J., Haugen, H.S., Clegg, C.H., Farr, A.G., 1997: Thymic overexpression of CD40 ligand disrupts normal thymic epithelial organization. *J.Histochem. Cytochem.*, 129-141.
71. Dupré, L., Marangoni, F., Scaramuzza, S., Trifari, S., Hernández, R.J., Aiuti, A., Naldini, L., Roncarolo, M.G., 2006: Efficacy of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome using a WAS promoter/cDNA-containing lentiviral vector and nonlethal irradiation. *Hum. Gene Ther.*, 17, 303-313.
72. Dupré, L., Trifari, S., Follenzi, A., Marangoni, F., Lain de Lera, T., Bernad, A., Martino, S., Tsuchiya, S., Bordignon, C., Naldini, L., Aiuti, A., Roncarolo, M.G., 2004: Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients leads to functional correction. *Mol. Ther.*, 903-915.
73. El Fakhry, Y., Alturaihi, H., Diallo, D., Merhi, Y., Mourad, W., 2010: Critical role of lipid rafts in CD154-mediated T cell signaling. *Eur. J. Immunol.*, 40, 770-779.
74. Engelman, A., 1999: In vivo analysis of retroviral integrase structure and function. *Adv. Virus Res.*, 52, 411-426.
75. Escarpe, P., Zayek, N., Chin, P., Borellini, F., Zufferey, R., Veres, G., Kiermer, V., 2003: Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparations. *Mol. Ther.*, 332-341.
76. Etzioni, A., Ochs, H., 2004: The hyper IgM syndrome: an evolving story. *Pediatr. Res.*, 56, 519-525.

77. Fanslow, W., Srinivasan, S., Paxton, R., Gibson, MG., Spriggs, MK., Armitage, RJ., 1994: Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function. *Semin. Immunol.*, 6, 267-278.
78. Farson, D., Witt, R., McGuinness, R., Dull, T., Kelly, M., Song, J., Radeke, R., Bukovsky, A., Consiglio, A., Naldini, L., 2001: A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.*, 12, 981-997.
79. Fehse, B., Kustikova, OS., Bubenheim, M., Baum, C., 2004: Pois(s)on--it's a question of dose... *Gene Ther.*, 11(11), 879-881.
80. Fernández-Rubio, P., Torres-Rusillo, S., Molina, IJ., 2015: Regulated expression of murine Cd40l by a lentiviral vector transcriptionally targeted through its endogenous promoter. *J. Gene Med.*, 17(10-12), 219-228.
81. Ferrand, C., Robinet, E., Contassot, E., Certoux, JM., Lim, A., Hervé, P., Tiberghien, P., 2000: Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes: influence of the transduction(selection process and of ex vivo expansion on T cell receptor beta chain hypervariable region repertoire. *Hum. Gene Ther.* 11, 1151-1164.
82. Ferrari, S., Giliani, S., Insalaco, A., Al-Ghonaïum, A., Soresina, AR., Loubser, M., Avanzini, MA., Marconi, M., Badolato, R., Ugazio, AG., Levy, Y., Catalan, N., Durandy, A., Tbakhi, A., Notarangelo, LD., Plebani, A., 2001: Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12614-12619.
83. Fischer, A., 2004: Human primary immunodeficiency diseases: a perspective. *Nat. Immunol.*, 5(1), 23-30.
84. Follenzi, A., Sabatino, G., Lombardo, A., Boccaccio, C., Naldini, L., 2002: Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes in vivo by improved lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.*, 13, 243-260.

Bibliografia

85. Follenzi, A., Ailles, LE., Bakovic, S., Geuna, M., Naldini, L., 2000: Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat. Genet.*, 25, 217-222.
86. Foy, T., Aruffo, A., Bajorath, J., Buhlmann, JE., Noelle, RJ., 1996: Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu. Rev. Immunol.*, 14, 591-617.
87. Frecha, C., Lévy, C., Costa, C., Nègre, D., Amirache, F., Buckland, R., Russell, SJ., Cosset, FL., Verhoeyen, E., 2011: Measles virus glycoprotein-pseudotyped lentiviral vector-mediated gene transfer into quiescent lymphocytes requires binding to both SLAM and CD46 entry receptors. *J. Virol.*, 85, 5975-5985.
88. Frecha, C., Toscano, MG., Costa, C., Saez-Lara, MJ., Cosset, FL., Verhoeyen, E., Martin, F., 2008: Improved lentiviral vectors for Wiskott-Aldrich syndrome gene therapy mimic endogenous expression profiles throughout haematopoiesis. *Gene Ther.*, 15, 930-941.
89. Frecha, C., Lévy, C., Cosset, FL., Verhoeyen, E., 2010: Advances in the field of lentivector-based transduction of T and B lymphocytes for gene therapy. *Mol. Ther.*, 18, 1748-1757.
90. Friedmann, T., Roblin, R., 1972: Gene therapy for human genetic disease? *J. Clin. Immunol.* 175(4025), 949-955.
91. Fry, T., Mackall, CL., 2001: Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol.*, 22, 564-571.
92. Fuleihan, R., Ramesh, N., Horner, A., Ahern, D., Belshaw, PJ., Alberg, DG., Stamenkovic, I., Harmon, W., Geha, RS. , 1994: Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 93(3), 1315–1320.
93. Furger, A., Monks, J., Proudfoot, NJ., 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, 11735-11746.

94. Fusil, F., Calattini, S., Amirache, F., Costa, C., Lévy, C., Frecha, C., Fusil, F., Nègre, D., Lavillette, D., Cosset, FL., Verhoeven, E., 2015: Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Mol. Ther.*, 124(8), 1734-1747.
95. Gaj, T., Gersbach, CA., Barbas, CF. 3rd., 2013: ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.*, 31, 397-405.
96. Galloway, P., Swingle, S., Song, J., Bushman, F., Trono, D., 1995a: HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell*, 83, 569-576.
97. Galloway, P., Swingle, S., Aiken, C., Trono, D., 1995b: HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell*, 80, 379-388.
98. Gardlík, R., Pálffy, R., Hodosy, J., Lukács, J., Turna, J., Celec, P., 2005: Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med. Sci. Monit.*, 11, RA110-121.
99. Gardulf, A., Hammarstrom, L., Gustafson, R., Ericson, D., Frøland, SS., Gustafson, R., Hammarström, L., Jacobsen, MB., Jonsson, E., Möller, G., 1995: Subcutaneous immunoglobulin replacement in patients with primary antibody deficiencies: safety and costs. *Lancet*. 345(8946), 365-369.
100. Gaspar, HB., Cooray, S., Gilmour, KC., Parsley, KL., Zhang, F., Adams, S., Bjorkegren, E., Bayford, J., Brown, L., Davies, EG., Veys, P., Fairbanks, L., Bordon, V., Petropoulou, T., Kinnon, C., Thrasher, AJ., 2011a: Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. *Sci. Transl. Med.*, 3(97), 97ra80.
101. Gaspar, HB., Cooray, S., Gilmour, KC., Parsley, KL., Adams, S., Howe, SJ., Al Ghonaium, A., Bayford, J., Brown, L., Davies, EG., Kinnon, C., Thrasher, AJ., 2011b: Long-term persistence of a polyclonal T cell repertoire after gene

Bibliografia

- therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Sci. Transl. Med.*, 3(97), 97ra79.
102. Gaspar, HB., Parsley, KL., Howe, S., King, D., Gilmour, KC., Sinclair, J., Brouns, G., Schmidt, M., Von Kalle, C., Barington, T., Jakobsen, MA., Christensen, HO., Al Ghoniaim, A., White, HN., Smith, JL., Levinsky, RJ., Ali, RR., Kinnon, C., Thrasher, AJ., 2004: Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet.*, 364(9452), 2181-2187.
103. Gaspar, HB., Aiuti, A., Porta, F., Candotti, F., Hershfield, MS., Notarangelo, LD., 2009: How I treat ADA deficiency. *Blood*, 114, 3524-3532.
104. Gennery, A., Khawaja, K., Veys, P., Bredius, RG., Notarangelo, LD., Mazzolari, E., Fischer, A., Landais, P., Cavazzana-Calvo, M., Friedrich, W., Fasth, A., Wulffraat, NM., Matthes-Martin, S., Bensoussan, D., Bordigoni, P., Lange, A., Pagliuca, A., Andolina, M., Cant, AJ., Davies, EG., 2004: Treatment of CD40 ligand deficiency by hematopoietic stem cell transplantation: a survey of the European experience, 1993-2002. *Blood*, 1152-1157.
105. Genovese, P., Schirotti, G., Escobar, G., Di Tomaso, T., Firrito, C., Calabria, A., Moi, D., Mazzieri, R., Bonini, C., Holmes, MC., Gregory, PD., van der Burg, M., Gentner, B., Montini, E., Lombardo, A., Naldini, L., 2014: Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature*, 510, 235-240.
106. Georgievska, B., Jakobsson, J., Persson, E., Ericson, C., Kirik, D., Lundberg, C., 2004: Regulated delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor into rat striatum, using a tetracycline-dependent lentiviral vector. *Hum. Gene Ther.*, 15, 934-944.
107. Ghosh, S., Thrasher, AJ., Gaspar, HB., 2015: Gene therapy for monogenic disorders of the bone marrow. *Br. J. Haematol.*

108. Ginn, S., Fleming, J., Rowe, PB., Alexander, IE., 2003: Promoter interference mediated by the U3 region in early-generation HIV-1-derived lentivirus vectors can influence detection of transgene expression in a cell-type and species-specific manner. *Hum. Gene Ther.*, 14, 1127-1137.
109. Graf, D., Muller, S., Korthauer, U., van Kooten, C., Weise, C., Kroczeck, RA., 1995: A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur. J. Immunol.*, 1749-1754.
110. Griffith, L., Cowan, MJ., Kohn, DB., Notarangelo, LD., Puck, JM., Schultz, KR., Buckley, RH., Eapen, M., Kamani, NR., O'Reilly, RJ., Parkman, R., Roifman, CM., Sullivan, KE., Filipovich, AH., Fleisher, TA., Shearer, WT., 2008: Allogeneic hematopoietic cell transplantation for primary immune deficiency diseases: current status and critical needs. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1087-1096.
111. Grossmann, M., Brown, MP., Brenner, MK., 1997: Antitumor responses induced by transgenic expression of CD40 ligand. *Hum. Gene Ther.*, 8, 1935-1943.
112. Gruber, A., Kan-Mitchell, J., Kuhlen, KL., Mukai, T., Wong-Staal, F., 2000: Dendritic cells transduced by multiply deleted HIV-1 vectors exhibit normal phenotypes and functions and elicit an HIV-specific cytotoxic T-lymphocyte response *in vitro*. *Blood.*, 96(4), 1327-1333.
113. Günzburg, W., Salmons, B., 1986: Mouse mammary tumor virus mediated transfer and expression of neomycin resistance to infected cultured cells. *Virology*, 155, 236-248.
114. Hacein-Bey Abina, S., Gaspar, H.B., Blondeau, J., Caccavelli, L., Charrier, S., Buckland, K., Picard, C., Six, E., Himoudi, N., Gilmour, K., McNicol, AM., Hara, H., Xu-Bayford, J., Rivat, C., Touzot, F., Mavilio, F., Lim, A., Treluyer, JM., Héritier, S., Lefrère, F., Magalon, J., Pengue-Koyi, I., Honnet, G., Blanche, S., Sherman, EA., Male, F., Berry, C., Malani, N., Bushman, FD., Fischer, A., Thrasher, AJ., Galy, A., Cavazzana, M., 2015: Outcomes Following

Bibliografia

- Gene Therapy in Patients With Severe Wiskott Aldrich Syndrome. *JAMA*, 313(15), 1550-1563.
115. Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, GP., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., Asnafi, V., MacIntyre, E., Dal Cortivo, L., Radford, I., Brousse, N., Sigaux, F., Moshous, D., Hauer, J., Borkhardt, A., Belohradsky, BH., Wintergerst, U., Velez, MC., Leiva, L., Sorensen, R., Wulffraat, N., Blanche, S., Bushman, FD., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., 2008: Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* 118(9), 3132-3142.
116. Hacein-Bey-Abina, S., Pai, SY., Gaspar, HB., Armant, M., Berry, CC., Blanche, S., Bleesing, J., Blondeau, J., de Boer, H., Buckland, KF., Caccavelli, L., Cros, G., De Oliveira, S., Fernández, KS., Guo, D., Harris, CE., Hopkins, G., Lehmann, LE., Lim, A., London, WB. van der Loo, JCM., Malani, N., Male, F., Malik, P., Marinovic, MA., McNicol, AM., Moshous, D., Neven, B., Oleastro, M., Picard, C., Ritz, J., Rivat, C., Schambach, A., Shaw, KL., Sherman, EA., Silberstein, LE., Six, E., Touzot, F., Tsytsykova, A., Xu-Bayford, J., Baum, C., Bushman, FD., Fischer, A., Kohn, DB., Filipovich, AH., Notarangelo, LD., Cavazzana, M., Williams, DA., Thrasher, AJ., 2014: A modified gamma-retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.*, 371, 1407–1417.
117. Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, JL., Fraser, CC., Cavazzana-Calvo, M., Fischer, A., 2003a: A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.*, 348, 255-256.
118. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, MP., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, CS., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, JI., de Saint Basile, G., Alexander, I.,

- Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, LE., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, TH., Le Deist, F., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., 2003b: LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 302, 415-419.
119. Hacein-Bey-Abina, S., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., 2002: Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Int. J. Hematol.*, 76, 295-298.
120. Haddad, E., Landais, P., Friedrich, W., Gerritsen, B., Cavazzana-Calvo, M., Morgan, G., Bertrand, Y., Fath, A., Porta, F., Cant, A., Espanol, T., Müller, S., Veys, P., Vossen, J., Fischer, A., 1998: Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: a European retrospective study of 116 patients. *Blood*, 91(10), 3646-3653.
121. Hadzic, N., Pagliuca, A., Rela, M., Portmann, B., Jones, A., Veys, P., Heaton, ND., Mufti, GJ., Mieli-Vergan, G., 2000: Correction of the Hyper-IgM syndrome after liver and bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.*, 320-324.
122. Han, S., Hathcock, K., Zhen, B., Kepler, TB., Hodes, R., Kelsoe, G., 1995: Cellular interactions in germinal centers: roles of CD40L and B7-2 in established germinal centers. *J. Immunol.*, 155(2), 556-561.
123. Hanawa, H., Persons, DA., Nienhuis, AW., 2002: High-level erythroid lineage-directed gene expression using globin gene regulatory elements after lentiviral vector-mediated gene transfer into primitive human and murine hematopoietic cells. *Hum. Gene Ther.*, 13(17), 2007-2016.
124. Hartley, J., Rowe, WP., Huebner, RJ., 1970: Host-range restrictions of murine leukemia viruses in mouse embryo cell cultures. *J. Virol.*, 5, 221-225.

Bibliografia

125. Hassan, GS., Stagg, J., Mourad, W., 2015: Role of CD154 in cancer pathogenesis and immunotherapy. *Cancer Treat. Rev.*, 41, 431-440.
126. Hayward, A., Levy, J., Facchetti, F., Notarangelo, L., Ochs, HD., Etzioni, A., Bonnefoy, JY., Cosyns, M., Weinberg, A., 1997: Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *J. Immunol.*, 158(2), 977-983.
127. Heinkelein, M., Dressler, M., Jármay, G., Rammling, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Rethwilm, A., 2002: Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J. Virol.*, 76, 3774-3783.
128. Heinzinger, NK., Bukrinsky, MI., Haggerty, SA., Ragland, AM., Kewalramani, V., Lee, MA., Gendelman, HE., Ratner, L., Stevenson, M., Emerman, M., 1994: The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 7311-7315.
129. Held, P., Olivares, EC., Aguilar, CP., Finegold, M., Calos, MP., Grompe, M., 2005: In vivo correction of murine hereditary tyrosinemia type I by phiC31 integrase-mediated gene delivery. *Mol. Ther.*, 11, 399-408.
130. Hematti, P., Hong, BK., Ferguson, C., Adler, R., Hanawa, H., Sellers, S., Holt, IE., Eckfeldt, CE., Sharma, Y., Schmidt, M., von Kalle, C., Persons, DA., Billings, EM., Verfaillie, CM., Nienhuis, AW., Wolfsberg, TG., Dunbar, CE., Calmels, B., 2004: Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells. *PLoS Biol.*, 2(12), e423.
131. Henn, V., Slupsky, JR., Gräfe, M., Anagnostopoulos, I., Förster, R., Müller-Berghaus, G., Kroczeck, RA., 1998: CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 391(6667), 591-594.
132. Heyworth, P., Cross AR., Curnutte JT., 2003: Chronic granulomatous disease. *Curr. Opin. Immunol.*, 578-584.

133. Hill, L., Mollison, PL., 1971: Hypogammaglobulinaemia in the United Kingdom. II. Collection of cases and design of trial. *Spec. Rep. Ser. Med. Res. Counc. (G.B.)*, 310, 4-8.
134. Himathongkham, S., Luciw, PA., 1996: Restriction of HIV-1 (subtype B) replication at the entry step in rhesus macaque cells. *Virology*, 219, 485-488.
135. Hino, S., Fan, J., Taguwa, S., Akasaka, K., Matsuoka, M., 2004: Sea urchin insulator protects lentiviral vector from silencing by maintaining active chromatin structure. *Gene Ther.*, 11(10), 819-828.
136. Hirschhorn, R., Yang, DR., Puck, JM., Huie, ML., Jiang, CK., Kurlandsky, LE., 1996: Spontaneous *in vivo* reversion to normal of an inherited mutation in a patient with adenosine deaminase deficiency. *Nat. Genet.*, 13(3), 290-295.
137. Hochreiter-Hufford, A., Ravichandran, KS., 2013: Clearing the Death: Apoptotic Cell Sensing, Recognition, Engulfment, and Digestion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5(1), a008748.
138. Hollenbaugh, D., Grosmaire, LS., Kullas, CD., Chalupny, NJ., Braesch-Andersen, S., Noelle, RJ., Stamenkovic, I., Ledbetter, JA., Aruffo, A., 1992: The human T antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B-cell co-stimulatory activity., *EMBO J.*, 11(12), 4313-4321.
139. Horowitz, M., Gale, RP., Sondel, PM., Goldman, JM., Kersey, J., Kolb, HJ., Rimm, AA., Ringdén, O., Rozman, C., Speck, B., 1990: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, 75(3), 555-562.
140. Hsu, Y., Lucci, J., Su, L., Ehrenfels, B., Garber, E., Thomas, D., 1997: Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 272(2), 911-915.
141. Hwang, W., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, ML., Tsai, SQ., Sander, JD., Peterson, RT., Yeh, JR., Joung, JK., 2013: Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR/Cas system. *Nat. Biotechnol.*, 31(3), 227-229.

Bibliografia

142. Imai, K., Slupphaug, G., Lee, WI., Revy, P., Nonoyama, S., Catalan, N., Yel, L., Forveille, M., Kavli, B., Krokan, HE., Ochs, HD., Fischer, A., Durandy, A., 2003: Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat. Immunol.*, 1023-1028.
143. Jain, A., Kovacs, JA., Nelson, DL., Migueles, SA., Pittaluga, S., Fanslow, W., Fan, X., Wong, DW., Massey, J., Hornung, R., Brown, MR., Spinner, JJ., Liu, S., Davey, V., Hill, HA., Ochs, H., Fleisher, TA., 2011: Partial immune reconstitution of X-linked hyper IgM syndrome with recombinant CD40 ligand. *Blood.*, 118(14), 3811-3817.
144. Jain, A., Atkinson, TP., Lipsky, PE., Slater, JE., Nelson, DL., Strober, W., 1999: Defects of T-cell effector function and post-thymic maturation in X-linked hyper-IgM syndrome. *J. Clin. Invest.*, 103(8), 1151-1158.
145. Jain, A., , Ma, CA., Liu, S., Brown, M., Cohen, J., Strober, W., 2001: Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohydrotic ectodermal dysplasia. *Nat. Immunol.*, 2(3), 223-228.
146. Jang, Y., Collector, MI., Baylin, SB., Diehl, AM., Sharkis, SJ., 2004: Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat. Cell Biol.*, 6(6), 532-539.
147. Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., Marraffini, LA., 2013: RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.*, 31, 233-239ff.
148. Johansen, J., Rosenblad, C., Andsberg, K., Møller, A., Lundberg, C., Björlund, A., Johansen, TE., 2002: Evaluation of Tet-on system to avoid transgene down-regulation in ex vivo gene transfer to the CNS. *Gene Ther.*, 9(19), 1291-1301.
149. Johnson-Leger, C., Christensen, J., Klaus, GG., 1998: CD28 costimulation stabilizes the expression of the CD40 ligand on T cells. *Immunol.*, 10(8), 1083-1091.

150. Kafri, T., Blömer, U., Peterson, DA., Gage, FH., Verma, IM., 1997: Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat. Gen.*, 17(3), 314-317.
151. Kafri, T., van Praag, H., Gage, FH., Verma, IM., 2000: Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol. Ther.*, 1(6), 516-521.
152. Kai, M., Rothemberg, S., Landen, CN., Bellinger, DA., Leland, F., Toman, C., Finegold, M., Thompson, AR., Read, MS., Brinkhous, KM., 1993: In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science*, 262(5130), 117-119.
153. Kang, EM., Malech, HL., 2012: Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Methods Enzymol.*, 507: 125-154.
154. Kang, H., Bartholomae, CC., Paruzynski, A., Arens, A., Kim, S., Yu, SS., Hong, Y., Joo, CW., Yoon, NK., Rhim, JW., Kim, JG., Von Kalle, C., Schmidt, M., Kim, S., Ahn, HS., 2011: Retroviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease: results from phase I/II trial. *Mol. Ther.*, 19, 2092-2101.
155. Karpusas, M., Hsu, YM., Thompson, J., Lederman, S., Chess, L., Thomas, D., 1995: 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure*, 3(10), 1031-1039.
156. Kildebeck, E., Checketts, J., Porteus, M., 2012: Gene therapy for primary immunodeficiencies. *Curr. Opin. Pediatr.*, 24, 731-738.
157. Kim, Y., Cha, J., Chandrasegaran, S., 1996: Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93(3), 1156-1160.
158. Klein, T., Arentzen, R., Lewis, PA., Fitzpatrick-McElligott, S., 1992: Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Biotechnology (N.Y.)*, 10(3), 286-291.
159. Knudson, A., 2001: Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, 1(2), 157-162.

Bibliografia

160. Kohn, D., 2008: Gene therapy for childhood immunological diseases. *Bon. Mar. Trans.*, 41(2), 199-205.
161. Kohn, D., 2010: Update on gene therapy for immunodeficiencies. *Clin. Immunol.*, 135(2), 247-254.
162. Kohn, D., Weinberg, KI., Nolta, JA., Heiss, LN., Lenarsky, C., Crooks, GM., Hanley, ME., Annett, G., Brooks, JS., el-Khoureiy, A., 1995: Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat. Med.*, 1(10), 1017-1023.
163. Kootstra, N., Zwart, BM., Schuitemaker, H., 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), 1712-1717.
164. Korin, Y., Zack, JA., 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), 3161-3168.
165. Kucik, D., Dustin, ML., Miller, JM., Brown, EJ., 1996: Adhesion activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 97(9), 2139-2144.
166. Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, IL., Grompe, M., 2000: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.*, 6(11), 1229-1234.
167. Lai, M., Pifferi, M., Bush, A., Piras, M., Michelucci, A., Di Cicco, M., del Grosso, A., Quaranta, P., Cursi, C., Tantillo, E., Franceschi, S., Chiara Mazzanti, MC., Simi, P., Saggese, G., Boner, A., Pistello, M., 2016: Gene editing of *DNAH11* restores normal cilia motility in primary ciliary dyskinesia. *J. Med. Genet.* doi:10.1136/jmedgenet-2015-103539

168. Lai, Z., Brady, RO., 2002: Gene transfer into the central nervous system in vivo using a recombinant lentivirus vector. *J. Neurosci. Res.*, 67(3), 363-371.
169. Lane, P., Traunecker, A., Hubele, S., Inui, S., Lanzavecchia, A., Gray, D., 1992: Activated human T cells express a ligand for the human B-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 22(10), 2573-2578.
170. Laufs, S., Gentner, B., Nagy, KZ., Jauch, A., Benner, A., Naundorf, S., Kuehlcke, K., Schiedlmeier, B., Ho, AD., Zeller, WJ., Fruehauf, S., 2003: Retroviral vector integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells. *Blood*, 101(6), 2191-2198.
171. Laurie, K., Blundell, MP., Baxendale, HE., Howe, SJ., Sinclair, J., Qasim, W., Brunsberg, U., Thrasher, AJ., Holmdahl, R., Gustafsson, K., 2007: Cell-specific and efficient expression in mouse and human B cells by a novel hybrid immunoglobulin promoter in a lentiviral vector. *Gene Ther.*, 14(23), 1623-1631.
172. Le Doux, J., Davis, HE., Morgan, JR., Yarmush, ML., 1999: Kinetics of retrovirus production and decay. *Biotechnol. Bioeng.*, 63(6), 654-662.
173. Lederman, S., Yellin, M. J., Inghirami, G., Lee, JJ., Knowles, DM., Chess, L., 1992: Molecular interactions mediating T-B lymphocyte collaboration in human lymphoid follicles. Roles of T cell-B cell-activating molecule (5c8 antigen) and CD40 in contact-dependent help. *J. Immunol.*, 149(12), 3817-3826.
174. Lei, T., Scott, DW., 2005: Induction of tolerance to factor VIII inhibitors by gene therapy with immunodominant A2 and C2 domains presented by B cells as Ig fusion proteins. *Blood*, 105(12), 4865-4870.
175. Lewis, P., Emerman, M., 1994: Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.*, 61(1), 510-516.
176. Li, H., Haurigot, V., Doyon, Y., Li, T., Wong, SY., Bhagwat, AS., Malani, N., Anguela, XM., Sharma, R., Ivanciu, L., Murphy, SL., Finn, JD., Khazi, FR.,

Bibliografia

- Zhou, S., Paschon, DE., Rebar, EJ., Bushman, FD., Gregory, PD., Holmes, MC., High, KA., 2011: In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature*, 475(7355), 217-221.
177. Li, L., Biagi, E., Allen, C., Shivakumar, R., Weiss, JM., Feller, S., Yvon, E., Fratantoni, JC., Liu, LN., 2006a: Rapid and efficient nonviral gene delivery of CD154 to primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Cancer Gene Ther.*, 13(2), 215-224.
178. Li, S., Huang, L., 2006b: Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther.*, 13(18), 1313-1319.
179. Li, S., Ma, Z., 2001: Non viral gene therapy. *Curr. Gene Ther.*, 1(2), 201-226.
180. Lotti, F., Menguzzato, E., Rossi, C., Naldini, L., Ailles, L., Mavilio, F., Ferrari, G., 2002: Transcriptional targeting of lentiviral vectors by long terminal repeat enhancer replacement. *J. Virol.*, 76(8), 3996-4007.
181. Loubaki, L., Semlali, A., Boisvert, M., Jacques, E., Plante, S., Aoudjit, F., Mourad, W., Chakir, J., 2010: Crosstalk between T cells and bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects involves CD40L/alpha 5 beta 1 interaction. *Mol. Immunol.*, 47(11-12), 2112-2118.
182. Léveillé, C., Bouillon, M., Guo, W., Bolduc, J., Sharif-Askari, E., El-Fakhry, Y., Reyes-Moreno, C., Lapointe, R., Merhi, Y., Wilkins, JA., Mourad, W., 2007: CD40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling. *J. Biol. Chem.*, 282(8), 5143-5151.
183. Mach, F., Schönbeck, U., Sukhova, GK., Bourcier, T., Bonnefoy, JY., Pober, JS., Libby, P., 1997: Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94(5), 1931-1936.
184. Maetzig, T., Brugman, MH., Bartels, S., Heinz, N., Kustikova, OS., Modlich, U., Li, Z., Galla, M., Schiedlmeier, B., Schambach, A., Baum, C., 2011a:

- Polyclonal fluctuation of lentiviral vector-transduced and expanded murine hematopoietic stem cells. *Blood*, 117(11), 3053-3064.
185. Maetzig, T., Galla, M., Baum, C., Schambach, A., 2011b: Gammaretroviral vectors: biology, technology and application. *Viruses*, 3(6), 677-713.
186. Mali, P., Yang, L., Esvelt, KM., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, JE., Norville, JE., Church, GM., 2013: RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823-826.
187. Mann, R., Mulligan, RC., Baltimore, D., 1983: Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell*, 33(1), 153-159.
188. Marini, B., Kertesz-Farkas, A., Ali, H., Lucic, B., Lisek, K., Manganaro, L., Pongor, S., Luzzati, R., Recchia, A., Mavilio, F., Giacca, M., Lusic, M., 2015: Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection. *Nature Letter.*, 521(7551), 227-231.
189. Marodon, G., Mouly, E., Blair, EJ., Frisen, C., Lemoine, FM., Klatzmann, D., 2003: Specific transgene expression in human and mouse CD4+ cells using lentiviral vectors with regulatory sequences from the CD4 gene. *Blood*, 101(9), 3416-3423.
190. Martín, F., Toscano, MG., Blundell, M., Frecha, C., Srivastava, GK., Santamaría, M., Thrasher, AJ., Molina, IJ., 2005: Lentiviral vectors transcriptionally targeted to hematopoietic cells by WASP gene proximal promoter sequences. *Gene Ther.*, 12(8), 715-723.
191. Martín-Hernández, J., Sørensen, AB., Pedersen, FS., 2001: Murine leukemia virus proviral insertions between the N-ras and unr genes in B-cell lymphoma DNA affect the expression of N-ras only. *J. Virol.*, 75(23), 11907-11912.
192. Mavilio, F., 2016: International, multicenter gene therapy trials for monogenic blood disease. Oral Communication at International Workshop: Advances of gene

Bibliografia

- therapy in monogenic diseases affecting the hematopoietic system. Madrid, Spain.
193. Mazzei, G., Edgerton, MD., Losberger, C., Lecoanet-Henchoz, S., Graber, P., Durandy, A., Gauchat, JF., Bernard, A., Allet, B., Bonnefoy, JY., 1995: Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J. Biol. Chem.*, 270(13), 7025-7028.
194. Mingozzi, F., High, KA., 2011: Therapeutic *in vivo* gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat. Rev. Gen.*, 12(5), 341-355.
195. Michel, G., Yu, Y., Chang, T., Yee, JK., 2010: Site-specific Gene Insertion Mediated by a Cre-loxP-carrying Lentiviral Vector. *Mol. Ther.*, 18(10): 1814-1821.
196. Mitchell, RS., Beitzel, BF., Schroder, AR., Shinn, P., Chen, H., Berry, CC., Ecker, JR., Bushman, FD., 2004: Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol*, 2(8), E234.
197. Miyoshi, H., Takahashi, M., Gage, FH., Verma, IM., 1997: Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94(19), 10319-10323.
198. Miyoshi, H., Blömer, U., Takahashi, M., Gage, FH., Verma, IM., 1998: Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol.*, 72(10), 8150-8157.
199. Mock, U., Thiele, R., Uhde, A., Fehse, B., Horn, S., 2012: Efficient lentiviral transduction and transgene expression in primary human B cells. *Hum. Gene Ther. Met.*, 23(6), 408-415.
200. Modlich, U., Bohne, J., Schmidt, M., von Kalle, C., Knöss, S., Schambach, A., Baum, C., 2006: Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood*, 108(8), 2545-2553.
201. Modlich, U., Navarro, S., Zychlinski, D., Maetzig, T., Knoess, S., Brugman, MH., Schambach, A., Charrier, S., Galy, A., Thrasher, AJ., Bueren, J., Baum, C.,

- 2009: Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Mol. Ther.*, 17(11), 1919-1928.
202. Moffett, S., Brown, DA., Linder, ME., 2000: Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J. Biol. Chem.*, 275(3), 2191-2198.
203. Molina, I., Kenney, DM., Rosen, FS., Remold-O'Donnell, E., 1992: T cell lines characterize events in the pathogenesis of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Exp. Med.*, 176(3), 867-874.
204. Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Bartholomae, CC., Ranzani, M., Benedicenti, F., Sergi, LS., Ambrosi, A., Ponzoni, M., Doglioni, C., Di Serio, C., von Kalle, C., Naldini, L., 2009: The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J. Clin. Invest.*, 119(4), 964-975.
205. Moreau, T., Bardin, F., Imbert, J., Chabannon, C., Tonnelles, C., 2004: Restriction of transgene expression to the B-lymphoid progeny of human lentivirally transduced CD34+ cells. *Mol. Ther.*, 10(1), 45-56.
206. Moreau-Gaudry, F., Xia, P., Jiang, G., Perelman, NP., Bauer, G., Ellis, J., Surinya, KH., Mavilio, F., Shen, CK., Malik, P., 2001: High-level erythroid-specific gene expression in primary human and murine hematopoietic cells with self-inactivating lentiviral vectors. *Blood*, 98(9), 2664-2672.
207. Morizono, K., Bristol, G., Xie, YM., Kung, SK., Chen, IS., 2001: Antibody-directed targeting of retroviral vectors via cell surface antigens. *J. Virol.*, 75(17), 8016-8020.
208. Mukherjee, S., Thrasher, AJ., 2013: Gene Therapy for PID's: progress, pitfalls and prospects. *Gene*, 174-181.
209. Naldini, L., 2015: Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, 526(7573), 351-360.

Bibliografia

210. Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, FH., Verma, IM., Trono, D., 1996: In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272(5259), 263-267.
211. Narezkina, A., Taganov, KD., Litwin, S., Stoyanova, R., Hayashi, J., Seeger, C., Skalka, AM., Katz, RA., 2004: Genome-wide analyses of avian sarcoma virus integration sites. *J. Virol.*, 78(21), 11656-11663.
212. Neumann, E., Schaeffer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, PH., 1982: Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.*, 1(7), 841-845.
213. Nieto, A., Cabrera, CM., Catalina, P., Cobo, F., Barnie, A., Cortés, JL., Barroso del Jesus, A., Montes, R., Concha, A., 2007: Effect of mitomycin-C on human foreskin fibroblasts used as feeders in human embryonic stem cells: Immunocytochemistry MIB1 score and DNA ploidy and apoptosis evaluated by flow cytometry. *Cell Bio. Int.*, 31(3), 269-278.
214. Norcross, M., 1984: A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann. Immunol. (Paris)*, 135D(2), 113-134.
215. Notarangelo, L., 2010: Primary immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 125, S182-194.
216. Notarangelo, L., Duse, M., Ugazio, AG., 1992: Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM). *Immunodef. Rev.*, 3(2), 101-121.
217. Notarangelo, N., Fischer, A., Geha, RS., Casanova, JL., Chapel, H., Conley, ME., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Hammartröm, L., Nonoyama, S., Ochs, HD., Puck, J., Roifman, C., Seger, R., Wedgwood, J., 2009: Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 124(6), 1161-1178.
218. Notarangelo, LD., Harris, C., Cattaneo, F., Wladkowski, M., Armant, M., Kao, GS., Wielgosz, M., Nienhuis, AW., Modlich, U., Brugman, M., Schambach, A., Rothe, M., Thornhill, SI., Gaspar, HB., Parsley, K., Cooray, S., Grassman,

- E., Bushman, F., Shupien, S., Oleastro, M., Hacein-Bey-Abina, S., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., Malik, P., Filipovich, A., Kohn, DB., Baum, C., Williams, DA., Thrasher, AJ., 2011: Somatic gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency using a self-inactivating modified gammaretroviral vector results in an improved preclinical safety profile and early clinical efficacy in a human patient. Oral communication, 58th ASH Annual Meeting & Exposition.
219. Nègre, D., Cosset, FL., 2002: Vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIV). *Biochimie*, 84(11), 1161-1171.
220. Oertel, M., Rosencrantz, R., Chen, YQ., Thota, PN., Sandhu, JS., Dabeva, MD., Pacchia, AL., Adelson, ME., Dougherty, JP., Shafritz, DA., 2003: Repopulation of rat liver by fetal hepatoblasts and adult hepatocytes transduced ex vivo with lentiviral vectors. *Hepatology*, 37(5), 994-1005.
221. Paul, W., Seder, RA., 1994: Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, 76(2), 241-251.
222. Peluffo, H., Foster, E., Ahmed, SG., Lago, N., Hutson, TH., Moon, L., Yip, P., Wanisch, K., Caraballo-Miralles, V., Olmos, G., Lladó, J., McMahon, SB., Yáñez-Muñoz, RJ., 2013: Efficient gene expression from integration-deficient lentiviral vectors in the espinal cord. *Gen. Ther.*, 20(6), 645-657.
223. Perez, E., Wang, J., Miller, JC., Jouvenot, Y., Kim, KA., Liu, O., Wang, N., Lee, G., Bartsevich, VV., Lee, YL., Guschin, DY., Rupniewski, I., Waite, AJ., Carpenito, C., Carroll, RG., Orange, JS., Urnov, FD., Rebar, EJ., Ando, D., Gregory, PD., Riley, JL., Holmes, MC., June, CH., 2008: Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.*, 26(7), 808-816.

Bibliografia

224. Pessach, I., Notarangelo, LD., 2011: Gene therapy for primary immunodeficiencies: looking ahead, toward gene correction. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 127, 1344-1350.
225. Pirnia, F., Schneider, E., Betticher, DC., Borner, MM., 2002: Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway. *Cell Death Differ.*, 9(9), 905-914ff.
226. Plesa, G., Dai, J., Baytop, C., Riley, JL., June, CH., O'Doherty, U., 2007: Addition of deoxynucleosides enhances human immunodeficiency virus type 1 integration and 2LTR formation in resting CD4+ T cells. *J. Virol.*, 81(24), 13938-13942.
227. Poeschla, E., Wong-Staal, F., Looney, DJ., 1998: Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat. Med.*, 4(3), 354-357.
228. Prasad, K., Andre, P., He, M., Bao, M., Manganello, J., Phillips, DR., 2003: Soluble CD40 ligand induces $\beta 3$ integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proced. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(21), 12367-12371.
229. Puttaraju, M., Jamison, SF., Mansfield, SG., Garcia-Blanco, MA., Mitchell, LG., 1999: Spliceosome-mediated RNA *trans-splicing* as a tool for gene therapy. *Nat. Biotechnol.*, 17(3), 246-252.
230. Qamar, N., Fuleihan, RL., 2014: The hyper IgM syndromes. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 46(2), 120-130.
231. Qasim, W., Gaspar, HB., Thrasher, AJ., 2009: Progress and prospects: gene therapy for inherited immunodeficiencies. *Gene Ther.*, 16(11), 1285-1291.
232. Qian, Y., Wang, H., Clarke, SH., 2004: Impaired clearance of apoptotic cells induces the activation of autoreactive anto-Sm marginal zone and B-1 B cells. *J. Immunol.*, 172(1), 625-635.

233. Ramezani, A., Hawley, TS., Hawley, RG., 2008: Combinatorial incorporation of enhancer-blocking components of the chicken beta-globin 5'HS4 and human T-cell receptor alpha/delta BEAD-1 insulators in self-inactivating retroviral vectors reduces their genotoxic potential. *Stem Cell*, 26(12), 3257-3266.
234. Reiser, J., Lai, Z., Zhang, XY., Brady, RO., 2000: Development of multigene and regulated lentivirus vectors. *J. Virol.*, 74(22), 10589-10599.
235. Renshaw, B., Fanslow, WC., Armitage, RJ., Campbell, KA. Liggitt, D., Wright, B., Davison, BL., Maliszewski, CR., 1994: Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 180(5), 1889-1900.
236. Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, AG., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, LD., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A., Durandy, A., 2000: Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*, 102(5), 565-575.
237. Reyon, D., Tsai, SQ., Khayter, C., Foden, JA., Sander, JD., Joung, JK., 2012: FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat. Biotechnol.*, 30(5), 460-465.
238. Rivat, C., Santilli, G., Gaspar, HB., Thrasher, A., 2012: Gene therapy for primary immunodeficiencies. *Hum. Gene Ther.*, 23(7), 668-675.
239. Roe, T., Reynolds, TC., Yu, G., Brown, PO., 1993: Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.*, 12(5), 2099-2108.
240. Romero García, Z., 2009: Desarrollo de vectores lentivirales para terapia génica del Síndrome de Híper-IgM ligado al cromosoma X (X-HIGM1). Doctorado en "Inmunología Molecular y Celular", Universidad de Granada, Repositorio de la Universidad de Granada.

Bibliografía

241. Romero, Z., Torres, S., Cobo, M., Muñoz, P., Unciti, JD., Martín, F., Molina, IJ., 2011: A tissue-specific, activation-inducible, lentiviral vector regulated by human CD40L proximal promoter sequences. *Gene Ther*, 18(4), 364-371.
242. Rosen, F., Kevy, SV., Janeway, CA., Gitlin, D., 1961: Recurrent bacterial infections and dysgamma-globulinemia: deficiency of 7S gamma-globulins in the presence of elevated 19S gamma-globulins. Report of two cases. *Pediatrics*, 28, 182-195.
243. Roy, M., Waldschmidt, T., Aruffo, A., Ledbetter, JA., Noelle, RJ., 1993: The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells. *J. Immunol.*, 151(5), 2497-2510.
244. Sacco, M., Ungari, M., Catò, EM., Villa, A., Strina, D., Notarangelo, LD., Jonkers, J., Zecca, L., Facchetti, F., Vezzoni, P., 2000: Lymphoid abnormalities in CD40 ligand transgenic mice suggest the need for tight regulation in gene therapy approaches to hyper immunoglobulin M (IgM) syndrome. *Cancer Gene Ther.*, 7(10), 1299-1306.
245. Sánchez-Madrid, F., del Pozo, MA., 1999: Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.*, 18(3), 501-511.
246. Sanders, D., 2002: No false start for novel pseudotyped vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 437-442.
247. Santilli, G., Almarza, E., Brendel, C., Choi, U., Beilin, C., Blundell, MP., Haria, S., Parsley, KL., Kinnon, C., Malech, HL., Bueren, JA., Grez, M., Thrasher, AJ., 2011: Biochemical correction of X-CGD by a novel chimeric promoter regulating high levels of transgene expression in myeloid cells. *Mol. Ther.*, 19(1), 122-132.
248. Santulli-Marotto, S., Retter, MW., Gee, R., Mamula, MJ., Clarke, SH., 1998: Autoreactive B Cell Regulation: Peripheral Induction of Development Arrest by Lupus-Associated Autoantigens. *Immunity*, 8(2), 209-219.

249. Scaramuzza, S., Biasco, L., Ripamonti, A., Castiello MC, Loperfido M, Draghici E, Hernandez RJ, Benedicenti F, Radrizzani M, Salomoni M, Ranzani M, Bartholomae CC, Vicenzi E, Finocchi A, Bredius R, Bosticardo, M., Schmidt, M., von Kalle, C., Montini, E., Biffi, A., Roncarolo, MG., Naldini, L., Villa, A., Aiuti, A., 2013: Preclinical Safety and Efficacy of Human CD34+ Cells Transduced With Lentiviral Vector for the Treatment of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Mol. Ther.*, 21(1), 175-184.
250. Schambach, A., Galla, M., Maetzig, T., Loew, R., Baum, C., 2007: Improving transcriptional termination of self-inactivating gamma-retroviral and lentiviral vectors. *Mol. Ther.*, 15(6), 1167-1173.
251. Schiller, S., Bekeredjian-Ding, I., Heyder, P., Blank, N., Ho, AD., Lorenz, HM., 2008: Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death and Differentiation.*, 15(1), 183-191.
252. Schlegel, A., Schaller, J., Jentsch, P., Kempf, C., 1993: Semliki Forest virus core protein fragmentation: its possible role in nucleocapsid disassembly. *Biosci. Rep.*, 13(6), 333-347.
253. Scholl, P., O'Gorman, MR., Pachman, LM., Haut, P., Kletzel, M., 1998: Correction of neutropenia and hypogammaglobulinemia in X-linked hyper-IgM syndrome by allogeneic bone marrow transplantation. *Bon. Mar. Trans.*, 22(12), 1215-1218.
254. Schröder, A., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, JR., Bushman, F., 2002: HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, 110(4), 521-529.
255. Schönbeck, U., Libby, P., 2001: The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 4-43.
256. Segall, H., Sutton, RE., 2003: Detection of replication-competent lentiviral particles. *Met. Mol. Biol.*, 229, 87-94.

Bibliografia

257. Serafini, M., Naldini, L., Introna, M., 2004: Molecular evidence of inefficient transduction of proliferating human B lymphocytes by VSV-pseudotyped HIV-1-derived lentivectors. *Virology*, 325(2), 413-424.
258. Seyama, K., Nonoyama, S., Gangsaas, I., Hollenbaugh, D., Pabst, HF., Aruffo, A., Ochs, HD., 1998: Mutations of the CD40 ligand gene and its effect on CD40 ligand expression in patients with X-linked hyper IgM syndrome. *Blood*, 92(7), 2421-2434.
259. Seyama, K., Osborne, WR., Ochs, HD., 1999: CD40 ligand mutants responsible for X-linked hyper-IgM syndrome associate with wild type CD40 ligand. *J. Biol. Chem.*, 274(16), 11310-11320.
260. Shimotohno, K., Temin, HM., 1981: Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell*, 26(1), 67-77ff.
261. Silva, G., Poirot, L., Galetto, R., Smith, J., Montoya, G., Duchateau, P., Pâques, F., 2011: Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Curr. Gene Ther.*, 11(1), 11-27.
262. Sirven, A., Pflumio, F., Zennou, V., Titeux, M., Vainchenker, W., Coulombel, L., Dubart-Kupperschmitt, A., Charneau, P., 2000: The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood*, 96(13), 4103-4110.
263. Smith, C., Farrah, T., Goodwin, RG., 1994: The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, 76(6), 959-962.
264. Soldner, F., Laganière, J., Cheng, AW., Hockemeyer, D., Gao, Q., Alagappan, R., Khurana, V., Golbe, LI., Myers, RH., Lindquist, S., Zhang, L., Guschin, D., Fong, LK., Vu, BJ., Meng, X., Urnov, FD., Rebar, EJ., Gregory, PD., Zhang,

- HS., Jaenisch, R., 2011: Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell*, 146(2), 318-331.
265. Spaner, D., Bahlo, A., 2011: *Experimental and Applied Immunotherapy*. (Book). Springer Science+Business Media.
266. Spriggs, M., Armitage, R.J., Strockbine, L. *et al.*, Clifford, KN., Macduff, BM., Sato, TA., Maliszewski, CR., Fanslow, WC., 1992: Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *J. Exp. Med.*, 176(6), 1543-1550.
267. Stein, S., Ott, MG., Schultze-Strasser, S., Jauch, A., Burwinkel, B., Kinner, A., Schmidt, M., Krämer, A., Schwäble, J., Glimm, H., Koehl, U., Preiss, C., Ball, C., Martin, H., Göhring, G., Schwarzwaelder, K., Hofmann, WK., Karakaya, K., Tchatchou, S., Yang, R., Reinecke, P., Kühlcke, K., Schlegelberger, B., Thrasher, AJ., Hoelzer, D., Seger, R., von Kalle, C., Grez, M., 2010: Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat. Med.*, 16(2), 198-204.
268. Stevenson, M., Stanwick, TL., Dempsey, MP., Lamonica, CA., 1990: HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J.*, 9(5), 1551-1560.
269. Strebel, K., Luban, J., Jeang, KT., 2009: Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med.*, 7, 48.
270. Stripecke, R., Cardoso, AA., Pepper, KA., Skelton, DC., Yu, XJ., Mascarenhas, L., Weinberg, KI., Nadler, LM., Kohn, DB., 2000: Lentiviral vectors for efficient delivery of CD80 and granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor in human acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia cells to induce antileukemic immune responses. *Blood*, 96(4), 1317-1326.
271. Suerth, J., Maetzig, T., Brugman, MH., Heinz, N., Appelt, JU., Kaufmann, KB., Schmidt, M., Grez, M., Modlich, U., Baum, C., Schambach, A., 2012:

Bibliografia

- Alpharetroviral self-inactivating vectors: long-term transgene expression in murine hematopoietic cells and low genotoxicity. *Mol. Ther.*, 20(5), 1022-1032.
272. Suerth, J., Maetzig, T., Galla, M., Baum, C., Schambach, A., 2010: Self-inactivating alpharetroviral vectors with a split-packaging design. *J. Virol.*, 84(13), 6626-6635.
273. Sun, X., Yau, VK., Briggs, BJ., Whittaker, GR., 2005: Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology*, 338(1), 53-60.
274. Sutton, RE., Reitsma, MJ., Uchida, N., Brown, PO., 1999: Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1-based vectors is cell cycle dependent. *J. Virol.*, 73(5), 3649-3660.
275. Tahara, M., Pergolizzi, RG., Kobayashi, H., Krause, A., Luettich, K., Lesser, ML., Crystal, RG., 2004: Trans-splicing repair of CD40 ligand deficiency results in naturally regulated correction of a mouse model of hyper-IgM X-linked immunodeficiency. *Nat. Med.*, 10(8), 835-841.
276. Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, CI., Jenkins, NA., Copeland, NG., Suda, T., Nagata, S., 1994: Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*, 76(6), 969-976.
277. Tani-ichi, S., Maruyama, K., Kondo, N., Nagafuku, M., Kabayama, K., Inokuchi, JI., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y., Yagita, H., Kawano, S., Kosugi, A., 2005: Structure and function of lipid rafts in human activated T cells. *Int. Immunol.*, 17, 749-758.
278. Temin, H., Mizutani, S., 1970: RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226, 1211-1213.
279. Thomas, C., de Saint Basile, G., Le Deist, F., Theophile, D., Benkerrou, M., Haddad, E., Blanche, S., Fischer, A., 1995: Brief report: correction of X-linked hyper IgM syndrome by allogeneic bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.*, 333(7), 426-429.

280. Toscano, M., Frecha, C., Benabdellah, K., Cobo, M., Blundell, M., Thrasher, A.J., García-Olivares, E., Molina, I.J., Martín, F., 2008: Hematopoietic-specific lentiviral vectors circumvent cellular toxicity due to ectopic expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Hum. Gene Ther.*, 19(2), 179-197.
281. Toscano, M., Frecha, C., Ortega, C., Santamaría, M., Martín, F., Molina, I.J., 2004: Efficient lentiviral transduction of Herpesvirus saimiri immortalized T cells as a model for gene therapy in primary immunodeficiencies. *Gene Ther.*, 11(12), 956-961.
282. Touzot, F., Moshous, D., Creidy, R., Neven, B., Frange, P., Cros, G., Caccavelli, L., Blondeau, J., Magnani, A., Luby, J.M., Ternaux, B., Picard, C., Blanche, S., Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S., Cavazzana, M., 2015: Faster T-cell development following gene therapy compared to haplo-identical hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of SCID-X1. *Blood*, 125(23), 3563-3569.
283. Trono, D., 2003: Virology. Picking the right spot. *Science*, 300(5626), 1670-1671.
284. Tsitsikov, E., Ramesh, N., Geha, R.S., 1994: Structure of the murine CD40 ligand gene. *Mol. Immunol.*, 31(12), 895-900.
285. Tsurutani, N., Yasuda, J., Yamamoto, N., Choi, B.I., Kadokil, M., Iwakura, Y., 2007: Nuclear import of the preintegration complex is blocked upon infection by human immunodeficiency virus type 1 in mouse cells. *J. Virol.*, 81, 677-688.
286. Tsytsykova, A., Tsitsikov, E.N., Geha, R.S., 1996: The CD40L promoter contains nuclear factor of activated T cells-binding motifs which require AP-1 binding for activation of transcription. *J. Bio. Chem.*, 3763-3770.
287. Urnov, F., Miller, J.C., Lee, Y.L., Beausejour, C.M., Rock, J.M., Augustus, S., Jamieson, A.C., Porteus, M.H., Gregory, P.D., Holmes, M.C., 2005: Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 435, 646-651.

Bibliografia

288. van den Eertwegh, A., Noelle, R.J., Roy, M., Shepherd, D.M., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Boersma, W.J.A., Claassen, E., 1993: In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. I. In vivo expression of CD40 ligand, cytokines, and antibody production delineates sites of cognate T-B cell interactions. *J. Exp. Med.*, 178(5), 1555-1565.
289. van Kooten, C., Banchereau, J., 2000: CD40-CD40 ligand. *J. Leuk. Biol.*, 67(1), 2-17.
290. Vannucci, L., , Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L., Pistello, M., 2013: Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.*, 36(1), 1-22.
291. Vascotto, F., Le Roux, D., Lankar, D., Faure-André, G., Vargas, P., Guermonprez, P., Lennon-Duménil, A.M., 2007: Antigen presentation by B lymphocytes: how receptor signaling directs membrane trafficking. *Curr Opin Immunol.*, 19(1), 93-98.
292. Vatakis, D., Bristol, G., Wilkinson, T.A., Chow, S.A., Zack, J.A., 2007: Immediate activation fails to rescue efficient human immunodeficiency virus replication in quiescent CD4+ T cells. *J. Virol.*, 81(7), 3574-3582.
293. Vatakis, D., Kim, S., Kim, N., Chow, S.A., Zack, J.A., 2009: Human immunodeficiency virus integration efficiency and site selection in quiescent CD4+ T cells. *J. Virol.*, 83(12), 6222-6233.
294. Vigna, E., Cavalieri, S., Ailles, L., Geuna, M., Loew, R., Bujard, H., Naldini, L., 2002: Robust and efficient regulation of transgene expression in vivo by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors. *Mol. Ther.*, 5(3), 252-261.
295. Vogt, V., Simon, M.N., 1999: Mass determination of rous sarcoma virus virions by scanning transmission electron microscopy. *J. Virol.*, 73(8), 7050-7055.
296. Walther, W., Stein, U., 2000: Viral vectors for gene transfer: A review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs*, 60(2), 249-271.

297. Watanabe, S., Temin, HM., 1982: Encapsidation sequences for spleen necrosis virus, an avian retrovirus, are between the 5' long terminal repeat and the start of the gag gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79(19), 5986-5990.
298. Werner, M., Kraunus, J., Baum, C., Brocker, T., 2004: B-cell-specific transgene expression using a self-inactivating retroviral vector with human CD19 promoter and viral post-transcriptional regulatory element. *Gene Ther.*, 11(12), 992-1000.
299. Willems, J., Arnold, BP., Gregory, CD., 2014: Sinister self-sacrifice: the contribution of apoptosis to malignancy. *Front. Immunol.*, 5, 299.
300. Winkelstein, J., Marino, MC., Ochs, H., Fuleihan, R., Scholl, PR., Geha, R., Stiehm, ER., Conley, ME., 2003: The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients. *Medicine (Baltimore)*, 82(6), 373-384.
301. Wolff, J., Malone, RW., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, PL., 1990: Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247(4949 Pt. 1), 1465-1468.
302. Wotton, S., Stewart, M., Blyth, K., Vaillant, F., Kilbey, A., Neil, JC., Cameron, ER., 2002: Proviral insertion indicates a dominant oncogenic role for Runx1/AML-1 in T-cell lymphoma. *Cancer Res.*, 62(24), 7181-7185.
303. Wu, L., Sun, CW., Ryan, TM., Pawlik, KM., Ren, J., Townes, TM., 2006: Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. *Blood*, 108(4), 1183-1188.
304. Wu, X., Li, Y., Crise, B., Burgess, SM., 2003: Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*, 300(5626), 1749-1751.
305. Yu, W., Pirollo, KF., Rait, A., Yu, B., Xiang, LM., Huang, WQ., Zhou, Q., Ertem, G., Chang, EH., 2004: A sterically stabilized immunolipoplex for systemic administration of a therapeutic gene. *Gen. Ther.*, 11(19), 1434-1440.

Bibliografía

306. Yusufzai, TM., Felsenfeld, G., 2004: The 5'-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(23), 8620-8624.
307. Yáñez-Muñoz, R., Balagán, KS., MacNeil, A., Howe, SJ., Schmidt, M., Smith, AJ., Buch, P., MacLaren, RE., Anderson, PN., Barker, SE., Duran, Y., Bartholomae, C., von Kalle, C., Heckenlively, JR., Kinnon, C., Ali, RR., Thrasher, AJ., 2006: Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat. Med.*, 12(3), 348-353.
308. Zaiss, A., Son, S., Chang, LJ., 2002: RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy. *J. Virol.*, 76, 7209-7219.
309. Zhang, L., Thrasher, AJ., Gaspar, HB., 2013: Current progress on gene therapy for primary immunodeficiencies. *Gene Ther.*, 20(10), 963-969.
310. Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. 2000: A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.*, 7(1-2), 203-214.
311. Zhou, Q., Schneider, IC., Gallet, M., Kneissl, S., Buchholz, CJ., 2011: Resting lymphocyte transduction with measles virus glycoprotein pseudotyped lentiviral vectors relies on CD46 and SLAM. *Virology*, 413(2), 149-152..
312. Zhou, Y., Zhang, H., Siliciano, JD., Siliciano, RF., 2005: Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 decay following entry into resting CD4⁺ T cells. *J. Virol.*, 79(4), 2199-2210.
313. Zirlik, A., Maier, C., Gerdes, N., MacFarlane, L., Soosairajah, J., Bavendiek, U., Ahrens, I., Ernst, S., Bassler, N., Missiou, A., Patko, Z., Aikawa, M., Schönbeck, U., Bode, C., Libby, P., Peter, K., 2007: CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation*, 115(12), 1571-1580.
314. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, RJ., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., Trono, D., 1998: Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.*, 72(12), 9873-9880.

315. Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., Trono, D., 1997: Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.*, 15(9), 871-875.
316. Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D., Hope, T.J., 1999: Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.*, 73(4), 2886-2892.

Anexo Artículo Científico de Calidad

Regulated expression of murine CD40L by a lentiviral vector transcriptionally targeted through its endogenous promoter[†]

Pablo Fernández-Rubio

Sara Torres-Rusillo

Ignacio J. Molina*

Institute of Biopathology and Regenerative Medicine, Center for Biomedical Research, University of Granada. Health Sciences Technology Park, Armilla, Granada, Spain

*Correspondence to:

I. J. Molina, Institute of Biopathology and Regenerative Medicine, Center for Biomedical Research, University of Granada, Health Sciences Technology Park, Avda del Conocimiento, s/n 18016 Armilla, Granada, Spain.

E-mail: imolina@ugr.es

[†] This paper is dedicated to the everlasting memory of our colleague Dr. Jon Trout.

Abstract

Background Targeted lentiviral vectors may contribute to circumventing genotoxicity associated with uncontrolled transcription of therapeutic genes. Some vectors replacing strong viral sequences for gene promoters such as β -globin, CD4, CD19 or I γ k were able to drive tissue-specific expression of the transgene. Gene therapy, however, faces even greater hurdles when the therapeutic transgene is subject to strict regulatory mechanisms. This is the case of the CD40LG gene, which encodes for the CD154 (also known as CD40L) molecule, transiently expressed upon activation on CD4⁺ T cells. Mutations in this gene cause the X-linked hyper IgM syndrome (HIGM1) in humans because the interaction of CD40L with its ligand CD40 triggers signals that are critical for the immunobiology of B lymphocytes.

Methods We developed a lentiviral vector containing the murine Cd40lg cDNA under the control of its endogenous promoter.

Results The CD4⁺ BW5147 T cells transduced with the pCd40lg-Cd40lg lentiviral vector express CD40L only upon stimulation. The intensity of the expression correlates with the number of vector integrations per cell and detected molecules rapidly decay after removing the stimulating agent. The tissue-specific, activation-dependent and reversible expression of CD40L fully mimics the physiological induction and disappearance of the molecule from the surface of murine T lymphocytes. The functional activity of the regulated lentiviral vector is demonstrated by the ability of transduced BW5147 cells to promote the proliferation of purified B cell splenocytes.

Conclusions We have developed a fine-regulated lentiviral vector that can be a model for expressing molecules subject to stringent regulatory mechanisms. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords transcriptional targeting; HIGM1; CD40L; CD154; Hyper IgM syndrome; lentiviral vectors; regulated transgene expression

Introduction

Cumulative data obtained in gene therapy clinical trials have demonstrated the enormous therapeutic potential of this procedure. The comprehensive database maintained by the *Journal of Gene Medicine* (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>) reports 2076 clinical trials started in the field

Received: 16 February 2015

Revised: 6 July 2015

Accepted: 27 July 2015

since 1989 up to the present time. Among the different diseases targeted, patients suffering from primary immunodeficiencies have greatly benefited from applications of the procedure [1]. Attempts to cure X-linked severe combined immunodeficiencies were met with great success [2,3] and over 100 patients have experienced significant clinical improvement after modification of hematopoietic progenitors with therapeutic genes [1]. However, serious adverse effects appeared in some patients as a result of uncontrolled transcription because of the strong activity of the constitutive viral promoters used [4]. This fact brought the need for stringent biosafety requirements. One of the strategies considered was the development of regulated vectors aiming to achieve physiological expression of the transgene.

The use of tissue-specific promoters has been an attractive strategy for developing regulated vectors ensuring restricted expression of the transgene only in relevant tissues, thus avoiding any undesired effects related to ectopic expression. Constructs incorporating regulatory elements from promoter sequences such as, for example, the β -globin [5], CD4 [6], CD19 [7] or I κ k [8] have achieved restricted expression of the therapeutic transgene in targeted lineages. We and others showed that hematopoietic-specific expression of the gene mutated in the Wiskott–Aldrich syndrome can be efficiently achieved when vector transcription is driven by different fragments (1.6 kb or 0.5 kb) of the endogenous WASP promoter [9,10]. We also showed that WASP-regulated vectors circumvented cellular toxicity as a result of ectopic expression [11]. Furthermore, validation of this strategy was uncontested when the lentiviral vector controlled by the 1.6-kb promoter fragment was taken to a clinical trial in humans with remarkable success [12].

Achieving physiological expression is even more difficult if the expression of the mutated gene causing the disease is subject to tight regulation. This is the case of the X-linked hyper IgM syndrome (HIGM1), a disease arising from mutations in the *CD40LG* gene [13], which encodes for the CD154 molecule (also known as CD40L). CD40L is a type-II membrane glycoprotein with a complex folding pattern [14] that is rapidly expressed as homotrimers on CD4⁺ T cells upon activation [15,16]. The interaction of CD40L with its natural ligand on B cells, CD40, triggers signals that are essential for the immunobiology of B lymphocytes, including immunoglobulin isotype switching, cell proliferation and escape from apoptosis [17]. Reconstitution of an animal model of the disease with hematopoietic progenitors transduced with a therapeutic vector under the control of a constitutive promoter led to significant amelioration of the disease [18]. Unfortunately, over half of the treated animals developed a lymphoproliferative syndrome, probably as a result of the uncontrolled

expression of CD40L on developing thymocytes. However, if, instead of a gene replacement strategy, mice are reconstituted with progenitor cells repaired by a trans-splicing approach, the immunodeficiency is reversed and no side effects are observed [19].

In light of these facts, and in an attempt to develop suitable vectors for gene therapy of HIGM1, we generated a self-inactivating lentiviral vector where the therapeutic *CD40LG* cDNA was placed under the control of the endogenous human *CD40LG* promoter. This vector efficiently targeted T cells and expression was strictly dependent on activation, thus becoming the first tissue-specific, activation-inducible lentiviral vector [20].

To determine whether these features can be reproduced in other species and expanded to other experimental models, we constructed an equivalent lentiviral vector intended to achieve regulated expression of CD40L on mouse cells. In the present study, we report that the endogenous *Cd40lg* promoter is able to restrict the expression of the *Cd40lg* minigene to activated T cells. Furthermore, the expression of the transgene is fully functional and declines over time, which is a faithful reproduction of the conditions that lead to physiological expression of CD40L in the mouse.

Materials and methods

Cell lines and culture media

All cells were obtained from the Repository Bank of the University of Granada's Center for Scientific Instrumentation and were certified in accordance with accepted methods. Mouse cell lines BW5147 (AKR/J thymoma) and LL2-LLc (epithelial lung carcinoma) were grown in RPMI 1640 media, whereas C2C12 (myoblast) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Lonza Ibérica, Barcelona, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum (Lonza Ibérica), 100 μ M 2-mercaptoethanol, and 1% of glutamax, sodium pyruvate, and essential and non-essential amino acids (all from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Human 293T cells were grown in DMEM complete media.

Lymphocytes were obtained after homogenization of spleens and Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. B cells were purified from this resulting population by immunomagnetic negative selection using the Dynal Mouse B Cell Negative Isolation Kit (Dynal, Hammerfest, Norway). B cells were grown in complete media supplemented with recombinant interleukin (IL)-2, and murine IL-4 and IL-5 (RD Systems, Minneapolis, MN, USA). Purity of yielded populations was assessed prior use by flow cytometry staining with an anti-CD19 monoclonal antibody.

Plasmid construction and lentiviral vector production

The complete 1.2-kb murine *Cd40lg* promoter sequence [21] was placed upstream of the full-length *Cd40lg* cDNA to yield, by gene synthesis, the pCd40lg-Cd40lg_pMS plasmid (GeneArt, Regensburg, Germany) and then excised from this plasmid by *EcoRI/XhoI* restriction enzyme digestion (Promega, Fitchburg, WI, USA) and cloned into the pHR'SINcPPT-SEW lentiviral plasmid to obtain the pCd40lg-Cd40lg lentiviral vector. To construct the pSFFV-Cd40lg plasmid, we generated a *Cd40lg* amplification product by polymerase chain reaction (PCR) in which we had inserted a 5' *BglIII* sequence and a 3' *XhoI* using the primers F-*BglIII*-AGATCTATTCTTGGTCAGAAG and R-*XhoI*-TGGCTAAGATCTACAG. The product excised from a gel was cloned into the pGEM-Easy (Promega) intermediate plasmid, which was subject to a *BglIII/XhoI* digestion to yield the fragment that was subcloned into the pHR'SINcPPT-SEW lentiviral plasmid. All resulting plasmids were sequenced to verify the integrity of the subcloned cDNA. Lentiviral vector particles were produced by packaging 293T via co-transfection using the LipoD293™ DNA transfection reagent (SigmaGen Laboratories, Ijamsville, MD, USA), the construct plasmid together with the packaging plasmid pCDMVD8.91 and the envelope plasmid pMD.G, as described previously [22] (27 µg of DNA in total; 3:2:1 plasmid proportion). Briefly, exponentially growing cells were mixed with LipoD293 reagent in accordance with manufacturer's instructions. Viral supernatants were collected 48 and 72 h post-transfection, passed through a 0.45-mm filter (Nalgene, Rochester, NY, USA) and concentrated by loading them onto Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultracel 100k (Millipore, Darmstadt, Germany), followed by centrifugation at 2000 g, and then aliquoted and immediately stored at -80°C until further use.

Cell transduction and lentiviral titer

To determine the viral titer, 10⁵ exponentially growing 293T cells were seeded per well in 48-well plates and 1, 10 or 100 µl of viral supernatants were added up to a final volume of 1 ml of complete DMEM media in the presence of Polybrene Infection/Transfection Reagent (Millipore). Cells were incubated overnight with viral supernatants and media replaced at that point. Two weeks after the transduction, cells were harvested and the genomic DNA was extracted, and the number of vector integrations was calculated as indicated below. Cells were transduced as above using appropriate amounts of viral supernatants to achieve the desired multiplicity of infection. After transduction, cells were allowed to grow for a minimum of 5 days prior cell cytometry experiments and 2 weeks prior genomic DNA extraction.

Extraction of genomic DNA and calculation of viral integrations per cell

Cells were lysed and genomic DNA was extracted using DNAzol Reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. DNA pellets were resuspended in 8 mM NaOH and concentrations determined with a NanoDrop ND1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Real-time PCRs were performed in a thermocycler ABI Prism 7500 PCR detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the FasStart SYBR Green Master (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Murine *Cd40lg* was amplified using primers F-1759-TGTAAGCGAAGCCAACAGTAATG and R-1843-CATTACCAAGTTGCTTTTCATGGT, which target a 84-bp sequence spanning exons 4 and 5 of the gene. PCR conditions were: 50°C for 2 m, 95°C for 10 s, 40 × (95°C for 15 s, 58°C for 1 min), 4°C for 10 min. As control, we chose to amplify murine β-actin using primers Fbact-TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA and Rbact-GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA.

The number of insertions/cell was extrapolated from a reference curve obtained using a 10-fold increasing serial concentrations (1–10⁸) of the pSFFV-Cd40lg plasmid, starting with 0.6 µg of genomic DNA (approximately 10⁵ genomes). The mean value of insertions obtained from each sample was assessed after statistical analysis of three independent wells per sample and its standardization over control samples of untransduced cells.

Cell stimulation, antibodies and flow cytometry

Cells were stimulated for 7 h with 10 ng/ml of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) or phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) plus 0.5 µg/ml of ionomycin (Sigma). Antibodies used were: APC anti-mouse IgM, APC anti-mouse CD4, PE anti-mouse CD69, PE Armenian Hamster IgG Isotype Control Clone HTK888, FITC anti-mouse CD19 and FITC anti-mouse CD40 (all from Biolegend, San Diego, CA, USA) and PerCP-eFluor® 710 anti-Mouse CD40 Ligand (eBioscience, San Diego, CA, USA). Prior to staining, cells were blocked for 15 min on ice with 3% FCS in PBS, incubated with the appropriate antibody for 30 min on ice, washed and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA).

Cell proliferation assay

10⁷ primary B cells purified from splenocytes as described above were incubated for 5 min in the dark with 1 µM of

the vital dye 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate (CFSE; eBioscience). Cells were washed twice with PBS containing 2% FCS. 10^6 cells were seeded per well in 24-well plates and incubated for 72 h prior analysis by flow cytometry.

Results

To build upon our previous results regarding the regulated expression of lentiviral vectors where the human *CD40LG* cDNA is controlled by its endogenous promoter, and to determine whether or not this regulated expression can also be achieved in mouse cells, we constructed new vectors expressing murine *Cd40lg*. Figure 1 shows the strategy followed to obtain a regulated vector expressing this gene. The entire 1.2-kb endogenous mouse promoter, which includes the three potential regions for binding transcriptional factors, was placed upstream of the *Cd40lg* full-length cDNA. The integrity of the sequence was confirmed by sequencing. A second vector was also constructed where the *Cd40lg* promoter was replaced by the strong constitutive spleen forming focus virus (SFFV) promoter.

We chose BW5147 (AKR/J mouse thymoma) as our cellular model because these $CD4^+$ cells have a negligible expression of CD40L (Figure 2, upper), even after stimulation. Transduction of BW5147 cells with the constitutive pSFFV-*Cd40lg* vector yielded a strong expression (92.5%) of surface CD40L, with 4.7 copies per cell (Figure 2, center). Stimulation of cells resulted in an increased mean fluorescence intensity (MFI) of surface CD40L expression, although the percentage of cells expressing the molecule remained invariable. Interestingly,

unstimulated cells transduced with the regulated p*Cd40lg*-*Cd40lg* vector at 5.9 copies per cell showed minor expression of CD40L almost equivalent to that seen for untransduced cells (Figure 2, bottom left). Stimulation of cells, however, resulted in an increased percentage of cells expressing surface CD40L (19.5%) that was accompanied by a higher MFI value (Figure 2, central bottom). To determine whether the degree of surface expression of transduced cells directly correlated with the number of vector insertions per cell, the positive population resulting from stimulating BW5147 transduced with the p*Cd40lg*-*Cd40lg* vector was subject to immunoselection by cell sorting. Expansion of sorted cells gave rise to a population where the number of vector integrations per cells rose to 9.7. Resting cells had a low surface expression of CD40L (Figure 2, bottom right). Remarkably, stimulation of cells allowed strong expression of surface CD40L as determined by the percentage of positive cells (48.2%), as well as the increase in the MFI values (12.1 over 6.0) (Figure 2, bottom right).

Physiological expression of CD40L on $CD4^+$ peripheral cells is a rapid and transient event [16,23] where the presence of surface molecules decays over time. To further determine the physiological capabilities of the regulated p*Cd40lg*-*Cd40lg* vector, we stimulated the p*Cd40lg*-*Cd40lg* transduced BW5147 cells with PDBu instead of PMA. PDBu is also a phorbol ester, and an analog to PMA, which is less potent but significantly more water-soluble, and therefore can be eliminated from the culture by cell washing. This property was used to reproduce the behavior of T cells after encountering the antigen. PDBu stimulation of transduced cells assessed for 7 h results in CD40L surface and intensity expression (Figure 3, top

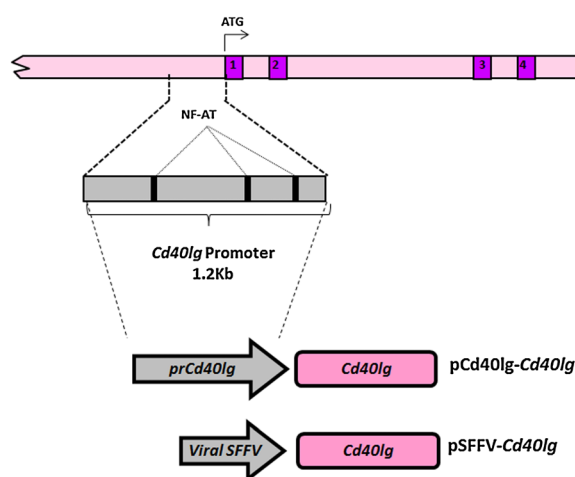


Figure 1. Strategy for constructing regulated and constitutive lentiviral vectors expressing murine CD40L. The entire 1.2-kb sequence of the murine promoter of the *Cd40lg* gene was placed upstream of the the full-length *Cd40lg* cDNA to generate the regulated p*Cd40lg*-*Cd40lg* lentiviral vector as indicated in the Materials and methods. The constitutive vector pSFFV-*Cd40lg* was obtained by placing the strong viral promoter of the SFFV in lieu of the endogenous promoter. The *CD40lg* promoter map indicates the place where NF-AT-responding sequences are located. The genomic organization of the *Cd40lg* gene is also shown.

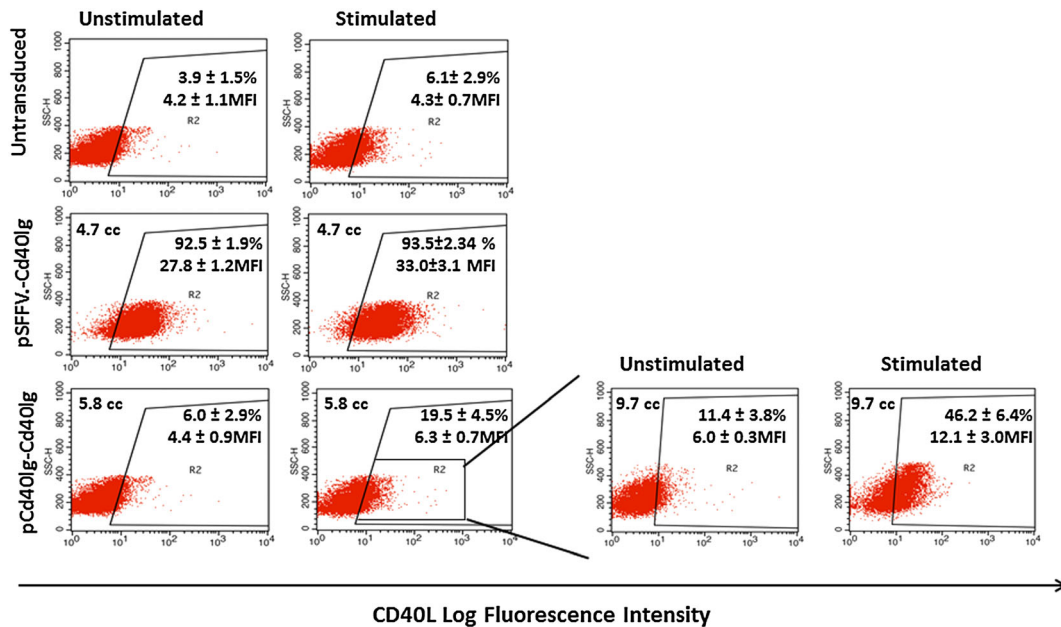


Figure 2. The expression of CD40L on BW5147 cells transduced with the regulated pCd40lg-Cd40lg lentiviral vector is dependent on cell stimulation and correlates with the number of vector integrations per cell. Expression of surface CD40L on BW5147 cells untransduced (top); transduced with the constitutive pSFFV-Cd40lg vector (central); or the regulated pCd40lg-Cd40lg lentiviral vector was assessed by flow cytometry on unstimulated (left) or cells stimulated with PMA plus ionomycin for 7 h (right). Percentage of positive cells gated within the positive region, mean fluorescence intensity values and number of vector integrations per cell are indicated inside the plots (mean \pm SD of all experiments performed). Positive cells transduced with the regulated pCd40lg-Cd40lg vector (central bottom) were enriched by cell sorting. Selected cells showed an increased number of vector integrations, percentage of positive cells upon stimulation and mean fluorescence intensity (bottom far right) compared to the unsorted cells. A representative experiment out of five repeats is illustrated.

right) equivalent to the values routinely observed for PMA-stimulated cells, such as those represented in Figure 2 (bottom far right). At this point, cells were washed to remove PDBu to mimic antigen clearance, and CD40L expression was assessed again, 20 h after the initial stimulation. Remarkably, the expression of CD40L on PDBu-washed cells rapidly decayed and returned to levels similar to those observed in untransduced cells (Figure 3, bottom). By contrast, the reversal of CD40L expression is not observed on cells where the stimulating agent remained in the culture (Figure 3, center). Cells stimulated with PMA, on the other hand, showed strong expression of CD40L that was not reverted by washes because this agent binds almost irreversibly to cell surfaces (data not shown).

Coupling of CD40 with its ligand CD40L triggers signals that promote B cell proliferation [24]. To determine whether the expressed CD40L molecule on the surface of cells was functional, BW5147 cells transduced with the regulated and constitutive vectors were co-cultured with purified spleen B cells. Stimulated and nonstimulated BW5147 cells transduced with the constitutive vector pSFFV-Cd40lg induced strong proliferation of B cells (Figure 4B, left and right). Remarkably, BW5147 cells transduced with the pCd40lg-Cd40lg regulated vector triggered a robust B cell proliferation (Figure 4C, right), whereas co-culture of B

cells with unstimulated transduced cells did not achieve cell proliferation above the basal levels observed with untransduced cells (Figure 4C, left).

To determine whether the expression of CD40L achieved by the pCd40lg-Cd40lg regulated vector was tissue-specific, we transduced the nonhematopoietic cells C2C12 (murine myoblasts), LL2LLc (murine lung carcinoma) and 293T (human embryonic kidney cells) with both regulated and constitutive CD40L-expressing vectors. Figure 5 shows a typical flow cytometric analyses of nontransduced cells (Figure 5, top) transduced with the constitutive pSFFV-Cd40lg vector (Figure 5, central) or with the pCd40lg-Cd40lg regulated vector (Figure 5, bottom). Although the three analyzed cell lines transduced with the constitutive vector (both stimulated and nonstimulated) strongly expressed CD40L, no expression of this molecule was observed above the background levels in any of the cell lines transduced with the regulated vector, regardless of their stimulation and despite the high number of vector integrations per cell (i.e. 21.2 copies for 293T cells; Figure 5, bottom right). Similar results were obtained with the Wehi B cell line and the CMT93 colorectal carcinoma cells. In both cases, strong CD40L surface expression was achieved with the constitutive vector, whereas transduction with the regulated

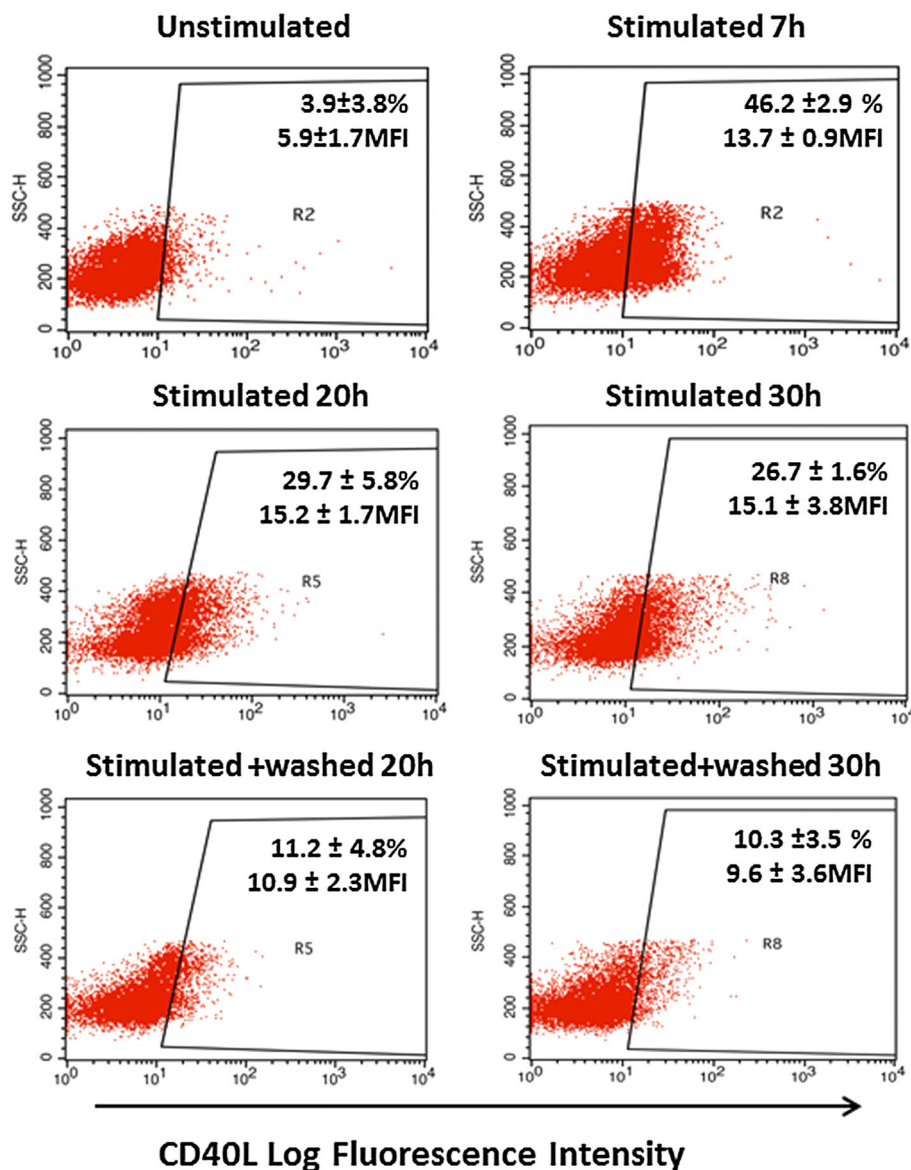


Figure 3. Transient expression of CD40L on stimulated BW5147 cells transduced with the pCd40lg-Cd40lg regulated lentiviral vector. Expression of CD40L on transduced cells was assessed at 7 h (top right), 20 h and 30 h after stimulation (central). Alternatively, the stimulating agent (PDBu plus ionomycin) was removed by washes after 7 h of initiation of the culture, and thereafter allowed to continue up to a total duration of 20 h (bottom left) or 30 h (bottom right), when CD40L surface expression was determined by flow cytometry. Percentages of positive cells and mean fluorescence intensity values are indicated within the plots (mean \pm SD of all experiments performed). A representative experiment out of three repeats is illustrated.

vector yielded no detectable expression of CD40L on both unstimulated and stimulated cells (data not shown), thus suggesting that expression of the therapeutic transgene is restricted to CD4⁺ T cells.

Discussion

The undesired side effects observed in some clinical trials of gene therapy, resulting from uncontrolled transcription

as a result of the strong viral promoters used [4], brought the need for the development of vectors containing stringent biosafety features. Substitution of constitutive promoters for endogenous, nonviral regulatory sequences allowed targeted expression of the therapeutic gene. Tissue-specific expression was achieved with vectors driven by promoters derived from the β -globin [5], CD4 [6], CD19 [7] or Ig- κ B [8], to name only a few. In this regard, the approach suggested by ourselves and others [9,10], where tissue-specific, physiologic and regulated expression of the WASP gene is achieved by inserting different fragments

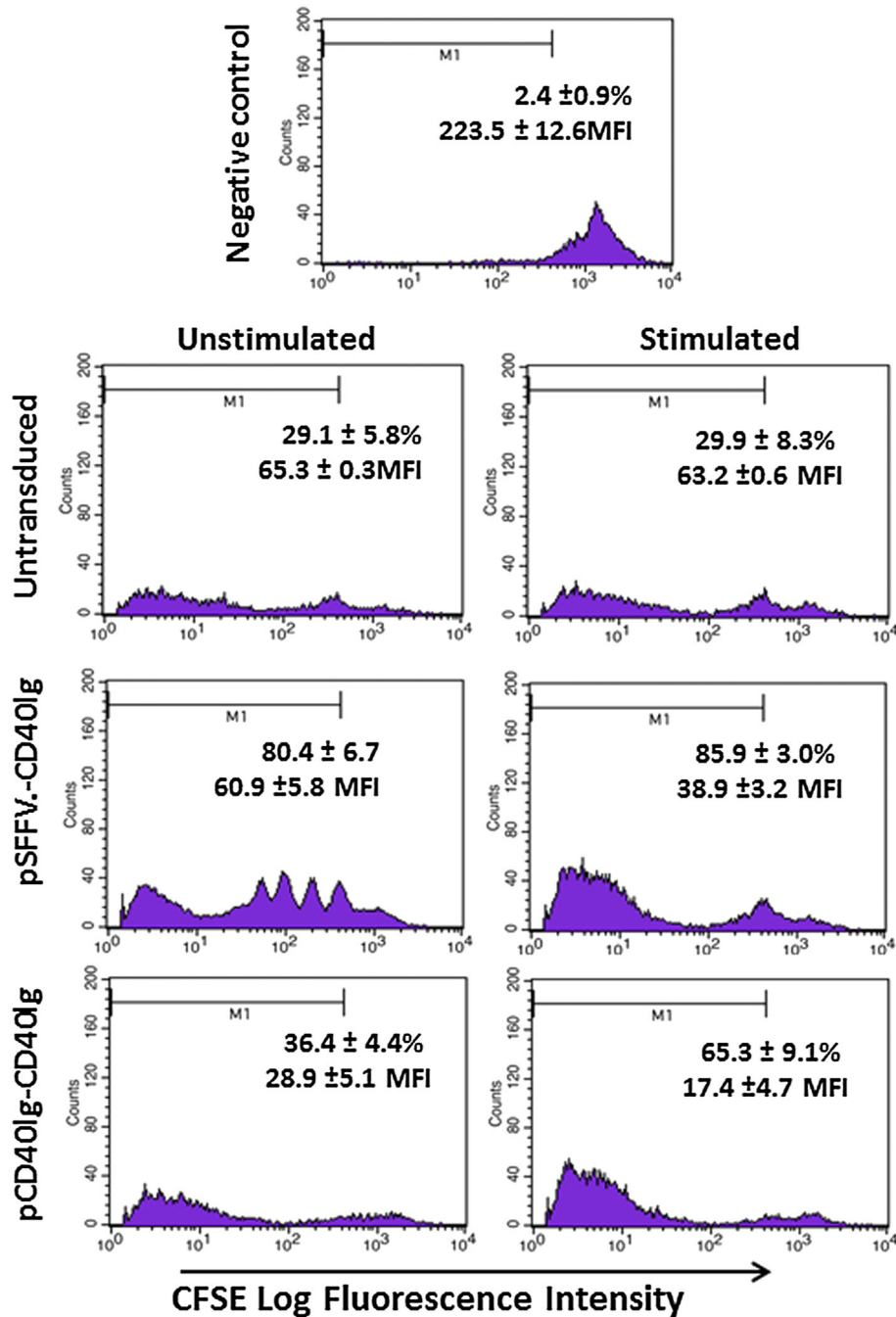


Figure 4. CD40L surface molecules expressed on BW5147 cells transduced with the regulated vector trigger B cell proliferation. Untransduced BW5147 cells (A) or transduced with either the constitutive (B) or regulated (C) vectors were either left unstimulated (left) or stimulated for 7 h with PMA plus ionomycin (right), inactivated by mitomycin-C treatment and co-cultured with purified B cell splenocytes. Flow cytometric analysis of CFSE fluorescence intensity was assessed 72 h after the start of the culture. Percentage of cells and mean fluorescence intensity values are indicated within the plots (mean \pm SD of all experiments performed). Resting B cells were used as a negative control to define the gating region (top central panel). The positive control consisted of B cells stimulated with lipopolysaccharide (not shown). A representative experiment out of five repeats is illustrated.

of the endogenous WASP promoter, has recently been used in a human clinical trial with significant success [12].

However, safe expression of the therapeutic transgene is even more difficult if the targeted gene is subject to

tight regulatory mechanisms, as is the case of the gene mutated in HIGM1. In a previous study, we succeeded in constructing a tissue-specific, activation inducible lentiviral vector driving the expression of the human

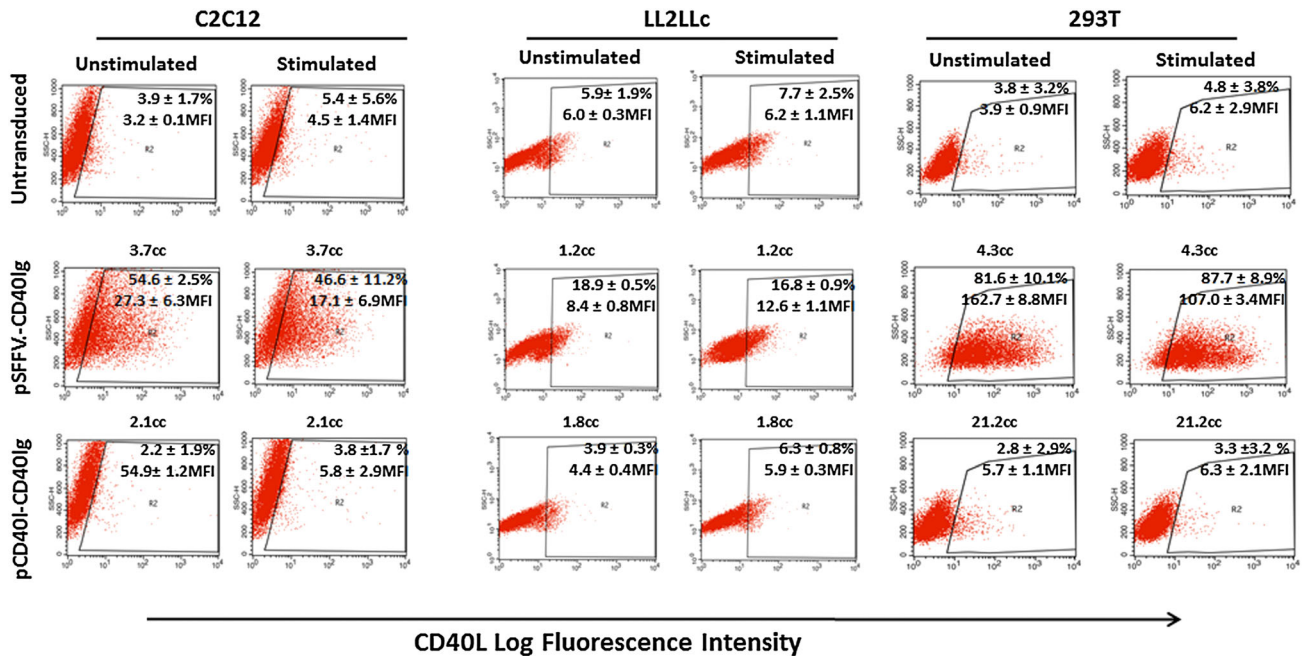


Figure 5. Nonhematopoietic cells transduced with the regulated pCd40lg-Cd40lg vector do not express surface CD40L despite good vector integration. C2C12 (murine myoblasts) (left); LL2LLc (murine lung carcinoma) (central); or 293T (human embryonic kidney cells) (right) were transduced with the constitutive pSFFV-Cd40lg (central) or regulated pCd40lg-Cd40lg (bottom) lentiviral vectors. Expression of CD40L was assessed by flow cytometry on unstimulated cells (left in each column) or after 7 h of stimulation with PMA + ionomycin (right in each column). Percentages of positive cells and mean fluorescence intensity values are indicated within the plots (mean \pm SD of all experiments performed). A representative experiment out of three repeats is illustrated.

CD40LG gene through its endogenous promoter. In the present study, we report evidence demonstrating that a similar activation-dependent targeted expression can be efficiently achieved in the mouse setting. Although transduction of the CD4⁺ BW5147 thymoma cells with the constitutive vector resulted in almost 100% CD40L surface expression in both stimulated and nonstimulated cells, their cellular counterparts transduced with the pCd40lg-Cd40lg regulated vector only expressed the protein upon cell activation. We note, however, that the level of expression achieved by the regulated vector, at similar number of vector integrations per cell, is significantly lower than that detected on cells transduced with the constitutive vector. This is probably related to a lower potency of the endogenous Cd40lg promoter because enrichment of CD40L-expressing cells by cell sorting yielded a population where a significant higher expression of the protein is observed in cells showing a higher number of vector insertions per cell (almost six copies in the unsorted population and 10 after immunoselection). These results are consistent with recent observations from our group in cells transduced with the human pCD40L-CD40L regulated vector because low copy numbers also yielded inefficient CD40L expression in a human context (Fernández-Rubio, P; Torres-Rusillo, S; Molina, I.J., unpublished work.). Therefore, obtaining multiple insertions for efficient transgene expression may represent another serious hurdle for the future application

of gene therapy to HIGM1 patients not only as a result of the technical difficulties related to high-efficiency transduction of progenitor cells, but also because of the increased likelihood of generating adverse effects.

The enriched CD40L population allowed us to clearly identify two key aspects of the regulation of this gene present in this transduced population. First, the expression of the protein occurs only in stimulated cells because the percentage of resting cells expressing CD40L is similar to that observed in untransduced cells. Second, the activation-dependent CD40L expression rapidly decays after removing the stimulating agent from the culture. This pattern of protein regulation faithfully resembles the dynamics of expression and disappearance of CD40L upon encounter and clearance of the antigen [16,23]. This is of particular importance for gene therapy of HIGM1. An elegant study showed that reconstitution of hematopoietic progenitors of CD40L-deficient mice led to major improvement of the functional defects observed in the mutant mice [18]. Surprisingly, over half of treated mice developed a thymic lymphoproliferative disease that was linked to the abnormal development of thymocytes that express CD40L throughout their differentiation. These observations were further supported by the fact that widespread ectopic CD40L expression in a transgenic mouse model was deleterious [25]. However, if the Cd40lg-replacement gene therapy approach is substituted by a targeted trans-splicing gene

reparation strategy, treated animals recover from the disease fully without the appearance of adverse effects [19]. Therefore, our vector fulfills two important requirements for gene therapy of HIGM1: activation-dependent and transient expression of the therapeutic protein. Another important element is that the expression is restricted to hematopoietic cells because transduction of the pCd40lg-Cd40lg vector into nonhematopoietic tumor cells does not result in protein expression despite relevant numbers of vector integrations per cell. This tissue-specificity is also fully coherent with the behavior of our human CD40L-expressing counterpart: the pCD40LG-CD40LG lentiviral vector [20]. Furthermore, the stringently regulated and physiological expression of both mouse and human vectors are only achieved when two conditions are met: (i) the endogenous promoter drives the expression of its own gene [20] and (ii) cell lineages should be species-matched. In this regard, we found that activated BW5147 mouse cells transduced with the regulated pCD40L-CD40L human vector are unable to express human CD40L on their cell membrane despite good vector integration (data not shown). Finally, the murine vector is fully functional because stimulated transduced cells are able to induce the proliferation of purified B cells from spleen.

In the present study, we provide further evidence suggesting that the strategy of constructing regulated vectors where the expression of the therapeutic gene is driven by its endogenous promoter has broad applications and merits further use. As noted earlier, most of the published regulated vectors use a tissue-specific promoter controlling a heterologous gene [5–8] that has been selected because of its expected potency to drive

gene transcription. This approach, however, does not always result in fine-regulated expression. For example, we showed that, even though *WASP* and *CD40LG* promoters stringently control the expression of their own genes within a lentiviral context, they are unable to regulate the expression of the eGFP reporter gene so efficiently [9,20] in that leaky expression was consistently observed. Because the restriction of the expression of the transgene is optimal when driven by its endogenous promoter, there are a number of alternatives compensating for a weak promoter. For example, enhancers or other elements such as the woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, which allows accumulation of transgenic mRNA, have been successfully employed [26]. Therefore, the combination of endogenous promoters and other regulatory elements may help to extend this approach for developing fine-regulated vectors, where their availability may be critical for tackling the treatment of diseases in which genes subject to tight regulation are involved.

Acknowledgements

We thank Dr. Francisco Martin for helpful suggestions. This work was supported by grant SAS111218 from the Andalusian Health Service. LJM's lab is currently supported by grant 12UDG01-ATF from Sparks, The children's medical charity. London, U.K. PFR was supported by a predoctoral fellowship from the FPU program, Ministry of Education, Culture and Sports of Spain. STR has a contract financed by the Sparks grant.

References

- Mukherjee S, Thrasher AJ. Gene therapy for PIDs: progress, pitfalls and prospects. *Gene* 2013; **525**: 174–181.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, De Saint BG, *et al.* Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; **288**: 669–672.
- Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, *et al.* Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 2004; **364**: 2181–2187.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; **302**: 415–419.
- Hanawa H, Persons DA, Nienhuis AW. High-level erythroid lineage-directed gene expression using globin gene regulatory elements after lentiviral vector-mediated gene transfer into primitive human and murine haematopoietic cells. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 2007–2016.
- Marodon G, Mouly E, Blair EJ, Frisen C, Lemoine FM, Klatzmann D. Specific transgene expression in human and mouse CD4⁺ cells using lentiviral vectors with regulatory sequences from the CD4 gene. *Blood* 2003; **101**: 3416–3423.
- Werner M, Kraunus J, Baum C, Brocker T. B-cell-specific transgene expression using a self-inactivating retroviral vector with human CD19 promoter and viral post-transcriptional regulatory element. *Gene Ther* 2004; **11**: 992–1000.
- Laurie KL, Blundell MP, Baxendale HE, *et al.* Cell-specific and efficient expression in mouse and human B cells by a novel hybrid immunoglobulin promoter in a lentiviral vector. *Gene Ther* 2007; **14**: 1623–1631.
- Martin F, Toscano MG, Blundell M, *et al.* Lentiviral vectors transcriptionally targeted to haematopoietic cells by WASP gene proximal promoter sequences. *Gene Ther* 2005; **12**: 715–723.
- Dupre L, Trifari S, Follenzi A, *et al.* Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott–Aldrich syndrome patients leads to functional correction. *Mol Ther* 2004; **10**: 903–915.
- Toscano MG, Frecha C, Benabdellah K, *et al.* Hematopoietic-specific lentiviral vectors circumvent cellular toxicity due to ectopic expression of Wiskott–Aldrich syndrome protein. *Hum Gene Ther* 2008; **19**: 179–197.
- Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, *et al.* Lentiviral haematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott–Aldrich syndrome. *Science* 2013; **341**: 1233151.
- Fuleihan R, Ramesh N, Loh R, *et al.* Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 2170–2173.

14. Karpusas M, Hsu YM, Wang JH, *et al.* 2 Å crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure* 1995; **3**: 1031–1039.
15. Lane P, Traunecker A, Hubele S, Inui S, Lanzavecchia A, Gray D. Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1992; **22**: 2573–2578.
16. Roy M, Waldschmidt T, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4⁺ T cells. *J Immunol* 1993; **151**: 2497–2510.
17. Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhlmann JE, Noelle RJ. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 591–617.
18. Brown MP, Topham DJ, Sangster MY, *et al.* Thymic lymphoproliferative disease after successful correction of CD40 ligand deficiency by gene transfer in mice. *Nat Med* 1998; **4**: 1253–1260.
19. Tahara M, Pergolizzi RG, Kobayashi H, *et al.* Trans-splicing repair of CD40 ligand deficiency results in naturally regulated correction of a mouse model of hyper-IgM X-linked immunodeficiency. *Nat Med* 2004; **10**: 835–841.
20. Romero Z, Torres S, Cobo M, *et al.* A tissue-specific, activation-inducible, lentiviral vector regulated by human CD40L proximal promoter sequences. *Gene Ther* 2011; **18**: 364–371.
21. Tsitsikov EN, Ramesh N, Geha RS. Structure of the murine CD40 ligand gene. *Mol Immunol* 1994; **31**: 895–900.
22. Toscano MG, Frecha C, Ortega C, Santamaria M, Martin F, Molina LJ. Efficient lentiviral transduction of Herpesvirus saimiri immortalized T cells as a model for gene therapy in primary immunodeficiencies. *Gene Ther* 2004; **11**: 956–961.
23. Castle BE, Kishimoto K, Stearns C, Brown ML, Kehry MR. Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes. *J Immunol* 1993; **151**: 1777–1788.
24. Spriggs MK, Armitage RJ, Strockbine L, *et al.* Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *J Exp Med* 1992; **176**: 1543–1550.
25. Sacco MG, Ungari M, Cato EM, *et al.* Lymphoid abnormalities in CD40 ligand transgenic mice suggest the need for tight regulation in gene therapy approaches to hyper immunoglobulin M (IgM) syndrome. *Cancer Gene Ther* 2000; **7**: 1299–1306.
26. Lotti F, Menguzzato E, Rossi C, *et al.* Transcriptional targeting of lentiviral vectors by long-terminal repeat enhancer replacement. *J Virol* 2002; **76**: 3996–4007.