de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Memòria justificativa de recerca de les convocatòries BCC, BE, BP, CTP-AIRE, DEBEQ, FI, INEFC, NANOS i PIV

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Nom de la convocatòria
FI

Llegenda per a les convocatòries:

BCC	Convocatòria de beques per a joves membres de comunitats catalanes a l'exterior
BE	Beques per a estades per a la recerca fora de Catalunya
BP	Convocatòria d'ajuts postdoctorals dins del programa Beatriu de Pinós
CTP-AIRE	Ajuts per accions de cooperació en el marc de la comunitat de treball dels Pirineus. Ajuts de mobilitat de personal investigador.
DEBEQ (Modalitat A3)	Beques de Cooperació Internacional i Desenvolupament
FI	Beques predoctorals per a la formació de personal investigador
INEFC	Beques predoctorals i de col·laboració, dins de l'àmbit de l'educació física i l'esport i les ciències aplicades a l'esport
NANOS	Beques de recerca per a la formació en el camp de les nanotecnologies
PIV	Beques de recerca per a professors i investigadors visitants a Catalunya

Títol del projecte: ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.

Manipulació genètica de vectors virals per a estratègies de teràpia gènica en malalties autoimmunes

Dades de l'investigador o beneficiari

Nom	Cognoms
Marta	Miralles Consuegra

Correu electrònic
Marta.Miralles@uab.cat

Dades del centre d'origen

Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG)
Universitat Autònoma de Barcelona
Edifici H 08193-Bellaterra
Barcelona
Spain

Tel. +34 93 581 4198
Fax. +34 93 581 4200

Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Número d'expedient 2008 FiA 567

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.

Via Th17, Adenovirus, Malaltia de Crohn, Teràpia Gènica, Immunomodulació

Data de presentació de la justificació
31/07/2008

MARTA MIRALLES CONSVEGRA

Nom i cognoms i signatura
del/de la investigador/a

Dr. Miguel Chillón Rodríguez

Visttiplau del/de la responsable de la
sol·licitud

Resum del projecte: cal adjuntar dos resums del document, l'un en anglès i l'altre en la llengua del document, on s'esmenti la durada de l'acció

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

Els tractaments actuals per a la Malaltia de Crohn es basen en l'administració de proteïnes recombinants amb capacitat immunosupressora. Aquests tractaments són sistèmics, crònics i causen el desenvolupament de efectes secundaris severs com infeccions amb patògens oportunistes i una major incidencia de tumors. Passar de una administració sistémica dels immunosupresosors a una administració local sembla clau per evitar la severitat i el nombre de complicacions secundàries. Ha sigut descrit recentment que el subconjunt cel·lular Th-17 juga un paper central en moltes malalties autoimmunes en humans, com ara la Malaltia de Crohn, Escleroderma, Artritis reumatoide o Psoriasis. Per determinar com la via del Th-17 es veu afectada durant el desenvolupament i els estadis aguts de la malaltia, analitzarem una gran bateria de interleuquines/citoquines i els macanismes intracel·lulars d'activació/inhibició de l'activitat de les cèl·lules del Sistema Immune. En un segon pas, clonarem els gens seleccionats relacionats amb la immunomodulació de la via del Th-17 en vectors recentment desenvolupats (adenovirus quimera 5/40 o diferents pseudotips d'AAVs), ja què hipotetitzem que una producció local d'immunomoduladors s'assolirà amb una eficiència major fent servir aquests vectors, evitant així els efectes secundaris. A aquests efectes, hem començat el projecte clonant els gens de la IL10 i del receptor transmembranal de la IL23 en adenovirus i en genomes d'AAV.

Resum en anglès (màxim 300 paraules)

Current treatments of Crohn's disease are based on the administration of recombinant proteins with immunosupressor effects. These treatments are systemic, chronic and cause the development of severe secondary effects as infections by opportunist pathogens and a higher incidence of tumours. Switching from systemic to local administration of the immunosuppressors seems key to avoid severity and the number of secondary complications. It has been recently described that Th-17 subset cells play a central role in many autoimmune diseases in humans, like Crohn's disease, Scleroderma, Rheumatoid arthritis or psoriasis. To determine how the Th-17 pathway is affected during the development and the acute stages of the disease, we will analyzed a wide battery of interleukines/cytokines and the intracellular mechanisms activating/inhibiting the activity of the immune cells. In a second step, we will clone selected genes related to immunomodulation of the Th-17 pathway in newly developed vectors (chimeric Ad5/40 adenovirus or different pseudotyped AAVs), since we hypothesize that local production of immunomodulators may be achieved at high efficiency using these vectors, thus avoiding the secondary effects. In this regard, we have already started the project by cloning the IL23 transmembrane receptor and the IL10 genes in the adenovirus and the AAV genomes.

Resum en anglès (màxim 300 paraules) – continuació -.

Finally, we will test, alone or in combination, the therapeutic potential of all the vectors produced, initially in an animal model for Crohn's Disease, and then in models for Scleroderma and Rheumatoid arthritis.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

Els resultats que es mostraran a continuació han sigut obtinguts des del gener del 2008 fins al moment present, període durant el qual he gaudit d'una beca FI (convocatòria 2007 - FI 2008); així doncs aproximadament un periode de 8 mesos. El motiu pel qual actualment em trobo en disposició de renunciar a la present beca és que m'ha sigut concedida la beca predoctoral de Formació de Professorat Universitari (FPU) del Ministerio de Ciencia e Innovación.
Els resultats exposats a continuació responen a un període relativament curt (8 mesos) de recerca, durant els quals moltes hores presencials han estat destinades al seguiment dels cursos del Màster Oficial en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina impartit en la Universitat Autònoma de Barcelona. Degut a això, els resultats no responen encara els objectius generals que van ser exposats en la sol·licitud de la beca FI; i que es tractaran d'assolir en el transcurs de la tesi doctoral que continua, sota el subvencionament de la beca FPU.
Tot i així, aquest període de recerca ha permès respondre molts dels objectius inicials, bàsics per al desenvolupament futur de la tesi doctoral. Així mateix, aquests resultats seran exposats el pròxim septembre en forma de tesina/treball de recerca de màster i avaluats per una comissió d'experts de la Universitat Autònoma de Barcelona.

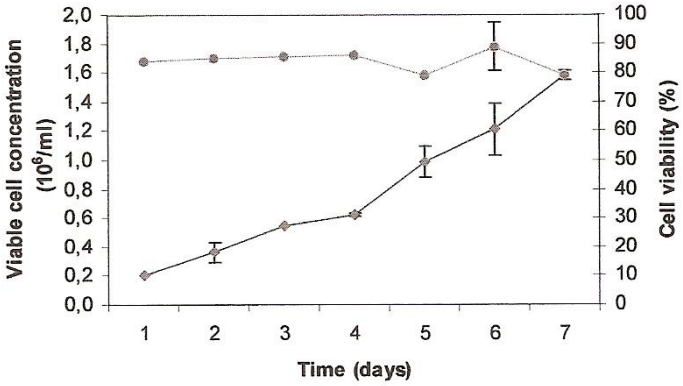
En el marc d'aquesta tesina ens hem marcat 3 objectius principalment:

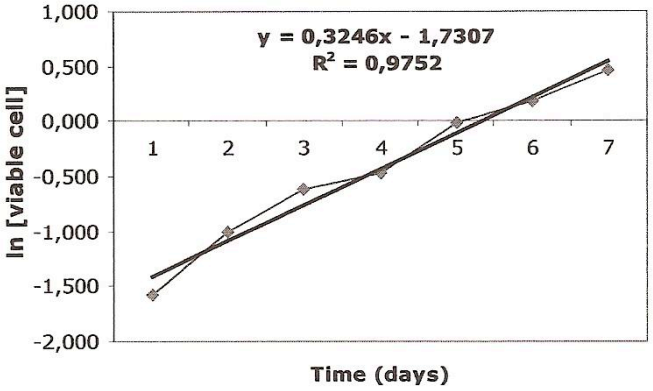
OBJECTIU 1: Optimitzar la producció d'Adenovirus quimera 5/40, mitjançant la seva amplificació en cèl·lules 211B, que sobreexpressen constitutivament proteïna fiber del serotip 5.

El nostre grup ha reportat recentment que els adenovirus quimera 5/40 tenen gran qualitats per ser bons vectors per a Teràpia Gènica en intestí; ja que tenen un gran tropisme intestinal. Malauradament la seva producció al laboratori és molt ineficient. Així doncs, s'ha ideat una estratègia d'amplificació d'aquests virus en un clon de cèl·lules 293 que sobreexpressen constitutivament la proteïna fiber del serotip 5; aquestes cèl·lules són anomenades 211B.

En primer lloc, ens vam proposar adaptar aquestes cèl·lules a créixer en suspensió i medi definit SFMII; degut a que aquest és un requisit indispensable per poder produir en el futur a gran escala (amb cèl·lules en suspensió i purificació per FPLC); i hipotetitzant que les cèl·lules en suspensió tindràn una producció més eficient que les mateixes cèl·lules en adherència.

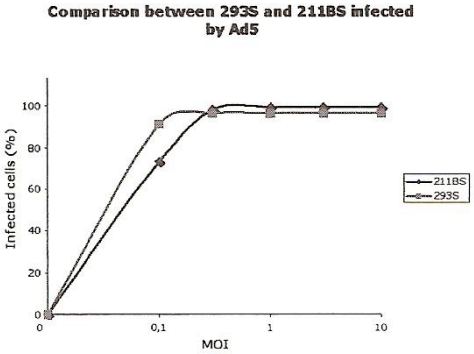
L'adaptació es va portar a terme reduint la proporció de medi DMEM (amb 10% de FBS) i augmentant la proporció de medi definit SFMII. En els últims passos d'aquesta adaptació les cèl·lules van ser transferides a créixer en *shaker flasks*. En les següents figures s'exposa les característiques de creixement de la nova línia cel·lular adaptada. Com es pot veure, les cèl·lules adaptades són estables (s'han mantingut durant més de 18 passages, i s'ha pogut realitzar stocks congelats de viabilitat comprovada) i creixen amb un temps de duplicació de 2,1 dies.

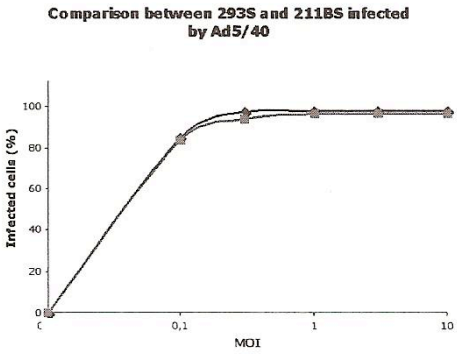




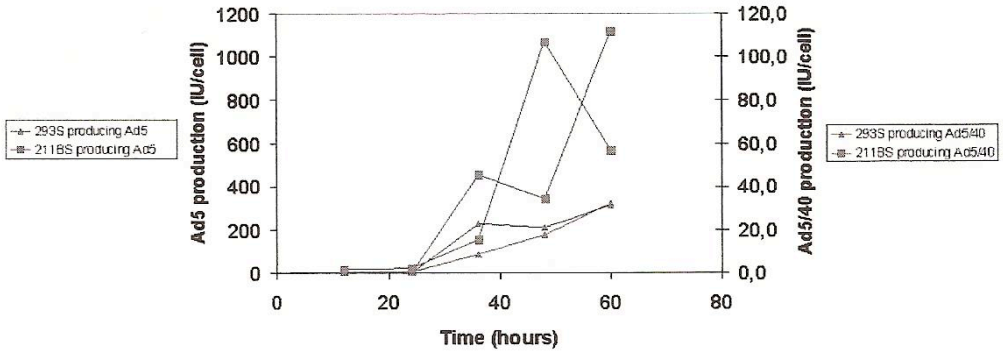
μ= 0,3246
td= 2,1 days

Per tal de poder produir vectors virals en aquestes cèl·lules és necessari que siguin eficientment infectades pels virus que han de produir. En les següents figures es mostra l'eficiència comparada de la nova línia adaptada, 211BS, en ser infectades amb Ad5 i Ad5/40; i unes altres cèl·lules en suspensió, les 293S, que s'han fet servir com a control. Notar que amb una MOI de 0.1 calculada a partir de la titulació en cèl·lules adherents, s'aconsegueixen valors de pràcticament 100% d'infecció en suspensió.





Seguidament es va estudiar l'eficiència d'aquestes cèl·lules per produir adenovirus. Es va analitzar la producció d'Ad5 i d'Ad5/40, per les cèl·lules 211BS i les cèl·lules 293S. Tal com s'indica en la següent figura, la producció d'Ad5 és més eficient que la d'Ad5/40 en les dos línies cel·lulars. Es important remarcar que, tant per a la producció d'Ad5, com d'Ad5/40, les cèl·lules 211BS són més eficients que les cèl·lules 293S.



En quant a les **CONCLUSIONS** d'aquest primer objectiu del projecte, són les següents:

- Les cèl·lules 211B, que expressen constitutivament la proteïna fiber 5, han sigut eficientment adaptades a créixer en suspensió i medi definit (+5% de FBS) (durant 18 passages).
- Les cèl·lules 211BS adaptades tenen la mateixa eficiència que les 293S a ser infectades pels adenovirus 5 i quimera 5/40.
- La nova línia cel·lular adaptada produeix Ad5 i Ad5/40 amb més eficiència que les cèl·lules 293S.

PROJECTES FUTURS en aquesta línia:
- Continuar els experiments d'optimització de la producció d'Adenovirus quimera 5/40 en 211BS.
- Amplificar i purificar l'Adenovirus quimera 5/40 a petita escala (amb cèl·lules 211B adherents i ultracentrifugació) i a gran escala (cèl·lules en suspensió i cromatografia FPLC).

OBJECTIU 2: Clonar el gen de la recombinasa Cre, i diferents gens implicats en la via del Th17, com ara el receptor transmembranal de la IL23, en adenovirus 5 i en genomes d'AAV; i produir aquests vectors.

CLONACIÓ I PRODUCCIÓ EN ADENOVIRUS

El gen de la recombinasa Cre, el gen del receptor transmembranal de laIL23 i el gen del receptor de la IL23 truncat (control negatiu) estaven clonats dins el cassette d'expressió (promotor CMV + Multi Cloning Site + seqüència de poliadenilació) del plàsmid pTG6600. Aquest plàsmid conté regions d'homologia amb el genoma del vector viral. Gràcies a aquestes seqüències homòlogues, els plàsmids pTG6600 amb gens d'interès clonats van ser recombinats amb un altre plàsmid, anomenat pKP1.3, que conté el genoma viral sencer (excepte la regió E1, que el fa defectiu per a la replicació) franquejat per les seqüències ITRs.

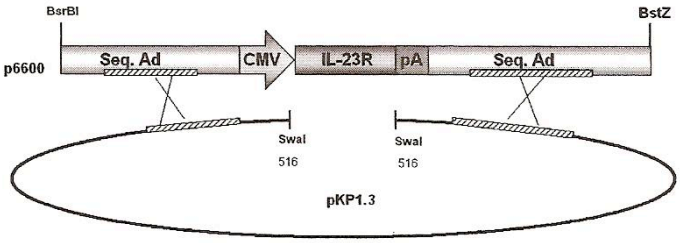
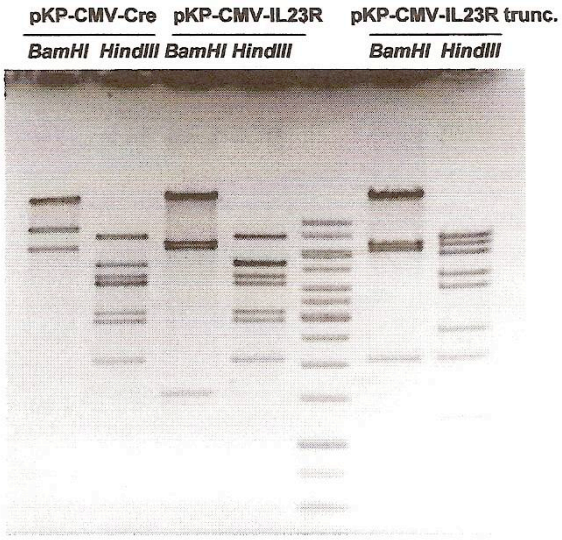


Figura: El plàsmid pTG6600 va ser en els tres casos digerit per BsrBI i BstZI. La banda que contenia el cassette d'expressió va ser purificada a partir del gel d'agarosa pel mètode del Gene Clean. Es va recombinar aquesta banda amb el plàsmid pKP1.3 linealitzat prèviament per digestió amb SwaI.

Tal com s'observa a la següent figura, els plàsmids recombinats van ser comprovats per digestió amb BamHI i HindIII, i els clons positius van ser seleccionats.



Un cop comprovades les recombinacions per als tres gens d'interès, es van digerir aquests plàsmids amb *Pac*I, ja què el plàsmid té dos seqüències dianes per aquest enzim a banda i banda de les ITRs que franquegen el genoma viral. Així doncs, un cop digerit per aquest enzim el genoma del vector resta linealitzat i sense cap seqüència plasmídica (com ara l'OriC o el gen de resistència a antibiòtic).

Un cop aïllat i linealitzat aquests genomes virals, van ser transfectats i amplificats dins de cèl·lules 293, que expressen constitutivament el gen E1, i complementen en trans la deficiència replicativa del vector viral.

Després aquestes cèl·lules van ser llisades per *Freeze-Thaw* (sèrie de congelacions/descongelacions a –80ºC), i els virus van ser alliberats al medi.
Aquests virus vam ser separats de les restes cel·lulars i de medi de cultiu, i purificats per mitjà d'un mètode d'ultracentrifugació en dos columnes de gradients de CsCl. Aquestes columnes són ultracentrifugades a 32000 i 35000 rpm respectivament. S'assoleix en el primer gradient la separació de les càpsides defectives i les càpsides normals. I en el segon gradient, de les càpsides buides i les plenes (veure següents figures).

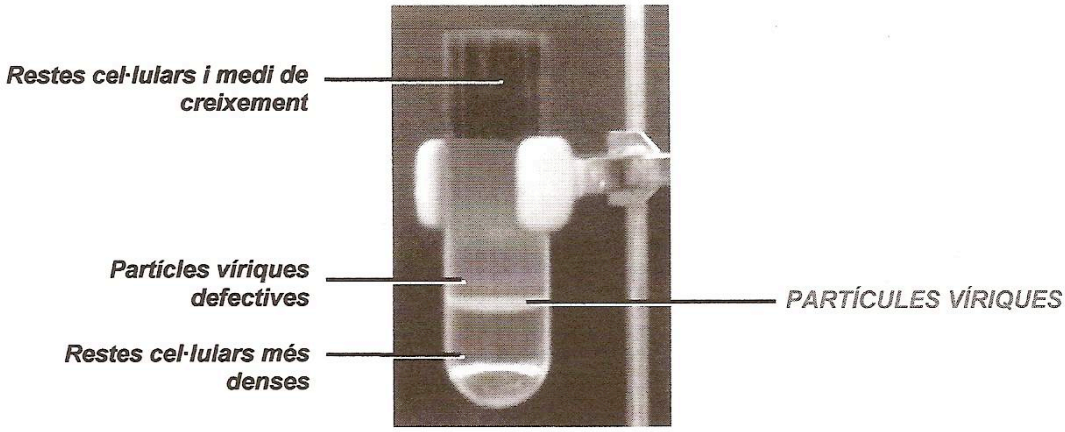


Figura: Primer gradient de CsCl

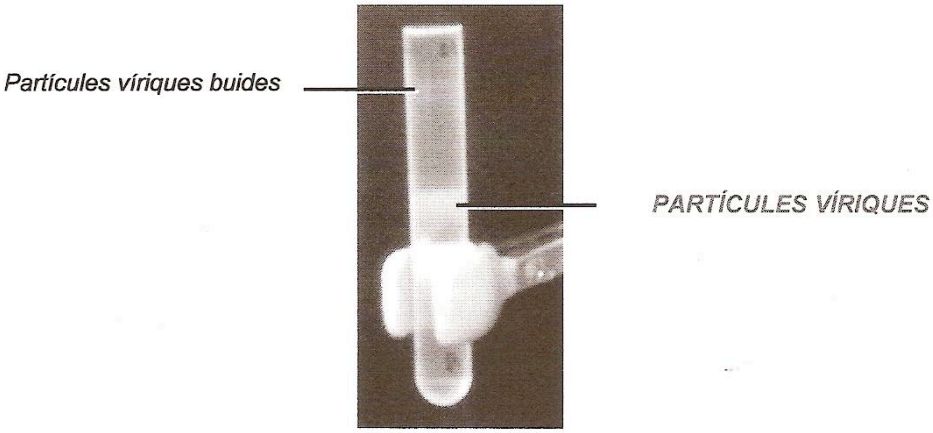
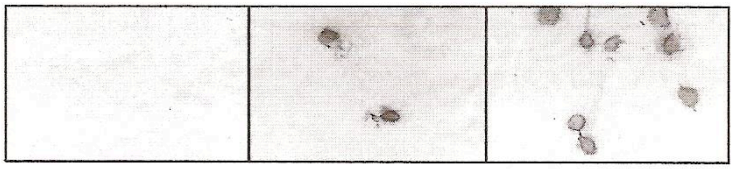


Figura: Segon gradient de CsCl

Un cop purificats els virus, van ser titulats infectant dilucions seriades del virus en 293 adherents, i detectant les cèl·lules infectades per mitjà d'anticòs anti-proteïna hexon.



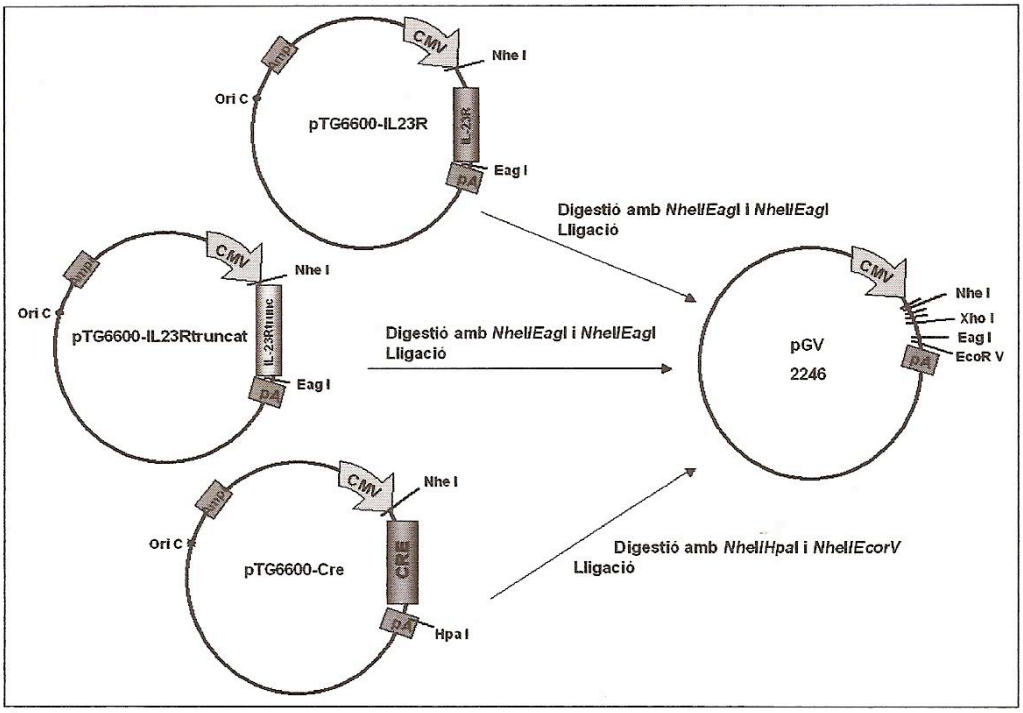
Els valors de producció obtinguts van ser els següents:

VIRUS	pp/ml	IU/ml	Ratio
Ad-IL23R	$1{,}754 \times 10^{12}$	$2{,}26 \times 10^{11}$	1/8
Ad-IL23R truncat	$1{,}089 \times 10^{12}$	$9{,}17 \times 10^{10}$	1/12
Ad-Cre	$8{,}91 \times 10^{11}$	$7{,}52 \times 10^{10}$	1/12

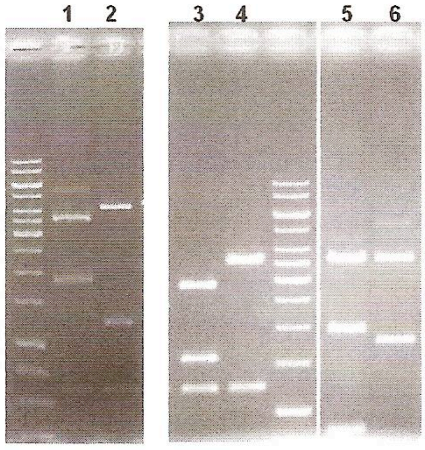
CLONACIÓ EN AAVs

Per tal de produir vectors AAV es necessita transfectar les cèl·lules 293 amb 3 plàsmids. Un d'aquests plàsmids conté el genoma viral franquejat per les seqüències ITRs i el gen d'interés clonat dins d'un cassette d'expressió; un altre plàsmid conté els gens rep i cap per complementar en trans la deficiència replicativa del genoma viral; i el tercer plàsmid és portador dels gens helper adenovirals necessaris perquè l'AAV es pugui replicar.

S'ha clonat el gen de la recombinasa Cre, el gen de del receptor transmembranal de la IL23 i el gen del receptor truncat de la IL23, en el plàsmid portador del genoma viral (anomenat pGV al nostre laboratori). Es van seguir les següents estratègies de clonació que es basen en digestió enzimàtica i lligació d'extrems cohesius:

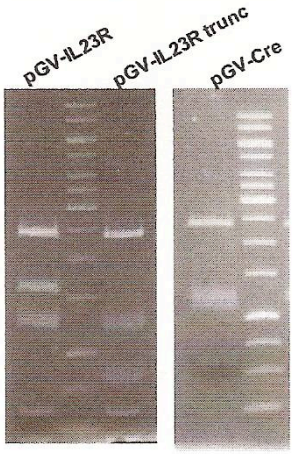


Es van seleccionar els clons positius de la lligació per digestió amb Cfr9I, AseI i XmaI (veure figura següent):



1. pGV-Cre *Cfr9I*
2. pGV-Cre AseI
3. pGV-IL23R *AseI*
4. pGV-IL23R trunc *AseI*
5. pGV-IL23R *XmaI*
6. pGV-IL23R trunc *XmaI*

Un cop seleccionats els clons positius van ser amplificats en E.coli i aïllats per maxiprep. Després de les maxipreps es va comprovar l'estabilitat de les seqüències ITR, per mitjà de la doble digestió Cfr9I/AseI.



En quant a les **CONCLUSIONS** d'aquest segon objectiu del projecte, són les següents:

- S'ha produït eficientment els Adenovirus 5 amb el gen de la recombinasa Cre, i gens implicats en la resposta del Th17 (IL23R).
- S'ha clonat eficientment els tres gens en el genoma de vectors AAV.

PROJECTES FUTURS en aquesta línia:
- Produir tots els pseudotips de AAV's (del 1 al 9) amb el gen de la recombinasa Cre.
- Testar i analitzar tots aquests pseudotips de AAV en ratolins ROSA 26 LacZ per tal de seleccionar quin d'ells pot tenir un millor tropisme intestinal.
- Analitzar el potencial terapèutic dels adenovirus i del pseudotip d'AAV seleccionat, que continguin el gen del receptor transmembranal de la IL23 i altres gens immunomoduladors, en un model murí de Malaltia de Crohn.

Finalment, exposar que els resultats obtinguts durant els mesos que he gaudit de la beca FI, han servit per:

- Poder realitzar la tesina/treball de recerca de màster.
- Assolir un objectius bàsics per a la realització de la tesi doctoral que continua.
- Participar en un Congrés, presentant els resultats en forma de pòster:

Títol del Pòster: "Local Immunomodulation of the Th-17 pathway as a Gene Therapy Strategy for Crohn's Disease"
Entitat organitzadora del Congrès: Centre de Biotecnología Animal i Terapia Génica (CBATEG), vinculat al Departament de Bioquímica i Biología Molecular de la Universitat Autónoma de Barcelona (UAB).
Data: 18 de juliol de 2008
Director del Projecte/Estudi: Dr. Miguel Chillón Rodríguez