



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca Scientifica e Tecnologica

Rendiconto di spesa Fondi 5 per mille ANNO 2017
Enti della Ricerca Sanitaria

ENTE¹: Fondazione Telethon

Titolo del progetto: TGT16A03- G. Ferrari - Regolazione dell'ematopoiesi in condizioni normali e di stress; TGT16B03- E Montini - Modellazione e comprensione del sistema geneticamente modificato nel suo insieme; TGT16C01- B. Gentner - Ingegnerizzazione genetica ed espansione di cellule staminali ematopoietiche altamente purificate per la terapia genica; TGT16C05-A. Villa - Terapia genica della osteopetrosi causata da difetto nel gene TCIRG1; TGT16F01- A. Lombardo - Meccanismi del silenziamento epigenetico e loro utilizzo per migliorare l'editing epigenetico mirato; TGT16E02- A. Villa – Terapia per il trattamento di immunodeficienze combinate severe causate da mutazioni del gene RAG1 mediante gene editing; TGT16G01- S. Gregori - Nuove strategie per generare DC tollerogeniche finalizzate all'immunoterapia antigene-specifica.

Data di inizio progetto: 01/01/2019	Data di fine progetto: 31/12/2019
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: € 628.305,54	Costo complessivo del progetto (se co-finanziato): € 1.085.830,60

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	411.077,26	237.865,94
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	8.324,31	4.816,78
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)	627.671,35	363.196,05

¹ Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	28.291,87	16.370,82
Elaborazione dati		
Spese amministrative	10.465,81	6.055,95
Altro (indicare quali)		
TOTALE	1.085.830,60	628.305,54

Relazione illustrativa:

In linea con il "Rendiconto di assegnazione risorse 5 per mille anno 2017" e nel rispetto delle istruzioni circa la rendicontazione presso codesto Ministero, con il presente "Rendiconto di spesa" si evidenziano le spese sostenute sulle progettualità assegnate e la quota di copertura delle stesse grazie all'apporto del 5 per mille.

Le spese in analisi rappresentano l'attività di ricerca condotta nell'arco del 2019 presso il laboratorio Tiget di ricerca intramurale, relativamente ai progetti assegnati.

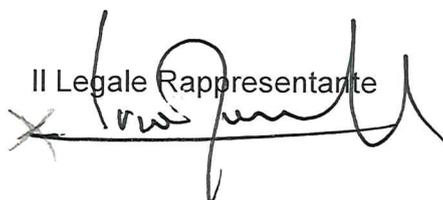
Come previsto, si allega infine al presente rendiconto il documento con gli abstract e le pubblicazioni per ogni progetto assegnato.

Data, 7 gennaio 2021

Il Responsabile del Progetto



Il Legale Rappresentante



Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante





Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca scientifica e Tecnologica

Fondi 5 per mille ANNO 2017 - Enti della Ricerca Sanitaria
Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

ENTE¹: FONDAZIONE TELETHON

Titolo del progetto: TGT16A03- G. Ferrari
Regolazione dell'ematopoiesi in condizioni normali e di stress

Abstract dei risultati ottenuti:

In molte malattie genetiche che interessano la progenie differenziata delle cellule staminali ematopoietiche (CSE), come la beta-talassemia (Btal) e altri difetti eritropoietici, il microambiente del midollo osseo (MO) risulta alterato dall'espansione di precursori eritroidi e segnali di stress. In particolare, nella Btal il MO è caratterizzato dall'espansione compensatoria dei progenitori eritroidi, secondaria all'eritropoiesi inefficace. Viste le complesse interazioni ed equilibri tra i diversi progenitori e le CSE, ci si aspetta un impatto non solo sull'eritropoiesi, ma anche sull'ematopoiesi. Tuttavia, non è ancora noto se altre sottopopolazioni ematopoietiche e/o le CSE possano essere influenzate dai segnali di stress del microambiente midollare nella Btal. La nostra ipotesi è che aspetti peculiari della patologia come la condizione di aumentata stimolazione del MO, l'alterata regolazione del metabolismo osseo, il sovraccarico marziale e fattori ormonali, possano interferire con il mantenimento delle CSE.

Abbiamo analizzato le sottopopolazioni ematopoietiche del MO nei topi mutanti $Hbb^{th3/+}$ ($th3/+$), un modello murino di Btal intermedia, e abbiamo osservato una minor frequenza di CSE LSK CD48-CD150+, rispetto agli animali wt. Le CSE Btal si accumulano preferenzialmente nella fase S del ciclo cellulare e mostrano uno svantaggio nella capacità di attecchimento dopo trapianto, in paragone ai controlli normali. Trapianti seriali hanno dimostrato un esaurimento accelerato delle cellule trapiantate nella nicchia Btal, indicando un ruolo attivo del microambiente del MO ricevente. Risultati preliminari hanno rivelato che sia gli elementi ematopoietici che quelli stromali sono critici per il mantenimento delle CSE $th3/+$. Analisi effettuate sulle cellule stromali del MO hanno mostrato una ridotta densità ossea e un'alterata organizzazione delle cellule mesenchimali Nestin+ nella nicchia Btal. Ulteriori studi riveleranno il ruolo dei componenti cellulari e solubili che influenzano in trans le CSE Btal.

I nostri risultati svelano un difetto delle CSE nella Btal fino ad ora ignorato, evidenziando l'impatto di alterazioni del microambiente midollare legate alla patologia sulla funzione delle CSE. Questi dati cambiano per la prima volta la concezione di un'anemia ereditaria da una malattia dell'eritropoiesi ad una patologia che interessa l'intera ematopoiesi. I nostri studi potrebbero rivelare nuovi meccanismi molecolari della patofisiologia della malattia con un potenziale impatto sulle pratiche di trapianto e terapia genica nella Btal, così come in altre condizioni di stress associate a diseritropoiesi.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni

Hematopoietic stem cell function in β -thalassemia is impaired and is rescued by targeting the bone marrow niche.

Aprile A, Gulino A, Storto M, Villa I, Beretta S, Merelli I, Rubinacci A, Ponzoni M, Markt S, Tripodo C, Lidonnici MR, Ferrari G. *Blood*. 2020 Apr 28.

Bone marrow stromal cells from β -thalassemia patients have impaired hematopoietic supportive capacity.

Crippa S, Rossella V, Aprile A, Silvestri L, Ravis S, Scaramuzza S, Pirroni S, Avanzini MA, Basso-Ricci L, Hernandez RJ, Zecca M, Markt S, Ciceri F, Aiuti A, Ferrari G, Bernardo ME. *J Clin Invest*. 2019 Feb 25;129(4):1566-1580

Intrabone hematopoietic stem cell gene therapy for adult and pediatric patients affected by transfusion-dependent β -thalassemia.

Markt S, Scaramuzza S, Cicalese MP, Giglio F, Galimberti S, Lidonnici MR, Calbi V, Assanelli A, Bernardo ME, Rossi C, Calabria A, Milani R, Gattillo S, Benedicenti F, Spinozzi G, Aprile A, Bergami A, Casiraghi M, Consiglieri G, Masera N, D'Angelo E, Mirra N, Origa R, Tartaglione I, Perrotta S, Winter R, Coppola M, Viarengo G, Santoleri L, Graziadei G, Gabaldo M, Valsecchi MG, Montini E, Naldini L, Cappellini MD, Ciceri F, Aiuti A, Ferrari G. *Nat Med*. 2019 Feb;25(2):234-241

Gene therapy and gene editing strategies for hemoglobinopathies.

Lidonnici MR, Ferrari G.

Blood Cells Mol Dis. 2018 May; m70:87-101.

Titolo del progetto: TGT16B03- E Montini

Modellazione e comprensione del sistema geneticamente modificato nel suo insieme

Abstract dei risultati ottenuti:

I siti di integrazione virale (IV) nei trattamenti di terapia genica (TG) basati su cellule staminali ematopoietiche sono stati usati come etichetta permanente delle cellule staminali marcate dal vettore e di tutta la loro progenie nel tempo, per supportare la valutazione della biosicurezza ed efficacia a lungo termine della terapia. Per caratterizzare ulteriormente la dinamica temporale di ricostituzione ematopoietica in vivo e la sicurezza della TG, abbiamo testato un metodo innovativo per recuperare e quantificare le IV dal plasma e da altri fluidi corporei sia in studi preclinici che clinici all'interno dell'istituto. Poichè il DNA circolante è rilasciato da cellule morte residenti in diversi tessuti solidi, le IV recuperate da queste cellule estendono il panorama della diversità clonale delle cellule marcate nei pazienti sottoposti a TG, migliorando la valutazione di sicurezza ed efficacia a lungo termine. Nelle nostre analisi dei pazienti affetti da leucodistrofia metacromatica (MLD) trattati con vettori lentivirali, siamo riusciti a recuperare un numero significativo di IV, 660 per MLD01 di cui il 60% era composto da nuove integrazioni non osservate nel sangue periferico o midollare fino a 48 mesi. Le IV osservate nel sangue circolante mostrano lo stesso delle IV del sangue periferico con il profilo caratteristico del lentivirus. Ugualmente per l'abbondanza clonale non abbiamo osservato particolari scostamenti da quello misurato nel sangue periferico. Inoltre, abbiamo esteso l'analisi delle IV alle mutazioni del genoma. Poichè le integrazioni in sé non possono dare informazioni complete sulla proliferazione ematopoietica in termini di stress proliferativo, un driver potente di declino funzionale misurabile in termini di accumulo di mutazioni e stabilità del genoma, abbiamo deciso di caratterizzare lo stress proliferativo indotto dal trapianto autologo di cellule staminali corrette geneticamente per completamento e ripristino del sistema ematopoietico analizzando le mutazioni contenute nella

porzione di DNA fiancheggiante l'integrazione virale. Per provare la fattibilità dello studio, abbiamo analizzato il genoma di due pazienti MLD studiando le IV derivate dalle CD34+ del sangue midollare e dal sangue periferico nelle cellule mieloidi (CD15+ e CD14+) e linfociti (CD19+, CD3+, CD56+), osservando l'accumulo di mutazioni tra due intervalli temporali (1-6 mese post trapianto e >=24 mesi). I risultati di questi test mostrano un tasso di mutazione tra 0.1 e 3.7 (mutazioni per Mbp) da >2800 IV coprendo il genoma per oltre 1.2 Mbp. Queste informazioni ci hanno permesso di tracciare nel tempo e nei lineaggi le mutazioni indotte dallo stress proliferativo e introdotte durante la ricostituzione ematopoietica, fondando la prova di fattibilità e ponendo le basi per il miglioramento della valutazione di biosicurezza ed efficacia a lungo termine della terapia genica.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni

γ-TRIS: a graph-algorithm for comprehensive identification of vector genomic insertion sites.

Calabria A, Beretta S, Merelli I, Spinozzi G, Brasca S, Pirola Y, Benedicenti F, Tenderini E, Bonizzoni P, Milanese L, Montini E.

Bioinformatics. 2020 Mar 1;36(5):1622-1624

De(bar)coding aged hematopoiesis in primates.

Di Micco R, Montini E.

Blood. 2018 Mar 15;131(11):1157-1159

VISPA2: a scalable pipeline for high-throughput identification and annotation of vector integration sites.

Spinozzi G, Calabria A, Brasca S, Beretta S, Merelli I, Milanese L, Montini E.

BMC Bioinformatics. 2017 Nov 25; 18(1):520

HIV-1-mediated insertional activation of STAT5B and BACH2 trigger viral reservoir in T regulatory cells.

Cesana D, Santoni de Sio FR, Rudilosso L, Gallina P, Calabria A, Beretta S, Merelli I, Bruzzesi E, Passerini L, Nozza S, Vicenzi E, Poli G, Gregori S, Tambussi G, Montini E.

Nat Commun. 2017 Sep 8; 8(1):498.

Titolo del progetto: TGT16C01- B. Gentner

Ingegnerizzazione genetica ed espansione di cellule staminali ematopoietiche altamente purificate per la terapia genica

Abstract dei risultati ottenuti:

La terapia genica basata su cellule staminali e progenitrici emopoietiche CD34+ ingegnerizzate ex vivo ha mostrato dei risultati promettenti in studi clinici, ma l'ingegneria genetica ad alti livelli e in larga scala continua ad essere difficile. Abbiamo ideato una nuova strategia di purificazione delle cellule staminali ematopoietiche da sangue periferico mobilizzato che risulta in un arricchimento ben 10 volte superiore allo standard attuale. Abbiamo quindi modellato un protocollo di trapianto che si basa sulla co-infusione di cellule staminali altamente purificate e geneticamente corrette ex vivo con cellule progenitrici non-coltivate, che servono per sostenere la ripresa emopoietica nei primi mesi dopo la terapia. L'utilizzo della prostaglandina E2 ha permesso la quasi completa trasduzione delle cellule staminali ematopoietiche con vettori lentivirali, inclusi anche i reagenti di grado clinico, in un tempo minimo di coltura meno di 38 ore. Di rilevanza, abbiamo dimostrato che l'accorciamento della coltura minimizza l'impatto negativo della coltura standard sulla funzionalità delle cellule progenitrici. Inoltre, sfruttando il derivato del pirimido-indolo "UM171", dimostriamo che le cellule staminali ematopoietiche possono essere espanse in coltura. L'attuazione di queste scoperte in protocolli clinici di terapia genica migliorerà l'efficacia, la sicurezza e la sostenibilità di questo trattamento innovativo e genererà nuove opportunità nel campo del gene editing.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni

Assessing the Impact of Cyclosporin A on Lentiviral Transduction and Preservation of Human Hematopoietic Stem Cells in Clinically Relevant Ex Vivo Gene Therapy Settings.

Petrillo C, Calabria A, Piras F, Capotondo A, Spinozzi G, Cuccovillo I, Benedicenti F, Naldini L, Montini E, Biffi A, Gentner B, Kajaste-Rudnitski A.

Hum Gene Ther. 2019 Sep; 30(9):1133-1146

In Vivo Selection for Gene-Corrected HSPCs Advances Gene Therapy for a Rare Stem Cell Disease.

Gentner B, Naldini L.

Cell Stem Cell. 2019 Nov 7; 25(5):592-593

Gene therapy for mucopolysaccharidoses: in vivo and ex vivo approaches.

Fraldi A, Serafini M, Sorrentino NC, Gentner B, Aiuti A, Bernardo ME.

Ital J Pediatr. 2018 Nov 16; 44

Efficient Ex Vivo Engineering and Expansion of Highly Purified Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Populations for Gene Therapy.

Zonari E, Desantis G, Petrillo C, Boccalatte FE, Lidonnici MR, Kajaste-Rudnitski A, Aiuti A, Ferrari G, Naldini L, Gentner B.

Stem Cell Reports. 2017 Apr 11;8(4):977-990

Titolo del progetto: TGT16C05-A. Villa

Terapia genica della osteopetrosi causata da difetto nel gene TCIRG1

Abstract dei risultati ottenuti:

La osteopetrosi (ARO) è una grave malattia ereditaria caratterizzata da un aumento della massa ossea a causa di difetti nell'attività di riassorbimento degli osteoclasti (Frattini et al., 2000). La

conseguente fibrosi del midollo osseo porta ad ematopoiesi extramidollare, epato-splenomegalia e progressiva pancitopenia, che a sua volta causa aumentata suscettibilità alle infezioni. A causa della maggiore fibrosi del midollo osseo e ematopoiesi secondaria, i pazienti hanno un maggior numero di cellule CD34 (3% 177; 0,9%) circolante nel sangue periferico (Steward et al., 2005). Le basi molecolari della ARO umano, sono eterogenei (Sobacchi et al, 2007; Sobacchi et al, 2001 Sobacchi et al, 2013); tuttavia, la maggior parte dei casi sono dovuti a difetti nel gene TCIRG1, che rappresentano oltre il 50% dei pazienti ARO (Del Fattore et al, 2008; Frattini et al, 2000; Pangrazio et al, 2012; Sobacchi et al., 2013). Gli studi sulla patogenesi e trattamento della malattia sono stati effettuati nel topo oc/oc, un mutante spontaneo che porta una delezione nel gene TCIRG1 e che ben ricapitola la malattia (Scimeca et al., 2003). In passato, nel modello murino, abbiamo dimostrato che il trapianto di midollo osseo recupera il fenotipo osseo quando il trattamento viene eseguito il più precocemente possibile, perfino durante il periodo prenatale (Frattini et al, 2005; Tondelli et al, 2009). Il basso livello di chimerismo è comunque sufficiente a migliorare il fenotipo osseo (Flores et al, 2010, Tondelli et al, 2009). Negli esseri umani, il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) rimane l'unica opzione terapeutica (Coccia et al., 1980), tuttavia il trapianto allogenico comporta dei problemi indicando la necessità urgente di migliorare l'attecchimento attraverso lo sviluppo di nuove strategie che permettano il trapianto autologo con cellule ematopoietiche corrette in grado di ricostituire il sistema emopoietico (Natsheh et al, 2015; Orchard et al, 2015). Sono state pertanto sviluppate strategie basate sulla terapia genica (GT), fornendo la prova di principio che la terapia genica è fattibile (Johansson et al, 2007; Moscatelli et al 2013). In questo programma di ricerca, ci proponiamo di eseguire uno studio pilota in cui verranno generati nuovi vettori lentivirali che verranno trasdotte in cellule murine Lineage negativi (Lin-) e trapiantati nei topi neonati oc/oc. In parallelo verranno effettuati trapianti competitivi con dosi limitate di cellule wild-type per identificare il livello minimo di correzione necessaria per correggere la malattia. Infine, saranno condotti in parallelo studi su cellule CD34 da donatori sani e da pazienti ARO per testare in vitro la differenziazione a cellule ematopoietiche e la relativa osteoclastogenesi di progenitori di cellule staminali ematopoietiche trasdotte. Ci aspettiamo di fornire la prova definitiva che la terapia genica può ripristinare in modo sicuro la funzione degli osteoclasti, aprendo la strada a questo approccio terapeutico per quei pazienti che non hanno un donatore HLA-matched.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni

Expanded circulating hematopoietic stem/progenitor cells as novel cell source for the treatment of TCIRG1 osteopetrosis.

Capo V, Penna S, Merelli I, Barcella M, Scala S, Basso-Ricci L, Draghici E, Palagano E, Zonari E, Desantis G, Uva P, Cusano R, Sergi Sergi L, Crisafulli L, Moshous D, Stepensky P, Drabko K, Kaya Z, Unal E, Gezdirici A, Menna G, Serafini M, Aiuti A, Locatelli SL, Carlo-Stella C, Schulz AS, Ficara F, Sobacchi C, Gentner B, Villa A.

Haematologica. 2020 Jan 16

Absence of Dipeptidyl Peptidase 3 Increases Oxidative Stress and Causes Bone Loss.

Menale C, Robinson LJ, Palagano E, Rigoni R, Erreni M, Almarza AJ, Strina D, Mantero S, Lizier M, Forlino A, Besio R, Monari M, Vezzoni P, Cassani B, Blair HC, Villa A, Sobacchi C.

J Bone Miner Res. 2019 Nov;34(11):2133-2148

Titolo del progetto: 4. TGT16F01- A. Lombardo

Meccanismi di silenziamento epigenetico e loro utilizzo per migliorare l'editing epigenetico mirato.

Abstract dei risultati ottenuti:

Il silenziamento genico rappresenta uno strumento prezioso per studiare la funzione dei geni e una risorsa promettente per applicazioni terapeutiche. Per questo motivo abbiamo recentemente sviluppato una nuova piattaforma di silenziamento epigenetico che permette di silenziare geni endogeni in modo efficiente e permanente veicolando una combinazione di Repressori Trascrizionali Artificiali (RTA) (Amabile et al., Cell, 2016). Sebbene questa tecnologia si sia dimostrata altamente efficiente nel silenziare geni endogeni nella maggior parte delle linee cellulari ad oggi testate, alcuni nostri dati preliminari suggeriscono che in cellule primarie di interesse terapeutico la sua attività sia almeno in parte limitata. Questa differenza potrebbe essere dovuta all'assenza di cofattori dei RTA o alla presenza di loro antagonisti nelle cellule primarie. Per risolvere questo problema vogliamo identificare i membri endogeni del macchinario di silenziamento coordinato dai RTA e successivamente sfruttare queste conoscenze per migliorare l'efficienza della nostra tecnologia di silenziamento. A tal fine stiamo effettuando degli screening ad alto spettro per perdita di funzione genica su linee cellulari permissive o refrattarie alla nostra tecnologia di silenziamento. In particolare abbiamo generato linee cellulari che esprimono sotto controllo farmacologico la nucleasi Cas9 e le abbiamo trasdotte con librerie di vettori lentivirali codificanti per sgRNAs contro geni per proteine nucleari o con funzione sconosciuta. Alcuni dati preliminari mostrano che in seguito alla induzione della Cas9 una frazione delle cellule trasdotte con le librerie riattiva l'espressione dei geni silenziati dai RTA. Ciò suggerisce che in queste cellule siano stati inattivati uno o più fattori coinvolti nel mantenimento del silenziamento. Stiamo adesso analizzando queste cellule tramite Next Generation Sequencing per identificare tali geni candidati. Una volta validati, genereremo nuovi RTA, che saranno testati in cellule primarie. In parallelo, effettueremo degli studi meccanicistici per fornire delle evidenze preliminari sul coinvolgimento dei più interessanti/promettenti candidati identificati dagli studi di cui sopra nei processi fisiologici di repressione epigenetica, come l'imprinting e il silenziamento epigenetico dei retrovirus endogeni. Infine, per usufruire a pieno del potenziale della nostra tecnologia di silenziamento, anche in vista di una sua possibile applicazione clinica, effettueremo un accurato studio della specificità della nostra piattaforma tramite analisi del trascrittoma e dell'epigenoma delle cellule silenziate dai RTA. Se necessario, miglioreremo ulteriormente la specificità della piattaforma ingegnerizzando in modo razionale il dominio di legame al DNA e/o i domini effettori degli RTA. Il successo di questi studi permetterà di mettere a punto una tecnologia di silenziamento epigenetico pronta per essere applicata a cellule primarie, tracciando in tal modo la strada per la sua successiva sperimentazione in scenari clinicamente rilevanti.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni

Gene Modification and Three-Dimensional Scaffolds as Novel Tools to Allow the Use of Postnatal Thymic Epithelial Cells for Thymus Regeneration Approaches.

Bortolomai I, Sandri M, Draghici E, Fontana E, Campodoni E, Marcovecchio GE, Ferrua F, Perani L, Spinelli A, Canu T, Catucci M, Di Tomaso T, Sergi L, Esposito A, Lombardo A, Naldini L, Tampieri A, Hollander GA, Villa A, Bosticardo M. *Stem Cells Transl Med.* **2019 Oct**;8(10):1107-1122

Preclinical modeling highlights the therapeutic potential of hematopoietic stem cell gene editing for correction of SCID-X1.

Schirotti G, Ferrari S, Conway A, Jacob A, Capo V, Albano L, Plati T, Castiello MC, Sanvito F, Gennery AR, Bovolenta C, Palchaudhuri R, Scadden DT, Holmes MC, Villa A, Sitia G, Lombardo A, Genovese P, Naldini L. *Sci Transl Med.* **2019 Oct** 11;9(411).

Inheritable Silencing of Endogenous Genes by Hit-and-Run Targeted Epigenetic Editing.
Amabile A, Migliara A, Capasso P, Biffi M, Cittaro D, Naldini L, Lombardo A.
Cell 2016 Sep 22;167(1):219-232

Titolo del progetto: TGT16E02- A. Villa

TERAPIA PER IL TRATTAMENTO DI IMMUNODEFICIENZE COMBinate SEVERE CAUSATE DA MUTAZIONI NEL GENE RAG1 MEDIANTE GENE EDITING

Abstract dei risultati ottenuti:

L'obiettivo principale di questo progetto è quello di sviluppare una terapia per il trattamento di malattie ereditarie causate da mutazioni nei geni la cui espressione è rigorosamente regolata in cellule staminali ematopoietiche (HSC) e nella loro progenie. Ci focalizzeremo su una immunodeficienza combinata grave (SCID) causata da difetti nel gene RAG1, una molecola finemente regolata nei precursori dei linfociti, la cui alterata espressione può portare a rotture del DNA e traslocazioni cromosomiche (Notarangelo, 2013; Papaemmanuil et al, 2014) o allo sviluppo di reazioni autoimmuni quali ad es. la sindrome di Omenn (OS) (van Til et al, 2014; Villa et al, 1998; Walter et al, 2015). L'analisi retrospettiva sull'esito dei trapianti in pazienti con difetti RAG ha dimostrato risultati insoddisfacenti dopo trapianto HLA-matched (Buckley et al, 1999; Railey et al, 2009; Schuetz et al, 2014). Studi di terapia genica nel modello murino hanno indicato che il mantenimento di livelli adeguati di espressione del gene RAG1 è di fondamentale importanza per ottenere una ricostituzione immunologica adeguata. Infatti, una bassa espressione del gene causa un'incompleta ricostituzione del timo (van Til et al., 2014) e una linfopenia T e B (Pike-Overzet et al., 2011). Viceversa, l'alta espressione del transgene ottenuta con vettore retrovirale determina un buon livello di ricostituzione immunitaria ma al contempo il verificarsi di leucemie (Lagresle-Peyrou et al., 2006). Tutti questi dati suggeriscono che è necessario un alto numero di copie del vettore per ottenere una buona ricostituzione immunologica, sollevando così problemi di sicurezza e tossicità. Da qui nasce la necessità di sviluppare strategie alternative al fine di ridurre al minimo i potenziali rischi di cancro e manifestazioni autoimmuni. Lo sviluppo di nucleasi capaci di modificare in modo altamente specifico il DNA, quali le zinc finger nucleasi (ZFNs), ha aperto alla possibilità di effettuare editing del genoma (Genovese et al, 2014; Lombardo et al, 2007; Naldini, 2015). Nel presente progetto di ricerca, ci proponiamo di sviluppare un nuovo approccio terapeutico per la correzione del gene RAG1 mediante ZFNs. In collaborazione con Sangamo Biosciences, che fornirà ZFNs e avvalendoci dei recenti progressi nel gene editing delle HSC, definiremo un protocollo per correggere il difetto genico mediante ZFNs nelle cellule umane CD34 o in cellule staminali pluripotenti derivate dal paziente. In parallelo, verranno eseguiti trapianti competitivi nel modello murino Rag1^{-/-} che permetteranno di identificare il minimo numero di cellule corrette e il regime di condizionamento necessari per raggiungere livelli terapeutici di ricostituzione immunitaria nei pazienti con deficit di RAG1.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni

Cutaneous barrier leakage and gut inflammation drive skin disease in Omenn Syndrome.

Rigoni R, Fontana E, Dobbs K, Marrella V, Taverniti V, Maina V, Facchetti A, D'Amico G, Al-Herz W, Cruz-Munoz ME, Schuetz C, Gennery AR, Garabedian EK, Giliani S, Draper D, Dbaibo G, Geha RS, Meyts I, Tousseyn T, Neven B, Moshous D, Fischer A, Schulz A, Finocchi A, Kuhns DB, Fink DL, Lionakis MS, Swamydas M, Guglielmetti S, Alejo J, Myles IA, Pittaluga S, Notarangelo LD, Villa A, Cassani B.

J Allergy Clin Immunol. 2020 Apr 17

RAG gene defects at the verge of immunodeficiency and immune dysregulation.
Villa A, Notarangelo LD.

Immunol Rev. 2019 Jan 23 287(1):73-90

Efficacy of lentivirus-mediated gene therapy in an Omenn syndrome recombination-activating gene 2 mouse model is not hindered by inflammation and immune dysregulation.

Capo V, Castiello MC, Fontana E, Penna S, Bosticardo M, Draghici E, Poliani LP, Sergi Sergi L, Rigoni R, Cassani B, Zanussi M, Carrera P, Uva P, Dobbs K, Sacchetti N, Notarangelo LD, van Til NP, Wagemaker G, Villa A.

J Allergy Clin Immunol. 2018 Sep;142(3):928-941

Titolo del progetto: TGT16G01- S. Gregori

Nuove strategie per generare DC tollerogeniche finalizzate all'immunoterapia antigene-specifica

Abstract dei risultati ottenuti:

Lo sviluppo di nuovi approcci per controllare la risposta immunitaria contro tessuti autologhi, organi trapiantati o transgeni rappresenta un obiettivo ambizioso e una necessità clinica nella gestione delle malattie autoimmuni, nel contesto dei trapianti e nella terapia genica, in cui l'immunità pre-esistente al transgene potrebbe limitarne l'efficacia. Le cellule dendritiche (DC) sono il braccio del sistema immunitario responsabile per l'inizio delle risposte immuni. Oltre al loro ruolo di primo piano nell'induzione di risposte a patogeni, diversi sottogruppi di DC, indicate come DC tollerogeniche (tolDC), sono coinvolte nella induzione della tolleranza a sostanze non nocive. Un esempio di tolDC sono le DC-10, una popolazione di cellule presentanti l'antigene che produce interleuchina 10 (IL-10, nota citochina antinfiammatoria) e induce cellule T regolatorie (Tregs) antigene (Ag)-specifiche, i.e. linfociti T in grado di controllare l'infiammazione e mantenere attivamente la tolleranza. Le tolDC rappresentano ottime candidate per terapie basate sul trapianto adottivo di cellule volte all'induzione della tolleranza immunologica in malattie mediate da linfociti T e al miglioramento dell'efficienza di protocolli di terapia genica. Noi proponiamo di generare tolDC stabili in grado di modulare le risposte immuni nel contesto di malattie autoimmuni e di terapia genica attraverso l'utilizzo di vettori lentivirali (LV) che impongano alle DC di presentare l'Ag ai linfociti T in modo tale da controllare le risposte "pericolose" mediate dalle cellule T effettrici e in grado di indurre cellule Tregs Ag-specifiche. A questo scopo ci proponiamo di generare in vitro tolDC, murine ed umane, utilizzando i seguenti approcci: i) l'espressione forzata di Ag selezionati mediante LV, ii) l'espressione di un Ag abbinata a molecole tollerogeniche; e iii) l'espressione regolata del transgene, che impedisca la presentazione dell'Ag in presenza di segnali infiammatori. Durante questo primo periodo di finanziamento, abbiamo ottimizzato il protocollo di trasduzione delle DC umane e ottenuto un'alta efficienza di espressione del transgene in queste cellule. Abbiamo inoltre eseguito esperimenti in vitro per valutare la funzionalità delle DC umane ingegnerizzate con LV (LV-DC). Sebbene siano necessari ulteriori esperimenti in vitro per valutare la capacità delle LV-DC di indurre cellule T anergiche o Tregs, i nostri risultati indicano che l'approccio proposto per la generazione di tolDC Ag-specifiche è fattibile e promettente per la generazione di approcci cellulari di induzione di tolleranza in vivo.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni

Coexpression of CD163 and CD141 identifies human circulating IL-10-producing dendritic cells (DC-10).

Comi M, Avancini D, Santoni de Sio F, Villa M, Uyeda MJ, Floris M, Tomasoni D, Bulfone A, Roncarolo MG, [Gregori S.](#)

Cell Mol Immunol. 2020 Jan;17 (1):95-107

Targeting a Pre-existing Anti-transgene T Cell Response for Effective Gene Therapy of MPS-I in the Mouse Model of the Disease.

Squeri G, Passerini L, Ferro F, Laudisa C, Tomasoni D, Deodato F, Donati MA, Gasperini S, Aiuti A, Bernardo ME, Gentner B, Naldini L, Annoni A, Biffi A, [Gregori S.](#)

Mol Ther. 2019 Jul 3;27 (7):1215-1227.

Role of myeloid regulatory cells (MRCs) in maintaining tissue homeostasis and promoting tolerance in autoimmunity, inflammatory disease and transplantation.

Amodio G, Cichy J, Conde P, Matteoli G, Moreau A, Ochando J, Oral BH, Pekarova M, Ryan EJ, Roth J, Sohrabi Y, Cuturi MC, [Gregori S.](#)

Cancer Immunol Immunother. 2019 Apr;68 (4):661-672

The study of engraftment after hematopoietic stem cell transplantation: From the presence of mixed chimerism to the development of immunological tolerance.

Andreani M, [Gregori S.](#)

HLA. 2018 Dec;92 Suppl 2:57-59.

Interleukin-10-Producing DC-10 Is a Unique Tool to Promote Tolerance Via Antigen-Specific T Regulatory Type 1 Cells.

Comi M, Amodio G, [Gregori S.](#)

Front Immunol. 2018 Apr 6; 9:682

Monitoring T-Cell Responses in Translational Studies: Optimization of Dye-Based Proliferation Assay for Evaluation of Antigen-Specific Responses.

Ten Brinke A, Marek-Trzonkowska N, Mansilla MJ, Turksma AW, Piekarska K, Iwaszkiewicz-Grześ D, Passerini L, Locafaro G, Puñet-Ortiz J, van Ham SM, Hernandez-Fuentes MP, Martínez-Cáceres EM, [Gregori S.](#)

Front Immunol. 2017 Dec 21; 8:1870

IL-10-Engineered Human CD4+ Tr1 Cells Eliminate Myeloid Leukemia in an HLA Class I-Dependent Mechanism.

Locafaro G, Andolfi G, Russo F, Cesana L, Spinelli A, Camisa B, Ciceri F, Lombardo A, Bondanza A, Roncarolo MG, [Gregori S.](#)

Mol Ther. 2017 Oct 4;25 (10):2254-2269.

Data, 7 gennaio 2021

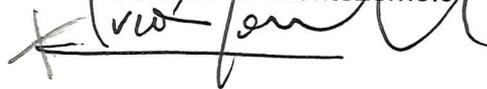
Il Responsabile del Progetto

Tiziana Ciracò



Il Legale Rappresentante

Luca Cordero di Montezemolo



Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante
Luca Cordero di Montezemolo

