

STRATEGIE TERAPEUTICHE PER I DISORDINI EREDITARI

APPROCCI DI TERAPIA GENICA

- Cellule staminali somatiche
- Trasferimento genico
- Modificazioni dell'RNA
- Cellule staminali embrionali (in Italia è vietata)

Gli approcci che riguardano l'utilizzo di un gene comprendono:

1. **Gene addition** → prevede l'utilizzo di *vettori virali*; consiste nell'introduzione dall'esterno di un gene che funziona a cui viene delegato il compito di sostituire un gene che invece non è funzionante → *creo cellule transgeniche*
2. **Gene correction** → usa la ricombinazione omologa. Esistono 2 tecniche differenti:
 - a. Il virus si integra nel genoma umano ed il suo gene viene continuamente espresso ma questo può portare a dei problemi
 - b. Si sostituisce il segmento di gene malato con un segmento sano e si applica dunque una correzione in situ.

MALATTIE GENICHE

- Esistono 25.000 geni
- 1.800 sono stati attualmente identificati come causa di *disordini ereditari*.
- Le proteine sono in realtà di più dei geni (circa 100.000) perché la maggior parte delle volte si realizza uno "*splicing alternativo*" responsabile della maggior parte di questa discrepanza numerica. Altre cause consistono nella possibilità che uno stesso gene abbia diversi promotori o punti di termine diversi a livello delle code di poliA.
- La *G correction* o la *compensation* o anche tutti gli altri approcci servono solo per disordini ereditari miogenici.

DISORDINI MONOGENICI

- Talassemie
- Emofilia
- Fibrosi cistica
- SCID
- Ipercolesterloemia familiare
- Huntington etc

Le strategie che si mettono in atto attualmente sono :

- Manipolazione metabolica ad es. fenilchetonuria (fenilalanina)

GENE TRANSFER

- EX VIVO
- IN VIVO

EX VIVO → limitata ai disordini in cui posso individuare le cellule interessate dalla malattia; le posso *prelevare*, *correggere* e *rimettere* nel paziente.

Es. trasferimento del fattore VIII ai fibroblasti autologhi per trattare l'emofilia A. I fibroblasti sono risultati capaci di esprimere il fattore VIII (nonostante la normale produzione sia epatica); queste cellule vengono impiantate nell'omento.

IN VIVO → si somministra il vettore contenente il DNA terapeutico o direttamente nell'organo oppure nel torrente sanguigno, e da qui all'organo.

PROBLEMI LEGATI AL GENE TRANSFER IN VIVO:

- ancora non sono state trovate strategie molto valide per la somministrazione e per il mantenimento dell'espressione genica.
- Specificità
- Risposta immunitaria (sorveglianza) che si scatena contro il vettore.

Per superare tali problemi bisogna conoscere:

- Le basi molecolari del disordine
- Il modo di interazione
- Il range di mutazione e la relazione genotipo-fenotipo (infatti qualunque mutazione in un gene può dare un fenotipo diverso da un'altra mutazione nello stesso gene)
Es. talassemia:
 - La mutazione nel promotore del gene dà un deficit di produzione della proteina (talassemia β^+)
 - La mutazione determina la comparsa di un codone di stop per cui la proteina può non essere proprio prodotta (talassemia β^0)

- COME DOVE E QUANDO SI MANIFESTA LA MALATTIA
- COME IL FENOTIPO È MODULATO DAI GENI ALTERNATIVI → questo lo si può dire nei topi "knock out, cioè quelli in cui si è andato a distruggere un gene ma questo non ha portato comunque ad un'alterazione se il gene in questione era vicariato da un altro.

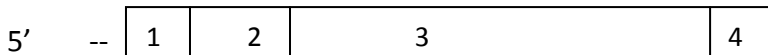
VETTORI PER IL GENE – TRANSFER

Esistono 5 classi di vettori:

- Plasmidi più lisosomi
- Adenovirus
- Adeno-associati virus
- Retrovirus
- Multi virus

Sono ovviamente modificati → non danno la malattia ma possono provocare una risposta immunitaria.

Il gene tipico utilizzato consiste di:



1. Promotore
2. Introne (non si sa bene a cosa serve ma fa funzionare meglio il gene)
3. Transgene (è un C-DNA cioè un DNA complementare al DNA) → dall'RNA ricavato dalla cellula che lo esprime, possiamo ricavare il DNA corrispondente utilizzando una *trascrittasi inversa*; la differenza con un DNA genomico è che questo ha gli introni mentre quello complementare no).
4. Sito di poliA (poliadenilazione)

Le barriere che il vettore virale deve superare per il trasferimento genico sono molte:

- Membrana plasmatica
 - Citoplasma
 - Nucleo (dove può usare l'apparato di trascrizione della cellula)
- Né i **plasmidi** (vettori non virali) né gli **adenovirus** si inseriscono nel genoma della cellula ospite, ma rimangono nel citoplasma → quindi la loro espressione è transiente.
 - Gli **adenoassociati**, **retrovirus** e **lentivirus** si integrano nel genoma e danno invece una espressione permanente. Il problema è che non sappiamo DOVE si inseriscono né possiamo indirizzarli; questo può acquisire notevole importanza se parliamo dei protooncogeni; i protooncogeni sono espressi ad un basso livello dalla cellula e quando la cellula stessa lo richiede; questa modalità però può essere alterata dal vettore virale. Questo è successo a 2 pazienti su 3 che hanno ricevuto questa terapia!!! La complicanza più temuta e grave è ovviamente un *tumore*.

PLASMIDE DNA → è un DNA a doppia elica circolare; utilizzando gli enzimi di restrizione e le ligasi, inseriamo il gene, lo coniughiamo con i liposomi così assicuriamo l'ingresso nella cellula. L'espressione dei plasmidi è transitoria.

TRIAL IN CORSO SU PAZIENTI

VETTORE	MALATTIA	TRANSGENE	TARGET	RISULTATO
Plasmide + liposomi	Emofilia	Fattore VIII	Fibroblasti	Quando il fattore VIII aumenta la sintomatologia è migliorata
Plasmide + liposomi	Fibrosi cistica	CFTR	Epitelio delle vie aeree con spray	La sintomatologia non è migliorata perché il CFTR non è aumentato

ADENOVIRUS

Hanno un DNA di 36 kilobasi; si utilizza il sierotipo 5 come primo.

VETTORE	MALATTIA	TRANSGENE	TARGET	RISULTATO
Adenovirus associati sierotipo ?	Fibrosi cistica	CFTR	Epitelio nasale	Sintomatologia non migliorata

ADENOVIRUS ASSOCIATI

RETROVIRUS

Hanno una zona LTR all'estremita

VETTORE	MALATTIA	TRANSGENE	TARGET	RISULTATO
Retrovirus ex-vivo	Deficit della adenosina daminasi	Adenosina deaminasi	T-CELLS CD4 cells Midollo osseo	I casi trattati hanno portato a sviluppo di tumori, forse per l'inserimento del vettore davanti al protooncogene

TERAPIA GENICA PER LA SCID

1. Prelievo di sangue
2. Si isolano i linfociti T che hanno l'antigene CD34
3. Si inserisce il vettore nei linfociti T
4. Si somministra al paziente