

LEZIONE 1

Perché la terapia genica? Molte patologie, dovute a proteine malfunzionanti, non sono trattabili con terapie tradizionali; così, negli anni '70 nasce l'idea della terapia genica, ossia: rilascio intracellulare di materiale genetico per generare un effetto terapeutico, con diverse strategie di intervento a seconda dello scopo prefissato. La terapia genica ha una complessa serie di applicazioni, basata sulle nuove biotecnologie: biologia molecolare e cellulare, farmacologia, clinica medica e interazione con il paziente. Innanzitutto, si può dire che consiste nell'introduzione di un transgene di interesse mediante un veicolo in una cellula bersaglio allo scopo di: correggere un errore del metabolismo, oppure potenziare una funzione cellulare (terapia additiva), o ancora eliminare un prodotto cellulare (terapia ablativa). Il genoma umano ha 3 miliardi di basi, circa 30mila geni e circa 250mila proteine. Le mutazioni possono essere: ereditarie (patologie genetiche), acquisite (tumori), dovute a virus (malattie infettive). Le patologie bersaglio possono essere:

- Monogeniche: immunodeficienze, distrofia muscolare, fibrosi cistica, emofilie, retinopatie, emoglobinopatie, ipercolesterolemia fam, xeroderma pigmentosum
- Multifattoriali: malattie cardiovascolari e neurodegenerative, diabete, artrite reumatoide
- Tumoriali: leucemie, carcinomi
- Infettive: AIDS, epatite B e C
- Acquisite: traumi (fratture ossee, ferite, ustioni), ischemie

La terapia genica può essere di due tipi:

- Somatica: consiste nella manipolazione dell'espressione genica in cellule differenziate dell'individuo adulto; l'alterazione genica riguarda esclusivamente il paziente su cui è stata realizzata
- Germinale: cioè la manipolazione dell'espressione genica in cellule riproduttive; eventuali modificazioni geniche verrebbero trasmesse alla progenie, quindi a differenza della somatica non riguarda solamente un unico paziente: infatti, la germinale non è autorizzata!

La terapia genica può essere realizzata in diversa maniera:

- Ex vivo: le cellule bersaglio sono prelevate dal paziente, modificate geneticamente in laboratorio e reintrodotte nello stesso individuo. Ciò però è possibile solo per alcune malattie (immunologiche, ematologiche, metaboliche). Inoltre non dà problemi immunologici ed è caratterizzato dall'efficienza delle metodiche della trasduzione in vitro
- In situ: il transgene viene rilasciato localmente nel sito d'azione mediante iniezione i.m o intratumorale o per inalazione, ecc...È specifico per tumori localizzati, patologie dell'apparato respiratorio, tessuto cutaneo, ecc...
- In vivo: il transgene viene somministrato per via sistemica e.v. nel corpo del paziente. Ha una scarsa efficienza di trasduzione ed è possibile per cellule e tessuti

poco accessibili.

Il gene clonato, una volta entrato nella membrana nucleare, può essere integrato, o diventare episomico: l'integrazione del transgene nel genoma ospite dà un'espressione stabile; mentre quando il transgene non si integra nel genoma, si ha un'espressione temporanea. Vettori virali (adenovirus, retrovirus, lentivirus, herpes-simplex virus) sono altamente efficienti nel trasferimento genico ed alcuni anche con un'espressione a lungo termine: ma provocano reazione immunitaria, tossicità e alcuni possono causare integrazione random o una mutagenesi inserzionale. Esistono diverse strategie di terapia genica:

- Terapie cellulari: trapianto di cellule geneticamente modificate
- Riparo genico: correzione di gene difettivo
- Compensazione genica: introduzione di copie funzionali del gene difettivo o assente
- Inattivazione: introduzione di RNA antisense per inibire l'espressione genica
- Suicida: introduzione di "geni suicidi" che producono tossine o pro-farmaci
- Anti-angiogenica: interruzione del nutrimento ai tumori
- Anticorpale: introduzione di geni che producono anticorpi intracellulari
- Anti-infiammatoria: prevenzione del riconoscimento dei tessuti da parte dell'organismo
- Vaccinazione: introduzione di geni che inattivano agenti infettivi

Se s'introduce il gene terapeutico nella cellula staminale emopoietica, il suddetto gene verrà espresso in tutte le cellule del sangue. Perché usare le cellule staminali ematopoietiche? Innanzitutto, sono cellule che si autorinnovano, quindi nessuna necessità di ripetute somministrazioni; sono poco numerose e facilmente rimovibili, identificabili, manipolabili e reintroducibili; inoltre il gene terapeutico risiederà in tutte le cellule derivate; e possono migrare in numerosi distretti corporei (midollo osseo, fegato, milza, linfonodi) e funzionare come vettori di trasferimento genico. Ci sono, attualmente, dei limiti, ma già con prospettive future stabilite:

- bassa efficienza di rilascio genico, ma si pensa a sviluppo di nuovi vettori
- bassa specificità di bersaglio; in futuro si avrà lo sviluppo di strategie cellulo-specifiche
- espressione transiente e non fisiologica, però diminuirà con approcci gene-targeting
- reazione immunitaria contro i vettori, che scomparirebbe con lo sviluppo di vettori non immunogenici

La terapia cellulare consiste in trapianti cellulari o trapianti di cellule staminali geneticamente modificate ex vivo; ha mostrato già diversi successi in passato; potenzialmente si pensa al suo utilizzo per malattie metaboliche, ematologiche, morbi di Parkinson e di Alzheimer, infarto, diabete, artrite reumatoide. La terapia genica si sviluppa in diversi passaggi chiave:

- comprensione dei meccanismi patofisiologici della malattia

- individuazione dell'appropriato bersaglio cellulare
- individuazione del metodo ottimale
- creazione di un modello animale della patologia per studi pre-clinici in vivo

Bisogna dire, però, che non esiste una “pallottola magica” valida per tutte le patologie: il successo della terapia genica dipenderà dalla collaborazione di più specialisti e dall'utilizzo dell'appropriata combinazione strategia/vettore per il trattamento di ciascuna patologia. Cenni storici di terapia genica. Nel 1970 ci fu un primo tentativo nell'uomo da S. Rogers, che trattò con il virus del papilloma di Shope pazienti con deficit dell'arginasi: non ebbe successo; nel 1980, cellule midollari di pazienti talassemici trasfettate con DNA ricombinante contenente la sequenza corretta della beta-globulina; caso Cline - esperimenti non autorizzati. Nel 1989 Rosenberg fu l'autore del trapianto in malati terminali di cancro di linfociti TIL (tumor infiltrating lymphocytes) trasfettati con il gene per la resistenza alla neomicina. Nel 1990 Blaise e Anderson furono i responsabili del primo trattamento di un paziente affetto da deficienza di ADA mediante trasferimento genico con retrovirus in linfociti prelevati e ritrapiantati nello stesso paziente, ma i risultati furono negativi. Negli anni '90 ci fu l'approvazione di numerosi protocolli clinici con diversi vettori; ma nel 1999 avvenne il primo decesso causato da vettori virali, con conseguente rivalutazione di tutti i protocolli clinici; poi nel 2002, nuovi problemi: integrazione retrovirale causa tumorigenesi in paziente trattato, quindi ulteriore battuta d'arresto. L'utilizzo di retrovirus per la terapia genica sono due facce della stessa moneta: da un lato c'è la possibilità di inserire stabilmente il gene nel cromosoma e di permetterne un'espressione in quantità sufficiente, dall'altro, invece, il rischio di mutagenesi inserzionale a causa dell'integrazione casuale del virus che può risultare in un'attivazione di proto-oncogeni fino a 100 kbp di distanza, favorendo lo sviluppo di malignità. I vettori sono il veicolo per la trasduzione di un transgene, mentre le cellule bersaglio sono le cellule in cui introdurre il transgene. Caratteristiche di un vettore ideale per terapia genica:

- Tropismo di espressione: localizzazione del transgene
- Durata di espressione: espressione del transgene nel tempo
- Livelli di espressione: quantità di transgene possibilmente regolata
- Efficacia clinica: test funzionali
- Scarsa tossicità: indici di funzionalità di vari organi, parametri biochimici

La durata della trasduzione può essere:

- Stabile: espressione del transgene a lungo termine (malattie metaboliche)
- Transiente: espressione rapida e di breve durata (vaccini a DNA, TG per tumori, ingegneria tissutale)

Esistono, poi, i cosiddetti geni reporter, che sono uno strumento utile per valutare l'avvenuta trasfezione, stabile o transiente. Il gene reporter deve codificare per una proteina che non abbia analoghi funzionali nella cellula trasfettata, caratterizzato da una rivelazione con un sistema semplice e sensibile; e inoltre, la proteina non deve interferire con il normale metabolismo cellulare. Transgeni facilmente evidenziabili mediante

istochimica o metodi immunologici utilizzati per monitorare l'efficienza di un vettore:

- Secreti: monitoraggio nel tempo senza sacrificio dell'animale da esperimento
 - AAT,
 - AFP,
 - SEAP
- Intracellulari: analisi di tropismo ed espressione del vettore; e monitoraggio a lungo termine
 - b-GAL (beta-galattosidasi): l'enzima prodotto da questo gene catalizza la digestione di substrati come l'X-Gal che genera un prodotto colorato),
 - CK
 - GFP (Green fluorescent protein): proteina autofluorescente. La fluorescenza intrinseca della GFP è dovuta a tre amminoacidi (Ser-65-Tyr-66-Gly-67) che ciclizzano formando un cromoforo che ha due massimi di eccitazione: con luce UV (396nm), luce blu (475nm); i massimi di emissione della luce sono rispettivamente a 508 e 50nm. Sono state prodotte diverse versioni modificate della GFP in modo da renderla più adatta come reporter; una delle modificazioni più efficaci ha riguardato la sostituzione della Ser-65 con una Thr: la nuova GFP possiede un solo picco massimo di eccitazione alla luce blu, ed un più forte segnale fluorescente rispetto alla proteina nativa, rendendo più semplice il suo rilevamento

Un altro esempio di gene reporter è rappresentato dalla Luciferasi: il gene luc, clonato dalla lucciola, codifica per un enzima che può essere facilmente rivelato fornendo il substrato Luciferina e rivelando l'emissione luminosa. Il saggio Luciferasi utilizza la luciferina 4-monoossigenasi che, ossidando la luciferina, produce una luce giallo-verde (560nm): la reazione avviene in presenza di ATP e produce AMP, CO₂ e luce, la quale viene misurata utilizzando il luminometro. Quando la luciferina è presente in eccesso, la quantità di luce emessa è proporzionale alla quantità di enzima.

ADENOVIRUS

Il vettore virale si costruisce in laboratorio, il virus è un'altra cosa. I vettori virali principali usati per terapia genica provengono dai seguenti virus wild type:

- Adenovirus
- Retrovirus
- Virus adeno-associati
- Lentivirus (derivati da HIV)
- Herpesvirus

I vettori virali si ottengono inserendo il gene di interesse nel genoma di diversi tipi di virus, sotto il controllo di un promotore forte. Il virus viene reso incapace di riprodursi

autonomamente, venendosi a creare il virus difettivo, per evitare la diffusione di virus ricombinanti. Il genoma viene ingegnerizzato con le tecniche del DNA ricombinante, e trasfettato in particolari linee cellulari capaci di produrre le particelle virali ricombinanti (linee di packaging). Queste cellule complementano, vanno quindi a sopperire, i difetti introdotti nel genoma. Il principale vantaggio dell'utilizzo di vettori virali, consiste nell'elevata efficienza di trasduzione (fino al 100% delle cellule), poiché si sfrutta la capacità fisiologica di un virus di penetrare all'interno della cellula; mentre svantaggi sono:

- Possibilità di generare nuovi virus patogeni per ricombinazione con eventuali virus presenti nell'ospite
- Mutagenesi inserzionale, come per i vettori retrovirali e lentivirali, i quali una volta penetrati nella cellula ospite, si integrano in maniera casuale nel genoma e dare quindi mutagenesi inserzionale
- Molecole di DNA di dimensioni limitate, poiché i virus hanno delle dimensioni che devono essere rispettate
- Reazioni immunitarie
- Costi elevati

I virus difettivi (cioè i vettori virali) possono essere prodotti, visto che servono ad alta concentrazione, solo in particolari linee cellulari (linee di packaging) capaci di complementare i difetti del virus. La loro preparazione deve seguire queste fasi obbligate:

- Costruzione del genoma ricombinante
- Trasfezione del DNA nella linea cellulare, che, amplificando il costrutto, è capace di produrre le particelle virali
- Raccolta e analisi del virus

Esistono diversi tipi di vettori virali:

- Retrovirus: si integrano stabilmente in maniera casuale e possono infettare solo cellule in divisione
- Lentivirus: si integrano stabilmente in maniera casuale e possono infettare cellule quiescenti. Sono derivati del virus dell'HIV
- Adenovirus: non si integrano stabilmente, quindi una volta che penetrano nella cellula ospite non integrati, restano all'interno della cellula e si comportano come episomi e nel corso del tempo (durante la replicazione) vengono perduti; si esprimono ad alti livelli e danno grosse reazioni immunitarie.
- Virus adeno-associati (AAV): integrandosi in maniera sito specifica, in punti innocui (non danno fenomeni di mutagenesi inserzionale) consentono l'espressione stabile nel tempo; difficile produrli ad alto titolo.
- Herpes simplex: molto grandi; infezione molto selettiva dei neuroni, ma importanti effetti citotossici.

Gli adenovirus (virus dell'influenza, della congiuntivite...) furono caratterizzati nei primi anni '50, come membri della famiglia degli *Adenoviridae*. Hanno un genomavirale