

OGM

Sara Buccarella, Federica Giovannini, Giulia Monacelli, Chiara Dalle Vacche, Eleonora Filipponi
Corso di Tecniche di Medicina Rigenerativa, a.a. 2018/19

Un **OGM** è un organismo vivente che possiede un patrimonio genetico modificato tramite tecnologia del DNA ricombinante, che consente l'aggiunta, l'eliminazione o la modifica di elementi genici.

La definizione di OGM deriva dalla **Direttiva 2001/18 CE**: "Organismo il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale."

Da questa definizione deduciamo che non rientrano in questa categoria tutti gli organismi che hanno subito modifiche genetiche tramite processi spontanei e incroci, invece ne fanno parte quegli organismi dal cui genoma sono stati tolti dei geni oppure quelli in cui il materiale genetico inserito proviene da un organismo "donatore" della stessa specie.

Per ottenere un OGM si usano le biotecnologie, insieme di procedimenti tecnici atti a modificare la struttura e la funzione di organismi viventi per la produzione di materiali biologici utili nella medicina, nell'industria e nell'agricoltura. Ci sono due tipi di biotecnologie:

- TRADIZIONALI**: Tecnologie antichissime, basate su incroci tra organismi di razza diversa, come ad esempio agricoltura, zootecnia e lo sfruttamento delle attività fermentative dei microrganismi. Queste tecniche risalgono a metà 1800, quando si individuarono i batteri responsabili della fermentazione di latte, birra e burro e quando si scoprì la penicillina, importante per la creazione degli antibiotici.

- AVANZATE**: Sono tutte le tecnologie innovative biologiche e genetiche che permettono lo studio e le operazioni sugli organismi direttamente a livello cellulare, come avviene nel caso dell'ingegneria genetica o della tecnologia del DNA ricombinante. La diffusione di queste tecniche risale agli inizi degli anni '70; la novità di quel periodo storico è stata l'acquisizione a livello scientifico della scoperta dell'esistenza dei processi molecolari per cambiare porzioni di informazione genetica corrispondenti a geni e trasferirli da una specie a qualunque altra.

Il primo passo di tali tecniche di manipolazione dei geni è stato certamente la scoperta degli enzimi di restrizione (1970), per la quale Werner Arber, Daniel Nathans e Hamilton Smith ricevettero il Premio Nobel per la Medicina nel 1978. Questi enzimi svolgono un ruolo molto importante nell'estrazione del DNA. Per estrarre il DNA bisogna rompere le cellule trattandole con sostanze litiche e detergenti. Le molecole di DNA, separate dalla miscela di cellule con tecniche purificanti, vengono tagliate in frammenti più piccoli. Per effettuare ciò si utilizzano enzimi di restrizione: endonucleasi, se i tagli avvengono all'interno della catena; esonucleasi, se avvengono alle estremità. Essi non tagliano la doppia elica a caso, bensì agiscono in sequenze bersaglio di nucleotidi, in corrispondenza di una specifica sequenza di coppie di basi, creando delle estremità appiccicose/coesive. Il taglio avviene mediante idrolisi. Si ottengono un numero di filamenti di DNA di lunghezza variabile, legato alla presenza di sequenze bersaglio che si trovano nei plasmidi. I tagli avvengono sempre nella stessa sequenza di basi, per qualsiasi molecola di DNA, quindi tutti i frammenti hanno estremità coesive complementari, che si uniscono spontaneamente. I suddetti enzimi di restrizione costituiscono il primo vero kit delle tecnologie del DNA ricombinante. Tale espressione è spesso usata per intendere le varie tecniche utilizzate dall'ingegneria genetica.

Il primo OGM fu ottenuto nel 1973, quando due ricercatori Boyer e Cohen, grazie all'uso combinato delle nuove tecniche di biologia molecolare che si stavano sviluppando, riuscirono per primi a clonare un gene di rana all'interno del batterio *Escherichia coli*, dimostrando che era possibile trasferire materiale genetico da un organismo ad un altro tramite l'utilizzo di vettori plasmidici in grado di auto replicarsi. Successivamente la Genentech, fondata da Herbert Boyer, è riuscita infatti a produrre attraverso *E. coli* importanti proteine umane ricombinanti: la somatostatina* (1977) e l'insulina (1978), il farmaco biotecnologico più noto, che è stato commercializzato a partire dal 1981. La commercializzazione dell'insulina ha segnato un cambiamento epocale per l'industria del farmaco, aprendo il settore biotecnologico (precedentemente confinato nei laboratori di ricerca) all'industrializzazione, e rivoluzionando il processo di *drug discovery* e lo sviluppo di nuove terapie non invasive.

*La somatostatina è un ormone polipeptidico, prodotto dall'ipotalamo, dall'apparato digerente, dal pancreas e ha un effetto inibente sulla secrezione di GH (ormone della crescita) e prolattina; inibisce anche l'attività secretoria di insulina, glucagone, renina, ormoni tiroidei, ecc.

Kaare Nielsen, con riferimento al gene codificante, cioè portatore del carattere di interesse, ha proposto di adottare una nomenclatura precisa per differenziare i vari organismi "ingegnerizzati", ponendo cinque livelli lungo i quali la distanza genetica tra l'organismo ricevente il gene e il "donatore" (virus, batterio, fungo, vegetale, animale) aumenta progressivamente:

- 1) Intragenici → quando il DNA proviene dalla stessa specie
- 2) Familigenici → quando il DNA proviene da specie affini interfeconde
- 3) Lineagenici → quando il DNA proviene da specie della stessa linea filogenetica
- 4) Transgenici → quando il DNA proviene da specie filogeneticamente lontani
- 5) Xenogenici → quando il DNA esogeno è costituito da geni artificiali

È possibile fare una distinzione anche in riferimento al tipo di organismo coinvolto:

- Procarioti
- Piante
- Animali

Tale distinzione sarà approfondita in seguito; comunque, noi ci focalizzeremo sugli animali transgenici.

Partendo dalla definizione di transgene, ovvero un gene estraneo inserito in un qualsiasi organismo tramite operazioni di ingegneria genetica, con il termine **transgenesi** si intende l'inserimento di un gene esogeno all'interno del genoma di un organismo bersaglio che funge da ospite; qui il transgene verrà espresso e sarà poi trasmesso alla progenie.

Le origini della transgenesi risalgono alla metà degli anni '70, quando Rudolf Jaenish provò ad iniettare frammenti di DNA di SV40 (virus che può causare tumori) nella cavità celomatica di un embrione di topo, dimostrando che si potevano ottenere così dei mammiferi mutanti. Ancora però questi animali non potevano essere considerati transgenici.

Nel 1980 un nuovo gruppo di scienziati capeggiati da Gordon e Ruddle fece un nuovo esperimento: microiniettò del DNA ricombinante all'interno dello zigote, dimostrando in seguito la trasmissione del transgene alla progenie. Gli animali ottenuti, sono stati per la prima volta denominati transgeni, e questa tecnica è comunemente adoperata ancora oggi. Nel 1982 si assiste ad una nuova tappa fondamentale nella storia della transgenesi: gli scienziati R.D. Palmiter e R.L. Brinster microiniettarono nei topi il gene dell'ormone della crescita. L'esperimento produsse dei ceppi di topi molto più grandi di quelli normali, dimostrando che era possibile modificare oltre al genotipo anche il fenotipo.

Ad oggi la tecnica del DNA ricombinante è stata utilizzata non solo per la produzione di nuovi farmaci, ma anche di enzimi per ridurre l'impatto ambientale dell'industria, piante e animali con caratteristiche migliorative in termini di resistenza alle malattie o di *performance* produttive e ambientali, ma anche organismi quali l'oncotopo, usato nella ricerca sul cancro, che hanno portato con sé importanti quesiti etici oltre ad aver aperto la strada a dispute per l'uso a fini sperimentali o commerciali delle innovazioni scientifiche.

Gli scopi principali della transgenesi animale sono i seguenti:

- **Produzione di biomedicine**
- **Modelli per la ricerca su malattie umane**
- **Xenotrapianti** (trapianti di organi da una specie non umana all'uomo): Il suino è considerato la specie più adatta a questo scopo, perché presenta delle somiglianze dal punto di vista anatomico. Il maggiore ostacolo è tuttavia quello immunologico, perché potrebbe verificarsi un rigetto da parte dell'organismo, che inizia a produrre anticorpi contro l'organo trapiantato. In questo senso gli approcci transgenici puntano a inibire le reazioni degli anticorpi, responsabili del rigetto. Altri studi hanno invece puntato sul trapianto di cellule o tessuti transgenici, che potrebbero offrire interessanti possibilità per la cura di diverse malattie, ad esempio il morbo di Parkinson
- **Miglioramento delle produzioni animali**

Esistono diversi metodi di transgenesi. I più semplici consistono nell'uso di batteri e virus come vettori per il trasferimento genico.

I campi di applicazione della transgenesi sono molteplici: settore agricolo, alimentare, zootecnico e medico.

È interessante citare degli esempi di OGM nei vari settori di applicazione:

1. *Piante: Golden Rice*

Il Golden Rice o Riso dorato è una varietà di riso prodotta attraverso una modificazione genetica che introduce la via di biosintesi del precursore beta-carotene della provitamina A nelle parti commestibili del riso. In particolare sono stati introdotti i geni:

- *psy* (fitoene sintasi) di *Narcissuspseudonarcissus* (Narciso) e, successivamente, al fine di ottenere maggiori quantità di beta-carotene, di Mais;
- *crtI* (carotene desaturasi) di un batterio del suolo, *Erwiniauredovora*.

Attraverso tecniche di ingegneria genetica, i geni sono stati introdotti all'interno del genoma nucleare del riso con promotore endosperma-specifico così da permettere la trascrizione dei due geni soltanto all'interno della cariosside del riso.

2. *Animali: Pecora Dolly (1996)*

La pecora Dolly è stata il primo mammifero ad essere stato clonato con successo da una cellula somatica adulta, e non da un embrione. Infatti precedentemente si era già sperimentata la clonazione con piante, rane, topi.

Per effettuare questa clonazione, si è partiti dal nucleo di una cellula della mammella di una pecora bianca di 6 anni della razza FinnDorset. Il nucleo contiene quasi tutti i geni di una cellula. L'obiettivo era quello di riprogrammare le cellule mammarie della pecora, per mantenerle in vita, ma bloccandone la crescita. Quindi, è stata iniettata questa cellula in una cellula uovo non fecondata, dalla quale era stato tolto il nucleo. Sono state fuse le cellule mediante impulsi elettrici. Dopodiché, la cellula fusa doveva trasformarsi in un embrione, allora è stata tenuta in un terreno di coltura per 6/7 giorni. Dopo essersi assicurati che effettivamente questa cellula si duplicava e si sviluppava normalmente, è stata impiantata in una madre surrogata. Delle 277 fusioni cellulari, 29 primi embrioni si sono sviluppati e sono stati impiantati nelle 13 madri surrogate. Solo una gravidanza però fu portata a termine.

3. *Uomini: gemelli cinesi geneticamente modificati per resistere all'HIV.*

Si è trattato della modifica del DNA di alcuni embrioni umani per immunizzarli contro l'HIV, il virus dell'AIDS. Lo scienziato Hi Jiankui ha spiegato con alla tecnica di editing genomico Crispr, sia riuscito ad immunizzare i futuri umani dall'infezione da HIV, disattivando il gene CCR5. Questa notizia ha portato alla nascita di alcuni dibattiti, poiché questo gene, sebbene costituisca la via d'accesso per l'infezione, conferisce anche resistenza ad altri tipi di virus, come quello dell'influenza.

Quindi ci sono diverse obiezioni sia sullo svolgimento della pratica sia sull'etica.

Adesso verranno illustrate nel dettaglio le tecniche di realizzazione degli OGM, sottolineando la distinzione tra procarioti, piante e animali.

TECNICHE DI INGEGNERIA GENETICA

Tecniche principali:

Ai fini della definizione di OGM data dalla Direttiva 2001/18/CE, come detto precedentemente, sono considerate tecniche che hanno come risultato un organismo geneticamente modificato:

- tecniche di ricombinazione del materiale genetico che comportano la formazione di nuove combinazioni mediante l'utilizzo di un vettore di molecole di DNA, RNA o loro derivati, nonché il loro

inserimento in un organismo ospite nel quale non compaiono per natura, ma nel quale possono replicarsi in maniera continua;

- tecniche che comportano l'introduzione diretta in un organismo di materiale ereditabile preparato al suo esterno, tra cui la macroiniezione e il microincapsulamento;
- fusione cellulare (inclusa la fusione di protoplasti: le cellule parentali possono appartenere alla stessa specie o a due specie diverse. Queste vengono private delle pareti cellulari e trattate con PEG e sali di calcio e magnesio che servono alla fusione delle membrane e quindi l'unione di citoplasmi e nuclei delle cellule fuse. Questa fusione di cellule batteriche o di lievito serve quindi al rimescolamento dei patrimoni genetici delle due cellule e quindi all'acquisizione di nuovi caratteri da parte di uno dei due ceppi.) o tecniche di ibridazione per la costruzione di cellule vive, che presentano nuove combinazioni di materiale genetico ereditabile, mediante la fusione di due o più cellule, utilizzando metodi non naturali.

Nuove tecniche di manipolazione genetica chiamate cisgenesi e genome editing saranno studiate a partire dal 2016 dal CREA Centro di ricerca specializzato del Ministero delle politiche agricole italiano.

Procarioti:

Per inserire nuovi frammenti di DNA negli organismi si usano dei "vettori". I vettori sono generalmente piccole molecole circolari di DNA, i plasmidi, o strutture derivate da virus in grado di immagazzinare materiale genetico. Sono tre i processi attraverso cui è possibile modificare il genoma batterico:

- La trasformazione batterica è un processo, osservabile in natura, attraverso il quale alcuni procarioti (detti "competenti") sono in grado di ricevere del DNA esterno in grado di produrre nuove caratteristiche di fenotipo. Oggi sono state sviluppate alcune tecniche, per quanto molto empiriche, in grado di rendere "competenti" anche batteri che non lo sono naturalmente. È stato dimostrato, infatti, che l'ingresso di DNA è ampiamente facilitato dalla presenza di certi cationi, come Ca^{2+} , o dall'applicazione di una corrente elettrica (tecnica detta dell'"elettroporazione": il metodo consiste nel sottoporre le cellule a uno shock elettrico in modo da rendere le membrane cellulari permeabili al DNA che si vuole inserire. Una soluzione contenente un'alta concentrazione di DNA viene aggiunta ad una sospensione di cellule animali o batteriche o protoplasti e la sospensione viene sottoposta a un campo elettrico. Lo shock elettrico provoca l'apertura dei pori presenti a livello della membrana plasmatica delle cellule o dei protoplasti permettendo l'entrata del DNA. In seguito all'elettroporazione le cellule o i protoplasti vengono fatti crescere in coltura prima di iniziare la selezione delle cellule che hanno integrato il DNA. La limitazione principale dell'elettroporazione è dovuta alla necessità di dover utilizzare protoplasti e non cellule vegetali integre (con parete cellulare), con le difficoltà connesse alla rigenerazione di piante intere da essi.) I vettori utilizzati nelle trasformazioni sono essenzialmente plasmidi: in seguito all'ingresso, i plasmidi non si integrano nel genoma, ma rimangono autonomi (in uno stato detto "episomale").
- Nella coniugazione batterica, il DNA è trasferito da un batterio all'altro attraverso un pilum (contatto attraverso un ponte citoplasmatico). Un plasmide può essere così trasferito da un organismo all'altro. La coniugazione, molto frequente in natura, è poco sfruttata come tecnica di modificazione genetica.
- La trasduzione è infine l'inserimento di materiale genetico nel batterio attraverso un virus batteriofago.

Per inserire il segmento di DNA che codifichi il gene voluto, è necessario conoscere la funzione dei geni su cui si sta operando. Nei batteri, è relativamente semplice identificare la funzione di un gene specifico: i ricercatori a tale scopo sono soliti realizzare dei ceppi batterici cosiddetti knock out. In questi ceppi viene eliminato il DNA relativo al gene d'interesse: osservando le conseguenze sulla vita del batterio, è possibile identificare la funzione del gene stesso. L'uso di knock out è molto diffuso, non solo per i procarioti. È possibile realizzare knock out in numerosi organismi modello. Il gene responsabile della fibrosi cistica, ad esempio, è stato individuato in topi knock-out: una volta individuato il presunto gene della fibrosi cistica (chiamato CFTR) nell'uomo, i ricercatori hanno individuato l'omologo nel genoma del topo, ne hanno fatto un knock out verificando poi che senza tale gene il topo presentava tutti i sintomi clinici della malattia.

Piante:

La principale tecnica di modificazione genetica per le piante è legata alla capacità naturale del batterio Agrobacterium tumefaciens di infettare piante e causare una crescita paragonabile a quella tumorale presente negli animali, tale patologia è nota come "galla del colletto". Agrobacterium tumefaciens è in grado di infettare la pianta trasferendo una porzione di plasmide (noto come plasmide Ti, Tumour inducing) che è in grado di integrarsi nel genoma dell'ospite. Il plasmide contiene diversi geni che, una volta "letti" dalla pianta, generano la galla e producono nutrienti (opine) per il batterio consentendone la crescita. Gli ingegneri del gene sono riusciti a sfruttare le caratteristiche positive di questo plasmide (capacità di penetrare e integrarsi nel genoma della cellula vegetale), eliminando i geni responsabili del tumore, gli oncogeni T, e inserendo al loro posto il gene "passeggero" che si vuole trasferire alla pianta.

Un altro processo largamente utilizzato per produrre piante OGM è il metodo biolistico (anche detto gene gun o particle gun), che permette di "sparare" microproiettili di oro o tungsteno ricoperti di DNA all'interno delle cellule vegetali. Tale metodo è stato utilizzato, ad esempio, per la produzione del più comune cereale OGM, il Mon810. Con questa tecnica il DNA esogeno viene fatto aderire sulla superficie di microsfere di oro o tungsteno, di 1 micrometro di diametro, che vengono "sparate", a una velocità intorno ai 500 m/sec, sui campioni da trasformare. Il vantaggio principale di questo metodo sta nella possibilità di trasformare cellule vegetali integre: infatti i bersagli utilizzati per questo tipo di trasformazione sono in genere colture di cellule embrionali, ma anche foglie e semi.

Sicuramente i campi in cui le piante transgeniche vengono usate maggiormente a fini sperimentali è quello dei vaccini (sono state prodotte piante con antigeni di tantissimi agenti eziologici di malattie quali ad esempio AIDS, papilloma virus, epatiti, carie dentale, vaiolo), biorisanamento di siti contaminati, genomica funzionale (per scoprire cioè le funzioni di geni e proteine poco conosciute).

Animali:

I metodi per la generazione di animali transgenici sono:

- Microiniezione nel pronucleo maschile;
- Gene targeting tramite ricombinazione omologa in cellule staminali embrionali;
- Trasferimento nucleare e clonazione;
- Genome editing.

MICROINIEZIONE: frammenti di DNA vengono iniettati con una micropipetta di vetro (1-2 picolitri di DNA, che contengono circa 100-200 copie del gene) nel pronucleo maschile di ovociti fecondati, indotta mediante ormoni che aumentano l'ovulazione. Il DNA esogeno, costruito in cui è stato inserito il gene di interesse tramite un vettore, dovrà essere adeguatamente amplificato tramite diverse tecniche. Gli embrioni iniettati vengono coltivati in vitro fino allo stadio di morula e poi impiantati nell'utero di femmine di topo pseudogravide. Il gene inserito viene integrato nel genoma della cellula uovo che verrà trapiantata in una madre adottiva, la quale darà origine alla nascita di un topo "chimera" (mosaico di cellule con patrimoni genetici diversi). Nella fase successiva effettuiamo un incrocio riproduttivo tra il topo chimera ed uno non mutato. Avremo la nascita di topi portatori del DNA esogeno, ma eterozigoti. Solamente nel successivo incrocio tra topi transgenici eterozigoti avremo la nascita di topi omozigoti per il gene introdotto. La presenza del transgene è mostrata attraverso PCR. La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica che permette l'amplificazione enzimatica delle sequenze di DNA senza dover far uso di un organismo vivente come vettore (come E. Coli o cellule di lievito). Questa tecnica permette l'amplificazione esponenziale anche di piccole molecole di DNA; essendo però una tecnica in vitro non è adatta alla lavorazione di sequenza di DNA particolarmente lunghe. Un tipico ciclo di PCR prevede quattro fasi principali che si ripetono più volte:

1. Denaturazione al calore di uno stampo di DNA che deve essere copiato (94 – 99 °C)
2. Appaiamento (annealing) di coppie di oligo, (30 – 65 °C). Estensione da parte di DNAPol termoresistente (Taq polimerasi) a partire dai primer. (65 – 72°C)
4. Legame dei frammenti opposti dello stesso segmento tramite l'enzima ligasi.

Vantaggi:

- DNA esogeno non deve necessariamente essere clonato in un vettore;

- I frammenti di DNA contenenti il gene di interesse andranno ad integrarsi nel genoma dell'animale ospite in copie multiple in modo casuale.

Svantaggi:

- L'integrazione random è non controllabile e non consente la sostituzione di eventuali geni malati esistenti;
- L'iniezione nel pronucleo può generare animali "mosaico" e l'espressione genica può essere limitata solo a determinati tessuti o organi;
- Otteniamo animali transgenici vivi pari a circa il 5% delle uova inoculate ed il gene potrà non essere espresso così come sovraespresso, dipendendo dal sito di inserzione.

GENE TARGETING (trasferimento genico mirato): Mutagenesi mirata mediante ricombinazione omologa (rottura a doppio filamento usata per lo scambio di informazioni genetiche nel corso della meiosi) in cellule staminali. Questa tecnica, messa a punto dall'italoamericano Capecchi permette la creazione di una mutazione in un gene predeterminato. La mutazione può avere come risultato:

- 1) Inattivazione dell'espressione di un gene: Knock out (introduzione di sequenza genica per l'abolizione della funzione genica endogena);
- 2) Diminuzione dell'espressione di un gene: Knock down;
- 3) Inserzione di un gene difettivo: Knock in.

Il gene targeting sul topo segue generalmente i seguenti passaggi: a) Realizzazione del costrutto di DNA modificato: viene identificato il gene da inserire o silenziare. Il DNA da modificare viene tagliato tramite opportune tecniche ed in esso viene inserita la porzione di materiale genetico di interesse. L'avvenuta inserzione è verificata tramite opportuni marker che identificano le cellule con materiale genetico corretto (Es: se inserisco un gene che si occupa della resistenza agli antibiotici, il marker sarà l'antibiotico corrispondente). b) Inserimento del costrutto genetico in SC embrionali di topo in coltura. Le ESC pluripotenti sono prelevate da una blastocisti di topo e fatte crescere su uno strato di fibroblasti. Tale strato è sottoposto a radiazioni così da danneggiare le cellule, senza causarne la morte, e stimolare la produzione di fattori trofici necessari per la crescita delle SC da parte dei fibroblasti, vitali ma non in divisione. Le SC formano così delle colonie che verranno mantenute nello stadio indifferenziato e trasfettate poi con il vettore tramite elettroporazione o uso di sali di calcio-fosfato (I sali vengono utilizzati con lo scopo di creare pori nelle membrane cellulari rendendole così permeabili al DNA esogeno. Per quanto riguarda le cellule animali viene utilizzato il CaCl_2 mentre per le cellule batteriche il $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). c) Selezione delle cellule che presentano un inserimento corretto, iniezione in blastocisti di topo ed impianto in topo pseudogravido. d) I topi nati dalla prima progenie non sono topi effettivamente transgenici, ma chimere. Vengono quindi incrociati con topi non mutati così da ottenere topi transgenici eterozigoti, successivamente questi ultimi vengono incrociati tra loro per dare origine a topi che possono essere non mutati, transgenici eterozigoti o transgenici in senso stretto, secondo le regole di Mendel.

Vantaggi: Le ES (embrionali staminali) sono dotate di elevata efficienza di ricombinazione omologa, pertanto la ricombinazione tra sequenze di DNA omologhe presenti nel vettore e nel genoma del ricevente consente di introdurre il frammento di DNA esogeno in una posizione specifica e quindi studiare meglio le malattie genetiche. Svantaggi: metodo laborioso che richiede molto tempo e si riscontra un'alta mortalità di progenie omozigote.

TRASFERIMENTO NUCLEARE: La clonazione è la riproduzione asessuata di un intero organismo vivente o di una singola cellula. Il genoma contenuto nel nucleo contiene l'intera informazione genetica necessaria per originare un intero organismo quindi, se il nucleo di una cellula differenziata viene introdotto in una cellula uovo privata del suo nucleo, il nuovo organismo potrà essere programmato per generare un intero organismo.

Vi sono due diverse applicazioni:

- Clonazione riproduttiva: mira a creare una copia di un animale esistente. Il DNA è rimosso e sostituito con il DNA prelevato da un animale adulto; l'uovo fecondato viene successivamente impiantato in un utero, creando un gemello.
- Clonazione terapeutica: stesse fasi iniziali della clonazione riproduttiva, ma segue una rimozione delle SC nella copia del pre-embrione. Il suo scopo è la produzione di cellule e tessuti somatici con un genoma nucleare identico a quello della cellula di partenza. Tale tecnica permette dunque la

creazione di un clone pre-embrionale del paziente dal quale estrarre le ESC perfettamente e geneticamente compatibili con quelle del paziente (è possibile interromperne il processo solo per la crescita delle CS. Una volta ottenute e moltiplicate, fungono da cellule sostitutive per cellule già morte rallentando notevolmente il decorso di una malattia degenerativa quale l'Alzheimer).

Vantaggi:

- Creazione progenie in vitro,
- Potenzialmente utile per xenotrapianto,
- Produzione di grosse quantità di proteine ricombinanti,
- Conservazione di animali in via di estinzione.

Svantaggi:

- Bassa efficienza,
- Presenti anomalie negli animali ed alterazione della metilazione del DNA,
- Tendenza alla rottura quindi non consente l'uso di pipette o aghi. Il metodo più efficace consiste nello sciogliere la membrana cellulare tramite saponi e con il campo elettrico (il nucleo ha una carica) far uscire il nucleo dalla cellula ed inserire il nucleo dell'adulto. Potrebbe essere utile per generare organi specifici per un paziente evitando il rigetto.

GENOME EDITING: Sfrutta il sistema CRISPR/Cas consente di aggiungere, rimuovere o cambiare la sequenza di geni specifici. Tramite l'enzima nucleasi Cas9 e appropriati RNA guida (gRNA) nelle cellule, il genoma dell'organismo può essere tagliato in qualsiasi punto in maniera precisa. Nella cellula uovo fertilizzata viene inoculato un complesso di molecole codificanti per CRISPR/Cas ed un vettore targeting per il gene da modificare: il CRISPR si attacca al gene bersaglio e la nucleasi Cas taglia entrambi i filamenti del DNA disattivando il gene. Il risultato sarà l'interruzione del gene e l'inserimento, ad opera degli enzimi di riparazione del DNA, della mutazione voluta.

Vantaggi: - Molto più veloce della ricombinazione omologa delle ES poiché agiamo direttamente sullo zigote senza passare attraverso le SC, - No costi eccessivi.

Svantaggi: - Tecnica limitata alle sequenze riconosciute dalle nucleasi, - Rischio di off-targeting (possibilità che la modifica di un gene vada a intaccare, in modo imprevedibile e indesiderato, altre zone del genoma dato che l'RNA può legarsi anche a sequenze simili ma non identiche a quella che si vuole modificare).

IL TOPO COME MODELLO DI MALATTIE UMANE

Il genoma di un roditore contiene circa 30.000 geni e quasi l'80% di questi sono in comune con la nostra specie. Oltre ad essere facilmente allevabile, di piccole dimensioni e riprodurre nidi numerose, il topo possiede un DNA che, attualmente, risulta completamente sequenziato e mappato. Per tale ragione è il mammifero più utilizzato in letteratura, negli studi che riguardano la modifica di DNA. Anni di allevamento e approcci genetici sperimentali hanno consentito la produzione di più di 1000 ceppi mutanti. Un numero significativo e soprattutto utile che potrebbe consentire la comprensione di patologie, mediante la determinazione di modelli predittivi di malattie genetiche congenite o sporadiche, con l'unico scopo di trovare cure adeguate alle stesse. Al momento, è possibile caratterizzare il genoma di un topo praticamente a piacere. Non vi è alcun limite nella creazione di fenocopie di eventuali mutazioni, o variazioni cromosomiche, identificate in una malattia. Per definizione, un topo transgenico possiede i cromosomi alterati. Generalmente, la modifica del DNA comporta l'acquisizione di una funzione da parte delle cellule, come, per esempio, la produzione di una nuova proteina, la quale potrebbe essere usata per modellare aspetti particolari di una malattia. In realtà se il DNA straniero interferisce con un percorso biochimico, può impedire la produzione di una specifica proteina, e dunque può verificarsi il processo inverso, ovvero la perdita della funzione. Nei topi transgenici l'effetto che incide su un determinato gene è osservabile nell'intero organismo. Ecco perché sono validi modelli. Inoltre, possiedono sistema nervoso e quello

riproduttivo come quelli dell'uomo e contraggono molte delle malattie umane, come cancro, diabete e persino l'ansia. La manipolazione del genoma può provocare in essi delle malattie dalle quali normalmente non sarebbero colpiti.

Esempi di ceppi transgenici

Il topo, pertanto, è l'animale da laboratorio più comunemente usato. Grazie alle potenzialità di manipolazione genetica il suo utilizzo si preferisce a quello dei ratti e altri roditori, sia nei test di sicurezza che nella ricerca principale. Tra i topi geneticamente modificati troviamo ad esempio *topi di grandi dimensioni*, *oncotopi* e *topi Doogie*. Quelli di grande dimensione vengono modificati con un gene dell'ormone della crescita, tale da farli ingrandire più del normale e sono impiegati per lo studio dello sviluppo e della crescita stessa. Negli *oncotopi* viene inattivato un oncogene e tale disattivazione li predispone all'accrescimento del cancro. Sono di particolare importanza sia per la comprensione di molti tumori che per la determinazione di tecnologie per il trattamento. Infine, i *topi Doogie* che presentano una migliore memoria e capacità di apprendimento. Risultano avere una funzionalità potenziata dei recettori NMDA, le molecole proteiche di cui ha bisogno il cervello per immagazzinare informazioni nuove.

Storia Topi knock-out

I topi knockout, ovvero con un gene soppresso, possono essere considerati dei validissimi strumenti nel campo della ricerca medica. La tecnica che ha condotto alla creazione di topi knockout nasce dalla scoperta di Joshua Lederberg, che ricevette il Premio Nobel nel 1958. Nello specifico, Lederberg scoprì che si potevano incrociare dei ceppi di batteri che generavano una prole che mostrava l'unicità della propria genetica, come avviene nella riproduzione sessuale. Successivamente, nel momento in cui vennero impiegati i raggi X per provocare le mutazioni a livello delle strutture genetiche, fu possibile tramandare le modificazioni. Due scienziati, Mario Capecchi e Oliver Smithies, partendo dalla tecnica che Lederberg aveva già maturato, tentarono di definire i modi di alterazione di sequenze specifiche nel genoma dei mammiferi. Nel frattempo, Martin Evans si concentrò sulle cellule staminali embrionali e fornì il mezzo necessario all'introduzione di mutazioni genetiche in un animale vivo, in particolare in un topo fecondato. Nel 2007 Capecchi, Evans e Smithies ricevettero il Premio Nobel per la medicina, in merito alla scoperta riferita al modello murino e alla nascita del topo Knock-out. Grazie a ceppi di topo knockout (con un gene soppresso) o ceppi knock-in (con un gene inserito), è possibile determinare la funzione esatta di un particolare gene di un roditore geneticamente modificato.

Tecniche introduzione DNA

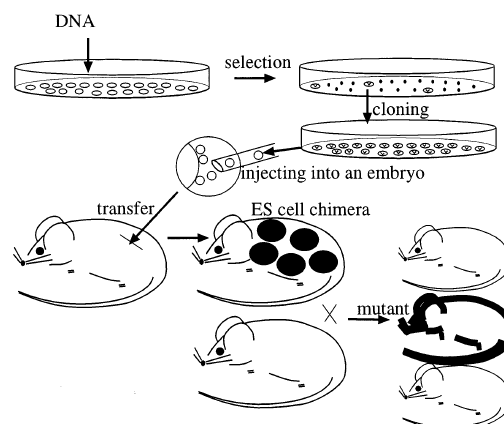
Si introduce del DNA straniero (della stesse specie, o di una specie diversa) nei geni che si trovano nel nucleo di ogni cellula del corpo dell'animale. Come detto in precedenza, le due principali tecniche di introduzione di DNA straniero nel topo sono:

- Iniezione di DNA nel pronucleo: Il DNA straniero si integra nel genoma in una posizione a caso, di solito dopo che la prima o le prime due divisioni cellulari hanno avuto luogo. Il DNA transgenico non sarà presente in tutte le cellule del topo, e di conseguenza, l'animale sarà solo parzialmente transgenico. Gli ovuli o gli spermatozoi di topi semi-transgenici verranno poi usati per creare la generazione successiva di topi totalmente transgenici.
- Utilizzo di cellule staminali embrionali: il DNA straniero viene immesso nelle cellule staminali embrionali; In tal caso, avviene la ricombinazione omologa.

Processo di creazione di topi knock-out

I topi knock-out e i topi knock-in sono generati secondo la tecnica *gene-targeting*, precedentemente illustrata. In genere si utilizzano come ospiti, topi con il pelo di colore diverso, in modo tale da distinguere quelli con i geni mutati. Dall'embrione si sviluppa un topo chimera che si accoppia con un topo non mutato. Nasce una prole che possiede il manto dello stesso colore del pelo del topo il cui DNA è stato originariamente alterato. Il successivo incrocio tra questi darà origine a topi knockout.

Si utilizzano modelli predittivi murini al fine di sviluppare approcci terapeutici ottimali e comprendere al meglio malattie umane.



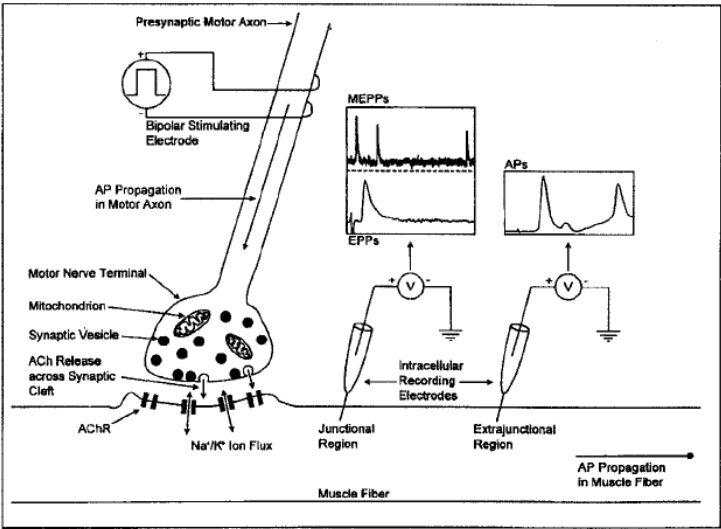
TRASMISSIONE NEUROMUSCOLARE IN UN MODELLO ANIMALE TRANSGENICO

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa caratterizzata da una perdita selettiva dei motoneuroni nel sistema nervoso centrale. La degenerazione del motoneurone nella SLA coinvolge sia i motoneuroni superiori localizzati nella corteccia motoria sia quelli inferiori del midollo spinale e del tronco dell'encefalo. Studi in letteratura hanno riportato che la SLA può dipendere da difetti nel gene che codifica la superossido-dismutasi 1 (SOD1), un enzima fondamentale per la cellula, che interviene nei meccanismi di difesa contro gli agenti ossidanti. L'enzima SOD1, se difettoso, forma aggregati proteici tossici per il motoneurone e fa diminuire la sua presenza nel nucleo della cellula nervosa. Questo causa una maggiore sensibilità del DNA ai danni provocati dagli agenti ossidanti. Ad ogni modo, non è ancora chiaro come la mutazione del gene SOD1 porti alla degenerazione del motoneurone. I topi transgenici G93A, che sovraesprimono forme mutate del SOD1, sviluppano una patologia molto simile a quella osservata nei pazienti affetti da SLA e per questo sono comunemente utilizzati come modello animale di SLA umana. Proprio perché, non sono del tutto noti i meccanismi che comportano la paralisi muscolare grave, si cerca di individuare le cause principali che alterano il funzionamento dei motoneuroni. Nel modello transgenico, la perossidazione lipidica causata dall'espressione di SOD umano mutante, potrebbe originare patogenesi, compromettere la ripolarizzazione della membrana e alterare la cinetica dei canali di calcio voltaggio-dipendenti, i quali si occupano del rilascio del neurotrasmettitore acetilcolina, responsabile trasmissione nervosa. Tali modificazioni si manifestano come anomalie nella funzione del motoneurone. In questo studio si cerca di esaminare gli effetti della mutazione SOD1 sulla funzione del terminale del nervo motorio (MNT) ed esplorare il meccanismo patogenetico alla base della malattia.

A tal fine, è stato utilizzato un microelettrodo intracellulare che registra i biopotenziali sinaptici evocati dalla funzione neuromuscolare. (fig 1). Nello specifico, si è tenuto conto del contenuto quantico (m) dei potenziali evocati (EPP), dei potenziali ridotti (MEPP) e del potenziale di membrana a riposo (RMP), tutti relativi alla trasmissione neuromuscolare e importanti per il funzionamento dei canali di calcio voltaggio-dipendenti. Si confronta, quantitativamente, la trasmissione neuromuscolare in tre gruppi di topi:

1. Transgenici G1H e G1L con il gene SOD umano mutato;
2. Transgenici di controllo N29 con il gene SOD umano di tipo selvaggio;
3. Animali normali, non trattati, di tipo selvatico usati come controlli (wild-type).

L'analisi si è concentrata su nervo frenico e muscolo soleo dei topi in quanto i muscoli del diaframma, così come i muscoli degli arti posteriori, negli animali G1H, sono i principali a degenerare. I topi, tra i diversi gruppi, possedevano differenti età: sono stati utilizzati animali G1H di 70-90 giorni e animali G1L di 130-150 giorni (periodi in cui gli animali transgenici manifestano i sintomi iniziali della malattia). Per la registrazione di potenziali ridotti spontanei MEPP, seguiti da un serie di potenziali evocati EPP, è stato utilizzato un programma di campionamento computerizzato e una stimolazione del nervo a 2 Hz. Immediatamente dopo la registrazione di singoli MEPP o EPP è avvenuto il campionamento dei potenziali di membrana a riposo (RMP).



Al fine di garantire l'accuratezza e la coerenza delle misurazioni nei diversi gruppi di animali, i potenziali evocati sono stati calcolati in tre differenti modi:

- m_d metodo diretto,
- m_i metodo di varianza indiretta
- m_f metodo per fallimento:

$$m_d = \overline{EPP} / \overline{MEPP}, \tag{1}$$

$$m_i = \overline{EPP} / q = (\overline{EPP})^2 / v = (\overline{EPP} / \sigma)^2, \tag{2}$$

$$m_f = \log_e N/N_0, \tag{3}$$

In cui EPP e MEPP sono ampiezze medie. In realtà, l'ampiezza dei singoli MEPP o EPP è stata corretta individualmente secondo la formula:

$$E_c = E (-77 / RMP_i)$$

In cui E_c ed E sono le ampiezze corrette e non corrette (mV), rispettivamente, e RMP, il potenziale di membrana a riposo (mV).

Risultati

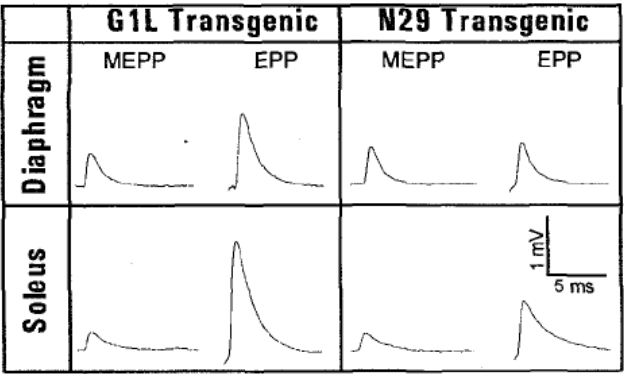


Figure 2. MEPPs and EPPs recorded from G1L transgenic (ALS) and N29 transgenic (control) mice. The synaptic potentials shown are signal-averaged waveforms (20 MEPPs and 40 EPPs).

Nei muscoli del diaframma dei topi G1H il contenuto quantico dei potenziali evocati è significativamente aumentato rispetto ai valori trovati nei corrispondenti topi di controllo N29 o animali wild-type. In realtà anche nei topi G1L si ottiene lo stesso risultato, come riportato in figura (Fig. 2). Al contrario, il contenuto quantico negli animali N29 non è significativamente diverso dagli animali di tipo selvatico, il che indica che l'aggiunta del normale gene umano SOD non ha causato alcuna disfunzione nei motoneuroni. Inoltre, la

frequenza e l'ampiezza dei potenziali ridotti (MEPP) non sono particolarmente differenti. Ad ogni modo l'afflusso di calcio, mediato dai canali voltaggio dipendenti, verso il motoneurone, in linea generale, risulta aumentato nei topi con gene SOD umano mutato. Questo significa che nei topi modificati si ha un afflusso di calcio maggiore rispetto a quelli non modificati (potenziali più alti, canali che sono voltaggio dipendenti lasciano passare più calcio). Chiaramente può esserci più di una possibile interpretazione di questo processo. In ogni caso una interpretazione può comunque essere associata alla dipendenza dei canali di calcio alla tensione. Di conseguenza, non è possibile trascurare i canali di calcio voltaggio-dipendenti nel processo di malattia degenerativa poiché questi risultano caratteristici del modello animale transgenico di SLA.

STUDI SU IPERTROFIA MIOCARDICA E APOPTOSI MIOCARDIOCITARIA

La **stenosi valvolare aortica** è, attualmente, tra le valvulopatie più diffuse nei Paesi sviluppati e la sua prevalenza aumenta con l'avanzare dell'età, raggiungendo il 4% degli adulti di età superiore agli 85 anni. Nella stenosi aortica è presente un ostacolo meccanico che limita il flusso di sangue nel ventricolo sinistro con conseguente aumento di pressione, e l'unico trattamento efficace e definitivo al momento è rappresentato dall'impianto protesico della valvola.

Per poter capire i meccanismi fisiopatologici coinvolti nella stenosi aortica si è fatto riferimento all'articolo scientifico italiano riportato in bibliografia, il cui scopo è proprio quello di fornire una revisione aggiornata di tali meccanismi.

In presenza di sovraccarico e/o pressione, i miocardiociti, come prima risposta compensatoria, aumentano nelle loro dimensioni, provocando quella che viene definita **ipertrofia ventricolare sinistra**, ovvero l'ingrossamento delle pareti muscolari che costituiscono il ventricolo. Soltanto dopo che le cellule hanno raggiunto un volume critico e l'ipertrofia non può manifestarsi ulteriormente, comincia la divisione cellulare, la quale rappresenta quindi l'ultima riserva di crescita nel cuore ipertrofico. Nello scompenso terminale poi, la proliferazione si riduce e prevale la morte cellulare per apoptosi e necrosi.

Numerosi modelli sperimentali hanno dimostrato che l'ipertrofia miocardica e lo scompenso cardiaco sono caratterizzati da una consistente perdita di miocardiociti. Uno dei meccanismi proposti per spiegare tale perdita, che si verifica con la transizione dall'ipertrofia compensatoria allo scompenso, è l'**apoptosi**, un processo mediante il quale le cellule pervengono all'autodistruzione attivando una complessa catena di eventi. L'apoptosi dei miocardiociti è caratterizzata dalla formazione di corpi apoptotici fagocitati dalle cellule senza infiammazione o cicatrizzazione miocardica (cosa che invece avviene con la morte per necrosi). Pertanto, interventi capaci di interferire con il processo di morte cellulare potrebbero influenzare positivamente la funzione ventricolare e il rimodellamento cardiaco.

Inoltre, è stato dimostrato che negli uomini l'ipertrofia ventricolare sinistra è associata ad un'aumentata formazione di numerosi fattori di crescita, che i fattori di crescita sono prodotti in relazione al tipo di sovraccarico emodinamico e che la produzione dei fattori di crescita cambia in relazione allo stress di parete sistolico.

Nonostante i notevoli sviluppi conseguiti in ambito diagnostico e terapeutico nei confronti dei pazienti con stenosi aortica, la sostituzione valvolare chirurgica rimane tuttora il solo trattamento realmente efficace. Tuttavia, le recenti evidenze sperimentali e cliniche sulla rilevanza fisiopatologica dell'ipertrofia miocardica, della disfunzione micro-circolatoria e dell'apoptosi miocardiocitaria nella stenosi aortica, suggeriscono che importanti traguardi possano essere conseguiti sia sul piano scientifico sia clinico nei confronti di questa malattia.

A questo punto, verranno illustrati due studi che utilizzano topi transgenici per analizzare l'ipertrofia cardiaca e l'apoptosi miocardiocitaria.

Nello studio effettuato da **O'Leary et al.** sono stati sviluppati topi geneticamente modificati, alterati per studiare alcuni aspetti dell'elettrofisiologia della membrana cardiaca.

Il gruppo sotto investigazione era composto da quattro topi transgenici knockout, caratterizzati da ipertrofia cardiaca con separazione tra le fibre muscolari ventricolari aumentata. Tali topi sono stati confrontati con un gruppo normale di controllo, composto da quattro topi sani. La dimensione media del cuore in un topo transgenico risultava essere approssimativamente 1.5 cm lungo l'asse maggiore e 1 cm lungo lo stesso asse nel gruppo di controllo.

È stata progettata una sonda personalizzata per registrare gli elettrogrammi epicardici del ventricolo intatto del topo, posizionando 16 elettrodi organizzati in una matrice 4x4 di area pari a 1 mm² direttamente sul cuore, sulla superficie epicardica del ventricolo destro anteriore. I dati sono stati raccolti effettuando, per ogni elettrodo, 2 misure, della durata di 5 secondi, prima in una posizione e poi con una rotazione di 90°. Un Labview Virtual Instrument è stato progettato per controllare la digitalizzazione, l'archiviazione e la visualizzazione in tempo reale dei segnali durante la raccolta. L'orientazione delle fibre muscolari cardiache è stata determinata usando metodi istologici standard.

Immediatamente dopo l'acquisizione del segnale, il sito di registrazione e l'orientazione dell'elettrodo sono stati marcati usando una penna micro-cauterizzante ed il cuore è stato esportato; i cuori sono stati quindi incorporati in gel congelato o paraffina per il sezionamento.

L'analisi dei dati è stata svolta utilizzando Matlab, per individuare i tempi di attivazione locale, creare mappe isocrone e plot dei vettori di velocità spaziale.

Confrontando due diversi topi nel gruppo di controllo, i pattern di attivazione erano simili per le medesime posizioni. Invece, confrontando i topi transgenici con il gruppo di controllo, la direzione di attivazione era ruotata di 90°, nonostante la sonda fosse posizionata nello stesso punto e con stessa orientazione su ogni cuore.

Le mappe isocrone, insieme ai vettori di velocità spaziale, hanno fornito una prova visiva dei cambiamenti nei modelli di conduzione, che sono il risultato di un cambiamento nella struttura delle fibre del muscolo cardiaco. Inoltre, si ha indicazione di un tempo di attivazione più lento nei topi transgenici rispetto al gruppo di controllo. I risultati istologici dimostrano l'allungamento previsto delle cellule e un aumento della spaziatura interstiziale nella geometria cardiaca.

Queste osservazioni hanno suggerito che negli animali transgenici anche la comunicazione tra le cellule era stata alterata, probabilmente a causa di cambiamenti nella distribuzione delle giunzioni tra i miociti cardiaci.

Nelle conclusioni di questo studio, si sottolinea come le differenze tra le strutture tissutali e nella direzione dei modelli di conduzione locale tra le fibre muscolari, suggeriscono che esiste una differenza di comunicazione tra le cellule; questo riflette una differenza nella distribuzione della giunzione di gap nei topi transgenici e svolge un ruolo nell'attivazione epicardica.

Per valutare se l'apoptosi del miocita cardiaco possa essere un meccanismo di insufficienza cardiaca, nello studio condotto da **Wencker et al.** hanno creato topi transgenici in cui la morte delle cellule muscolari cardiache poteva essere attivata a piacimento, grazie alla presenza di una specifica proteina di fusione composta da 3 moduli di FKBP-12 umana attaccati ai domini catalitici p20 e p10 della caspasi-8 umana. Tale proteina di fusione è cataliticamente inattiva e può essere stimolata mediante somministrazione sistemica ai topi di una molecola (FK1012H2) che può contemporaneamente legare due moduli FKBP e quindi indurre

l'oligomerizzazione della proteina transgenica. Come controllo è stata creata un'ulteriore linea transgenica che si differenzia dalla prima per una mutazione puntiforme che inibisce l'attività della caspasi.

Valutando gli effetti dell'induzione acuta dell'apoptosi, hanno visto come la letalità della molecola somministrata dipendesse dalla funzione della caspasi, in quanto la linea di controllo era risultata completamente resistente anche alle dosi più elevate, mentre i topi transgenici sotto analisi erano morti. Pertanto, l'attivazione di una caspasi-8 nel cuore determina una massiva apoptosi del miocardio e morte del topo.

L'intenzione dello studio nel generare topi con FKBP-caspasi-8 era quella di creare un modello in cui fosse possibile valutare gli effetti di bassi livelli di apoptosi dei miociti sulla struttura e sulla funzione cardiaca. Hanno visto come, anche senza la somministrazione della molecola, i topi della linea transgenica altamente espressiva presentavano comunque un aumento della mortalità a partire da circa 8-9 settimane di età. Al contrario, è stata osservata una normale durata di vita nei topi transgenici di controllo. È stato quindi ipotizzato che la riduzione della sopravvivenza nei topi della linea espressiva derivasse dalla cardiomiopatia dovuta a bassi, ma comunque anormali, livelli di apoptosi dei miociti. Per verificare questa ipotesi, la struttura cardiaca e la funzione sono state valutate in diversi momenti: a 3 settimane di età l'ecocardiografia e l'analisi istologica sono risultate normali, mentre a 9 settimane i topi transgenici presentavano dilatazione ventricolare sinistra.

Per indagare il ruolo dell'apoptosi dei miociti nella cardiomiopatia dilatativa è stata eseguita una colorazione su sezioni cardiache di animali che non avevano mai ricevuto la dose ed è stata valutata la frequenza dell'apoptosi spontanea dei miociti. Nei topi transgenici era sensibilmente aumentata, ma comunque piuttosto bassa. In particolare, è risultata essere da quattro a dieci volte inferiore rispetto alle stime della morte dei miociti nei cuori umani in fallimento.

Questi dati dimostrano che l'induzione di un livello molto basso di apoptosi dei miociti, inferiore a quella osservata nell'insufficienza cardiaca umana, è sufficiente per indurre una cardiomiopatia letale.

Questi esperimenti dimostrano che la morte cellulare è realmente un fattore critico in questo modello, ma per determinare l'universalità dell'apoptosi dei miociti come fattore patogeno nell'insufficienza cardiaca sarà necessario testare l'effetto di inibizione dell'apoptosi in altri modelli.

Il meccanismo più probabile con cui l'attivazione della caspasi contribuisce alla cardiomiopatia è attraverso la morte del miocita cardiaco, e questa ipotesi è fortemente supportata dai dati di questo studio, che mostrano uno stretto legame tra l'induzione e l'inibizione dell'apoptosi dei miociti cardiaci e lo sviluppo e la prevenzione, rispettivamente, della cardiomiopatia. È possibile, tuttavia, che le caspasi influenzino anche la struttura cardiaca e funzionino indipendentemente dalla loro modulazione dell'apoptosi.

Coloro che hanno svolto questo studio riportano tra le conclusioni come essi ritengano che tale studio fornisca la prima prova diretta del fatto che i bassi livelli cronici di apoptosi dei miocardiociti sono una componente causale nella patogenesi dell'insufficienza cardiaca e che esista la possibilità che l'inibizione della morte cellulare possa fornire un nuovo bersaglio per trattamenti diretti a questo disturbo comune e letale.

STUDIO SUL MORBO DI PARKINSON

L'aumento dell'incidenza di malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson è diventato uno dei problemi di salute più difficili per gli uomini anziani. Nonostante sia trascorso molto tempo da quando venne identificata l'alterazione neurochimica della malattia del Parkinson questa malattia neurodegenerativa presenta ancora diverse zone d'ombra. Per fare luce sugli aspetti ancora da chiarire, i ricercatori possono avvalersi di modelli animali transgenici come modelli sperimentali per studiare patogenesi, prognosi, diagnosi, trattamento e prevenzione di malattie tra cui Alzheimer, la malattia di Huntington, Malattia del Parkinson, sclerosi laterale amiotrofica, atrofia muscolare spinale. Questi modelli continuano a fornire informazioni preziose, consentendo anche di sperimentare nuove strategie terapeutiche.

Parkinson:

Il Parkinson è una malattia neurodegenerativa, ad evoluzione lenta ma progressiva, che coinvolge, principalmente, alcune funzioni quali il controllo dei movimenti e dell'equilibrio. Essa deve il suo nome al medico inglese James Parkinson che nel 1817 la descrisse per la prima volta, pubblicando il trattato "An Essay of the Shaking Palsy". La malattia è presente in tutto il mondo. Si riscontra in entrambi i sessi e l'età media di esordio è intorno ai 58-60 anni. Circa il 20% dei pazienti presenta una storia familiare positiva per la malattia. Si stima che i familiari di persone affette da malattia di Parkinson presentino, rispetto alla popolazione generale, un rischio di sviluppare la patologia lievemente superiore. È una malattia non curabile con un rallentamento del suo decorso tramite terapie adeguate. Purtroppo la causa specifica della morte di questi neuroni non è ancora nota.

I principali sintomi motori della malattia di Parkinson sono il tremore a riposo, la rigidità, la bradicinesia (lentezza dei movimenti automatici) e, in una fase più avanzata, l'instabilità posturale (perdita di equilibrio); questi sintomi si presentano in modo asimmetrico (un lato del corpo è più interessato dell'altro). Nella malattia di Parkinson si possono presentare anche fenomeni non motori, che possono esordire molti anni prima della comparsa dei sintomi motori. Si evidenziano più spesso nelle fasi iniziali della malattia e con frequenza massima in quelle più avanzate. I sintomi non motori più frequentemente osservati sono: i disturbi vegetativi (alterazione delle funzioni dei visceri), dell'olfatto, del sonno, dell'umore, la fatica e i dolori.

Le strutture coinvolte nella malattia di Parkinson si trovano in aree profonde del cervello, note come gangli della base, che partecipano alla corretta esecuzione dei movimenti. La malattia neurodegenerativa è causata dalla distruzione dei neuroni dopaminergici a livello della substantia nigra e dalla degenerazione delle terminazioni nervose nel SNC. I pazienti affetti da questa malattia presentano quindi una grave riduzione del movimento dovuta alla morte delle cellule localizzate nella zona adibita alla sintesi ed il rilascio della dopamina. La dopamina è un neurotrasmettitore con il compito di veicolare le informazioni tra neuroni attraverso la sinapsi. Dal midollo al cervello cominciano a comparire anche accumuli di una proteina chiamata alfa-sinucleina. Quindi, lo studio dell'aggregazione di alfa-sinucleina è un obiettivo comune nello sviluppo di approcci farmaceutici per prevenire o migliorare la malattia del Parkinson e di altre numerose malattie neurodegenerative.

La dopamina non può essere somministrata come tale, poiché non riuscirebbe ad attraversare la barriera ematoencefalica per raggiungere il cervello. La cura farmacologica più utilizzata consiste nella somministrazione di L-dopa (levodopa) che è un aminoacido naturale, precursore della dopamina, che viene metabolizzato in sostituzione alla dopamina, e riesce a passare la barriera ematoencefalica del SNC e raggiungere così il cervello. Essa viene captata dalle cellule della sostanza nera ancora funzionanti. Tuttavia tale cura presenta numerose complicazioni, alcune legate al dosaggio del farmaco.

Alfa-sinucleina

Le cause della malattia non sono ancora ben precisamente note. Sembra che vi siano molteplici elementi che concorrono al suo sviluppo. Ci sono però alcune mutazioni note associate alla malattia del Parkinson. Questi fattori sono principalmente di tipo genetico e tra i geni individuati quelli più importanti sono: alfa-sinucleina (PARK 1/PARK 4), parkina (PARK-2), PINK1 (PARK-6), DJ-1 (PARK-7), LRRK2 (PARK-8) e la GBA (glucocerebrosidasi). Il gene PARK1 codifica la proteina α -sinucleina (α sin) la cui funzione non è completamente nota, ma sembra coinvolta nella regolazione dell'integrità della membrana delle vescicole sinaptiche.

Le sinucleine sono abbondanti proteine del cervello, le cui funzioni fisiologiche sono scarsamente comprese. La famiglia delle sinucleine consiste di tre membri: α -, β - e γ -synuclein. La α e la β -sinucleina sono concentrate nei terminali nervosi, mentre la γ -sinucleina sembra essere presente in tutte le cellule nervose. L'alfa-sinucleina (aSyn) è una proteina lunga 140 amminoacidi ed è normalmente espressa nei neuroni del sistema nervoso centrale e periferico. L'alfa-sinucleina è la principale proteina implicata nella patogenesi della malattia di Parkinson, in quanto i suoi aggregati formano i componenti primari dei corpi di Lewy e dei neuriti di Lewy, che sono le caratteristiche patologiche di questa malattia. Dal punto di vista strutturale, l'alfa-sinucleina contiene tre domini principali: un dominio N-terminale che contiene strutture a α -elica, un dominio centrale idrofobico probabilmente responsabile della formazione di aggregati e un dominio C-terminale, caratterizzato dalla presenza di residui acidi e residui di serina e tirosina e che si pensa possa avere un ruolo nella interazione con altre proteine. Fino ad oggi sono state identificate cinque mutazioni: A53T, A30P e E46K, H50Q e G51D, tutte localizzate nella porzione N-terminale della proteina. I meccanismi molecolari che collegano α -sin alla patogenesi di queste malattie tuttavia non sono ancora noti. L'ipotesi originaria sulla quale si sono concentrati la maggior parte degli studi sosteneva che la presenza di α -sin mutata o la sua sovraespressione favorisse la formazione di aggregati proteici, la cui presenza all'interno della cellula a lungo andare portasse ad un effetto tossico e quindi alla conseguente morte cellulare. Recentemente tuttavia, una nuova idea ha iniziato a emergere: diversi lavori hanno dimostrato come α -sin sia indispensabile per alcune funzioni cellulari, e addirittura in alcune situazioni risulti essere protettiva per le cellule che subiscono particolari insulti. L'ipotesi prevalente al momento è quindi rappresentata dal fatto che l'effetto protettivo e l'effetto tossico di α -sin siano strettamente dipendenti dai suoi livelli di espressione nella cellula. Sembra, infatti, che l'accumulo di α -sin e la conseguente formazione di particolari stati di aggregazione, possano essere dannosi per la cellula, mentre la normale presenza della proteina sia fisiologicamente utile e protettiva.

Alcuni ricercatori giapponesi hanno scoperto che la alfa-sinucleina interferisce con la trasmissione degli impulsi nervosi.

Nel cervello, l'alfa-sinucleina normalmente si trova nelle terminazioni nervose presinaptiche. Quest'ultime rilasciano messaggeri chimici, chiamati neurotrasmettitori, tramite le vescicole sinaptiche. Il rilascio di neurotrasmettitori permette di trasmettere segnali tra i neuroni ed è fondamentale per la normale funzione cerebrale. Il rilascio di neurotrasmettitori trasmette segnali tra i neuroni ed è fondamentale per la normale funzione cerebrale. Sebbene la funzione di alfa-sinucleina non sia ben compresa, gli studi suggeriscono che essa svolge un ruolo importante nel mantenere un adeguato apporto di vescicole sinaptiche nei terminali presinaptici. Può anche aiutare a regolare il rilascio di dopamina, un neurotrasmettitore che è fondamentale per controllare l'inizio e l'arresto di movimenti volontari e involontari. Infatti l'alfa-sinucleina interagisce con le cellule nervose della substantia nigra provocandone la frammentazione, compromettendo la produzione di energia che conduce alla morte cellulare. La morte di queste cellule si traduce in un'attività molto ridotta delle cellule secernenti dopamina.

Sviluppo di modelli transgenici

Un'evoluzione della modellistica per lo studio della malattia del Parkinson si è avuta proprio con l'introduzione dei modelli transgenici, che si basano sull'induzione dell'espressione del gene codificante per l'alfa-sinucleina umana, sia nella forma normale che nelle forme recanti una o entrambe le mutazioni legate al morbo di Parkinson (A53T e A30P). Il modello di topo transgenico A53T imita i sintomi fenotipici più importanti dell'aggregazione dell'alfa-sinucleina e dei corrispondenti deficit motori e appartiene quindi ai migliori modelli della malattia del Parkinson disponibili. I modelli attualmente impiegati sono sostanzialmente di due tipi e si differenziano a seconda che l'espressione del gene per la alfa-sinucleina sia ubiquitaria (dappertutto) oppure limitata al SNC.

Nel primo caso, l'espressione del gene "estraneo" viene indotta a livello sistemico, utilizzando vettori di tipo plasmidico durante le prime fasi dello sviluppo embrionale dell'animale (topo). L'iperespressione di alfa-sinucleina, soprattutto nella forma mutata, induce accumulo intra-neuronale della proteina, con formazione di inclusioni citoplasmatiche in varie aree cerebrali (corteccia, ippocampo, sostanza nera) e deficit motori, non necessariamente associati a deficit marcati della funzionalità nigro-striatale. In effetti, utilizzando questo modello sono state descritte alterazioni a livello delle terminazioni dopaminergiche striatali senza, tuttavia, che fosse osservabile degenerazione neuronale nel SNC, né chiara presenza di inclusioni "Lewy body-like".

Nel secondo modello transgenico, l'espressione di sinucleina viene indotta selettivamente nella SNC del topo adulto, mediante infusione diretta di vettori adeno-virali recanti, nella loro singola elica di DNA, il gene dell'alfa-sinucleina umana, normale o mutata. In questo caso, le alterazioni sono più evidenti, con una chiara degenerazione nei neuroni nigrali, presenza di inclusioni citoplasmatiche "Lewy body-like" positive per la sinucleina, riduzione della dopamina striatale ed alterazioni motorie. Il fatto che le alterazioni anatomo-patologiche e funzionali siano più marcate è vero similmente dovuto alla selettività anatomica ed alla maggiore quantità di espressione transgenica di alfa-sinucleina ottenibile con questa tecnica.

Procedura e risultati dell'esperimento:

Procedura:

sia il gene alfa-sinucleina in forma normale sia la sua forma mutata A53T sono clonati in un vettore di espressione, cioè una sequenza ridotta di DNA che può trasportare specifiche sequenze. Vengono quindi micro iniettati nell'ovocita di topo con uno specifico background genetico. Il livello di espressione dell'alfa-sinucleina è stato analizzato con il metodo Western blot: per entrambi i ceppi di topo sono state registrate quantità simili della proteina a livello della corteccia e del midollo spinale. I topi A53T iniziano a sviluppare inclusioni simili al corpo di Lewy, costituite da alfa-sinucleina e altre proteine a tre mesi di età. Prima dei 7 mesi di età non si registra alcun deficit motorio in entrambi i ceppi murini, a partire dai 6 mesi di età, i topi transgenici alfa-sinucleina A53T mostrano gravi deficit motori, perdita di peso, ambolazione ridotta, paralisi parziale degli arti, perdita della capacità di rotolamento, analizzati con il test Beam Walk e RotaRod. I topi maschi e femmine sono ugualmente colpiti. Per la valutazione delle capacità motorie è stato utilizzato il test Rota-Rod al quale i topi sono stati sottoposti 3 volte al giorno per 3 giorni consecutivi. Si osserva, individualmente, la capacità di restare sul rullo. Si osserva, individualmente, la capacità di restare sul rullo. Per limitare le sofferenze degli animali questi vengono soppressi dopo 10-20 giorni dalla prima manifestazione della patologia. Il test delle prestazioni del RotaRod è un test delle prestazioni di un roditore. Nel test, il topo è posto su un cilindro rotante orientato orizzontalmente sospeso sopra un pavimento della gabbia, che è abbastanza basso da non ferire l'animale, ma abbastanza alto da indurre l'evitamento della caduta. I roditori cercano naturalmente di rimanere sul cilindro rotante, ed evitare di cadere a terra. Il periodo di tempo in cui un dato animale rimane su questa asta rotante è una misura del loro equilibrio, coordinazione e condizione fisica.

Risultati:

Si è osservata la formazione di inclusioni di alfa-sinucleina nelle zone quali corteccia, ippocampo, sostanza nera. Il modello ha dimostrato che lo sviluppo di deficit motorio sino alla morte è accompagnato dalla formazioni di queste inclusioni. Le inclusioni osservate in questi animali mancano tuttavia di una organizzazione fibrillare che invece è caratteristica dei corpi di Lewy che accompagnano il morbo di Parkinson nell'uomo. Inoltre, alcuni ceppi utilizzati hanno mostrato deficit motorio e presenza di inclusioni della proteina ma non una diminuzione del livello dopaminico nella substantia nigra, che è caratteristica comune nella manifestazione del morbo nell'uomo. Dai risultati ottenuti i ricercatori hanno potuto studiare e verificare come i topi transgenici portatori del gene mutato A53T mostravano le inclusioni di alfa-sinucleina, la morte neuronale e i difetti della memoria. Tutto ciò è servito per comprendere meglio quali proteine e quali modificazioni genetiche portano alla formazione e allo sviluppo della malattia del Parkinson.

Conclusioni: l'uso di modelli di animali transgenici possono permettere di cercare di mettere a punto terapie innovative per la malattia di Parkinson.

Adesso i ricercatori sperano che l'Anle138b risulti idonea anche all'uso terapeutico per l'essere umano. La serie di esperimenti condotti in provetta e sul modello animale sembra dimostrare che questa speranza è fondata. Oltre a indagini biochimiche e strutturali, questi test hanno incluso anche vari modelli animali della malattia di Parkinson attualmente studiati a Monaco e nei laboratori di «Microscopia su nanoscala e fisiologia molecolare del cervello» a Gottinga. I ricercatori hanno somministrato l'anle138b a topi predisposti geneticamente a sviluppare una condizione simile al Parkinson. I topi presentavano sintomi come funzione cerebrale anomala, memoria alterata e livelli elevati di proteine amiloide-beta o tau nel cervello. Il trattamento con anle138b ha normalizzato l'attività cerebrale e migliorato la capacità di apprendimento dei topi. Risultato degli esperimenti sul modello animale: i topi transgenici esposti all'Anle138b presentavano una coordinazione motoria molto migliore rispetto ai loro simili non trattati. «Possiamo verificare direttamente questa differenza con una sorta di test di fitness», spiega il Prof. Dr. Armin Giese. «Sistemiamo i topi su un piccolo cilindro rotante e misuriamo per quanto tempo mantengono l'equilibrio. Più a lungo e più facilmente ci riescono, migliore è la loro coordinazione motoria.» Dagli esperimenti è emerso che in generale più precoce era l'inizio della terapia con l'Anle 138b, maggiore era il successo della terapia e più a lungo gli animali rimanevano in remissione. Oltre che sui topi con Parkinson, l'efficacia dell'Anle138b è stata testata anche su altri modelli animali. Alla luce di questi risultati incoraggianti, i ricercatori nutrono la giustificata speranza che l'Anle138b possa prevenire anche l'aggregazione fatale di altre proteine, come ad esempio la proteina associata all'insorgenza dell'Alzheimer. Nei mesi e negli anni a venire, essi intendono verificare questa ipotesi compiendo altri esperimenti sui rispettivi modelli animali.

I ricercatori invitano però a non farsi prendere dall'euforia: i risultati ottenuti sui roditori non possono infatti essere trasferiti direttamente all'uomo. Prima di tutto, occorre escludere la tossicità dell'Anle138b sui non roditori. Solo se queste verifiche avranno esito positivo entreranno in considerazione studi clinici sull'essere umano. La strada è ancora lunga e disseminata di ostacoli.

Bibliografia

1. Lotrionte M. et al., Ruolo fisiopatologico dell'ipertrofia miocardica, della disfunzione microcircolatoria e dell'apoptosi miocardiocitaria nella stenosi valvolare aortica, 2006.
2. EA O'Leary et al., Cardiac Activation Mapping in a Transgenic Mouse Model of Cardiac Hypertrophy, Computers in Cardiology 1998 Vol.25
3. Wencker D. et al., A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure, J Clin Invest 2003
4. Anle138b: una molecola che regala speranza, Armin Giese dell'Università Ludwig Maximilian di Monaco e Christian Griesinger dell'Istituto Max Planck di chimica biofisica di Gottinga
5. <https://www.parkinson.it/la-malattia-di-parkinson.html>
6. TRANSGENIC ANIMALS AS NEW APPROACHES IN PHARMACOLOGICAL STUDIES ; Li-Na Wei
Department of Pharmacology, University of Minnesota
7. Sintomi precoci della malattia di Parkinson nelle scimmie transgeniche α -sinucleina - HMG Advance
Access published December 30, 2014, Yuyu Niu, Xiangyu Guo, Yongchang Chen, Chuan-En Wang⁴,
Jinquan, Weili Yang, Yu Kang, Wei Si, Hong Wang, Shang-Hsun Yang, Shihua Li, Weizhi Ji, Xiao-Jiang
Li, Yunnan Key, Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming, China
8. Animal models of Parkinson's disease -Fabio Blandini and Marie-Therese Armentero;
Interdepartmental Research Center for Parkinson's Disease, IRCCS National Neurological Institute C.
Mondino e Laboratory of Functional Neurochemistry, Pavia, Italy
9. Transgenic Rodent Models to Study Alpha-Synuclein Pathogenesis, with a Focus on Cognitive Deficits,
Asa Hatami and Marie-Francoise Chessele
10. Materiale del PhD Magneschi Leonardo, "Biotechnologie ed OGM", Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa.
11. Ennio Brovedani, Animali transgenici – aspetti scientifico-tecnici, etici e giuridici, dal sito
"Aggiornamenti sociali".
12. Materiale del corso di Biotechnologie, "Organismi geneticamente modificati: i transgenici", Università
di Ferrara.
13. The age of gene editing: everything you need to know about CRISPR/Cas9, dal sito "futurismo.com"
14. Neuromuscular transmission in a transgenic animal model of motor neuron disease, Young I. Kim,
Connie Joo, Charlie C. Cheng, Cristina E. Davis, Thomas J. O'Shaughnessy, Depts. Of Biomedical
Engineering and Neurology, University of Virginia School of Medicine
15. Mouse Models for Human disease, Sylvie N Hardouin, Andras Nagy, Munksgaard 2000