

Durante gli anni '80 le metodiche di biologia molecolare subirono un notevole progresso. **Clonaggio** e **sequenziamento** di vari geni portarono all'identificazione di svariate alterazioni geniche in diverse patologie e anche alla capacità di modificare microrganismi che permettessero l'espressione di molecole d'interesse.

Clonaggio = tecnica mediante la quale è possibile ottenere molteplici copie di una determinata sequenza di DNA.

Sequenziamento = metodica grazie alla quale è possibile stabilire l'ordine esatto in cui sono disposte le basi azotate nel DNA.

Fu in questi anni quindi che la concezione della terapia genica prese piede, sostenuta dalla forte motivazione che spinge ancora oggi a uno sviluppo sempre più serrato di questa tecnologia: la necessità di curare malattie genetiche per le quali non esistono cure efficaci.

Si iniziò a valutare l'idea di utilizzare il trasferimento di materiale genetico, più precisamente di una versione 'funzionante' del gene, in modo da poter rimediare al difetto causa della malattia. Nata come un'idea, la terapia

genica è divenuta una scienza che si è sviluppata con il solo scopo di correggere un difetto genetico o di conferire una nuova funzione alla cellula trattata per combattere una determinata patologia.

La terapia genica consiste quindi in procedure di **trasfezione di DNA** (introduzione di DNA esogeno in cellule riceventi eucariotiche) all'interno delle cellule con lo scopo di prevenire o curare determinate patologie: il DNA viene utilizzato direttamente come se fosse una sostanza farmaceutica.

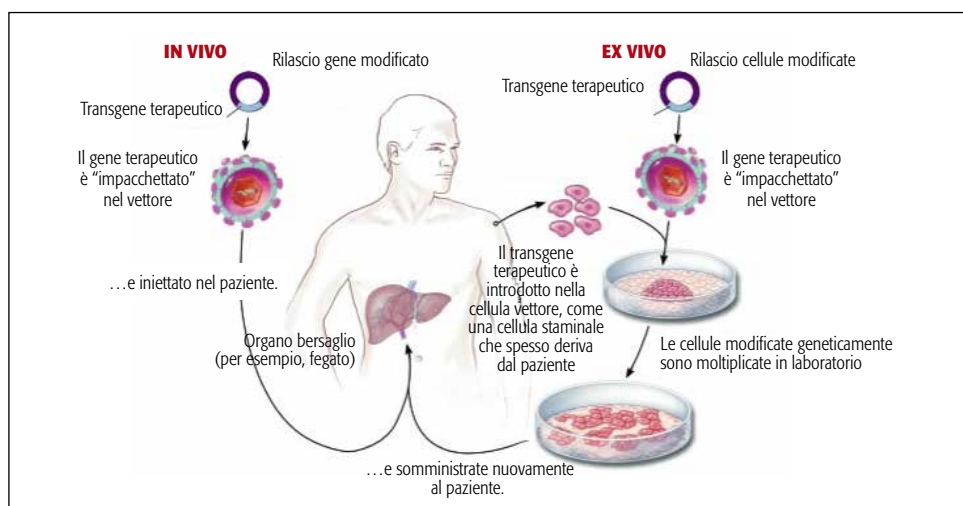
L'idea della terapia genica è nata alla fine degli anni '70 del XX secolo quando fu clonato il primo gene, quello codificante per la β -globina (proteina che costituisce il 97% circa del globulo rosso maturo). Quando la β -globina è espressa in modo errato oppure in quantità ridotta causa la β -talassemia (malattia ereditaria nella quale la presenza di emoglobina è ridotta). Si intravede allora la possibilità di intervenire su questo gene per ottenere dei globuli rossi sani.

Da allora, con lo sviluppo di nuove tecnologie, è cominciata la reale evoluzione di questa innovativa tecnica terapeutica che vede il suo primo trattamento nel 1990 in pazienti affetti da immunodeficienza grave combinata da deficit di adenosina deaminasi (SCID ADA).

La terapia genica può essere applicata sia a cellule somatiche (di conseguenza il difetto è curato solo nel soggetto sottoposto a terapia) sia a cellule germinali (per cui la modificazione applicata con la terapia viene trasmessa alle generazioni successive).

La terapia genica è inoltre suddivisa in:

- **terapia genica in vivo**: cellule come quelle di cuore, cervello o della maggior parte degli organi interni non possono essere messe in coltura o essere prelevate o reinfuse, quindi è necessario intervenire su di esse in vivo, ossia direttamente sul paziente, utilizzando un opportuno vettore contenente il gene sano per inserirlo direttamente nell'organismo per via locale o sistemica;
- **terapia genica ex vivo**: la tecnica prevede il prelievo delle cellule somatiche del paziente e porle in coltura. Il gene sano viene quindi inserito nelle cellule somatiche che saranno poi reinfuse o reimpiantate nel corpo del soggetto.



Per effettuare una terapia genica il primo passo consiste nell'individuazione del gene che causa la malattia che si vuole curare. Di questo gene è assolutamente fondamentale sapere e comprendere anche quali sono i meccanismi con cui esso produce i suoi effetti sull'organismo.

Una volta riconosciuto questo gene ci si affida alle tecniche di Biologia molecolare per poter isolare un segmento di DNA che contenga il gene in questione e quindi si ricorre alla terapia genica *in vivo* oppure *ex vivo* per inserire il gene "sano" nelle cellule "malate" e curare il difetto.

Il trasferimento del gene sano all'interno delle cellule, sia *in vivo* sia *ex vivo*, avviene mediante l'utilizzo di appropriati vettori, i quali possono essere sia di origine virale (retrovirus, adenovirus, herpesvirus, poxvirus, virus

adenoassociati) sia non virali (utilizzo di tecniche quali elettroporazione, RNA transfer, liposomi, DNA nudo, gene gun).

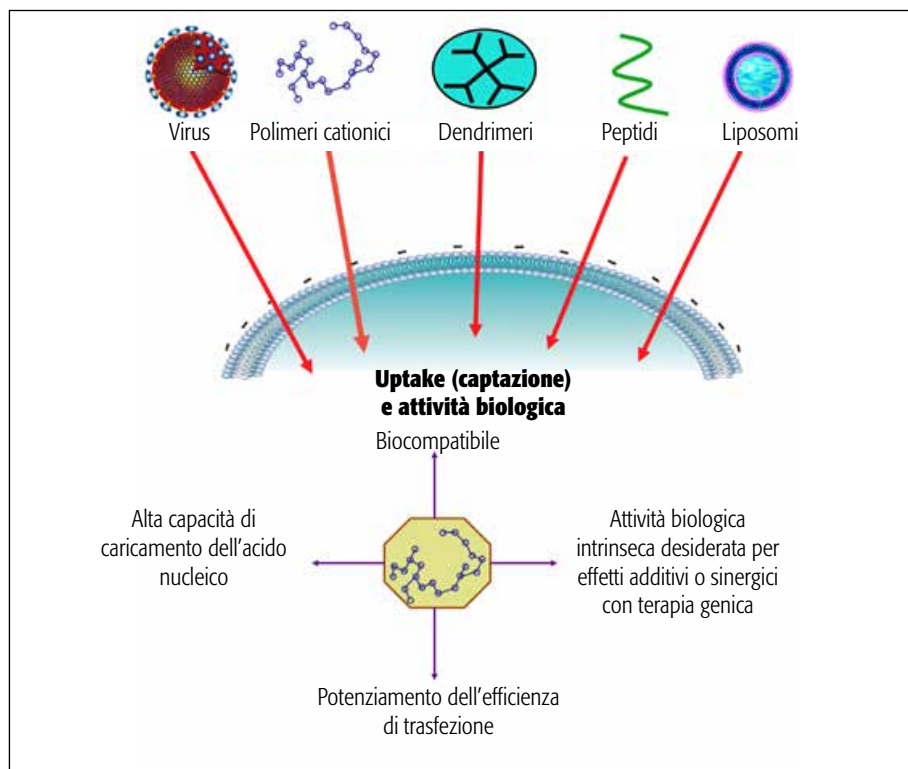
I sistemi di vettori che permettono di veicolare i geni da inserire nella cellula bersaglio devono superare svariate barriere, sia cellulari (membrane citoplasmatiche e nucleari, lisosomi, endonucleasi) sia extracellulari (barriera ematoencefalica, sistema immunitario e fluidi corporei), per raggiungere lo scopo.

Prima di essere espressi i vettori restano esposti a enzimi proteolitici e nucleasi per un periodo di tempo variabile durante il quale possono essere degradati. Per essere ritenuto idoneo all'uso in terapia genica, un vettore deve essere prima di tutto sicuro (non deve provocare danni all'organismo ospite), inoltre deve essere selettivo, deve essere in grado di entrare nelle cellule bersaglio facil-

mente e deve essere in grado di esprimersi (ossia produrre la sostanza che codifica) in alte quantità.

I protocolli di terapia genica non sono sempre tutti uguali, benché si basino sugli stessi principi e le metodiche siano simili. Ogni malattia richiede particolare attenzione perché presenta peculiari problematiche tecniche che richiedono metodiche differenti, sia per l'isolamento dei geni coinvolti sia per raggiungere le specifiche cellule bersaglio.

Tra le malattie in cui la terapia genica può dare il suo contributo si ritrovano le malattie monogeniche (o mendeliane), legate ad alterazioni di un singolo gene, il cancro e particolari malattie infettive (come l'AIDS).



Vettori virali e non virali

Vettori virali (retrovirus, adenovirus, virus adeno-associati e herpes virus)

Sono i più usati perché i virus sono trasportatori naturali di acidi nucleici nella cellula e, resi inoffensivi per l'uomo, si rivelano ideali per il trasporto di geni esogeni. Questi vettori approfittano della capacità dei virus di penetrare nelle cellule e inserirsi nel DNA dell'ospite, ma non tutti i virus a DNA sono adatti allo scopo, poiché il materiale genetico trasportato spesso non si integra nei cromosomi delle cellule infettate. I virus a RNA si rivelano ancora meno adatti al trasferimento genico nelle cellule umane, perché l'acido nucleico non si integra e viene degradato, ma un'eccezione è rappresentata dai retrovirus, perché replicano il loro RNA mediante retrotrascrizione (un processo di trascrizione inversa) in DNA, che è poi integrato nel genoma della cellula ospite.

• **Retrovirus:** virus a RNA a doppio filamento dotati di una trascrittasi inversa (DNA polimerasi RNA dipendente) che gli permette di creare una forma di DNA complementare al loro acido nucleico, che si integra nel DNA cromosomico. L'integrazione del DNA avviene in una sola localizzazione cromosomica e può essere propagato alle cellule figlie dando la possibilità di attuare una terapia genica a lungo termine. Tra i retrovirus particolarmente adatto è il virus HIV, quello che provoca l'AIDS, modificato, ovviamente, in modo da renderlo innocuo, ma ancora in grado di produrre DNA a partire da una molecola di RNA. L'HIV oltre a essere utilizzato come **vettore** per trasferire DNA in una cellula è anche il **bersaglio** di una terapia genica contro la malattia che questo virus causa: l'AIDS.

• **Herpes simplex virus (HSV):** è utilizzato il tipo 1 (HSV-1), per il suo spiccato tropismo specifico per il SNC, nel quale può stabilire infezioni latenti nei neuroni che possono durare anche tutta la vita. Nella terapia genica, tali vettori sono utilizzati nelle terapie di patologie neurologiche come il morbo di Parkinson, l'Alzheimer e la corea di Huntington.

• **Adenovirus:** virus a DNA con particolare tropismo per l'epitelio respiratorio, la cornea e il tratto gastrointestinale. Sono in grado di infettare un'ampia gamma di tipi cellulari, nei quali penetrano mediante endocitosi mediata da recettori.

• **Vettori adeno-associati:** sono virus 'satelliti' di altri virus umani a DNA che richiedono una co-infezione con un Adenovirus o un HPV per replicarsi. Non sono patogeni e non scatenano risposta immunitaria. Sono in grado di infettare sia cellule in divisione sia quelle che non lo sono. Sequenze specifiche determinano l'integrazione in un sito specifico del cromosoma.

Vettori non virali (DNA nudo, liposomi, coniugati molecolari)

• **Trasfezione** con DNA nudo: metodo eseguito *in vitro*, consistente nel mescolare il DNA con fosfato di calcio (che favorisce l'endocitosi) e un neutralizzatore delle fosfoproteine di membrana, somministrandolo a cellule in coltura.

• **Liposomi:** vescicole che si formano spontaneamente mescolando dei lipidi in una soluzione acquosa. In queste vescicole viene impacchettato, *in vitro*, il DNA da trasferire, in modo che sia veicolato direttamente in un tessuto bersaglio *in vivo*. I liposomi cationici possiedono una carica positiva sulla superficie e legano al loro

esterno il DNA, al contrario di quelli anionici (con carica negativa di superficie), che inglobano il DNA al loro interno. Il rivestimento lipidico impedisce la degradazione del DNA *in vivo*.

• **Coniugati molecolari:** complessi stabili di DNA e polilisina (polipeptide dell'amminoacido lisina prodotto grazie a fermentazione batterica). Questi coniugati sono introdotti nella cellula attraverso il processo di endocitosi mediata da recettori.

Metodi di trasfezione di tipo fisico sono:

• **Microiniezione:** iniezione di piccole quantità di DNA mediante una micropipetta di vetro localizzata su un micromanipolatore (strumento per attuare manipolazioni su oggetti microscopici) che permette spostamenti minimi e l'introduzione di acido nucleico senza uccidere la cellula. L'iniezione di DNA può avvenire in una sola cellula alla volta, quindi i tempi di esecuzione della procedura sono lunghi.

• **Elettroporazione:** la cellula è sottoposta a un campo elettrico con alto voltaggio, in modo che nella membrana cellulare della stessa si creino dei pori idrofili per introdurre il DNA. Dopo che le cellule sono state lasciate crescere in coltura (permettendo sia la rigenerazione della membrana cellulare sia la divisione), si selezionano le cellule trasformate con successo.

• **Bombardamento con microparticelle:** si riveste di DNA la superficie di minuscole sferette di tungsteno posizionate su un proiettile di plastica sparato con un fucile speciale. Il proiettile colpisce la piastra di acciaio posta alla fine della canna del fucile e le sferette di tungsteno sono scagliate attraverso un'apertura della piastra in una camera in cui sono poste le cellule da trasformare.