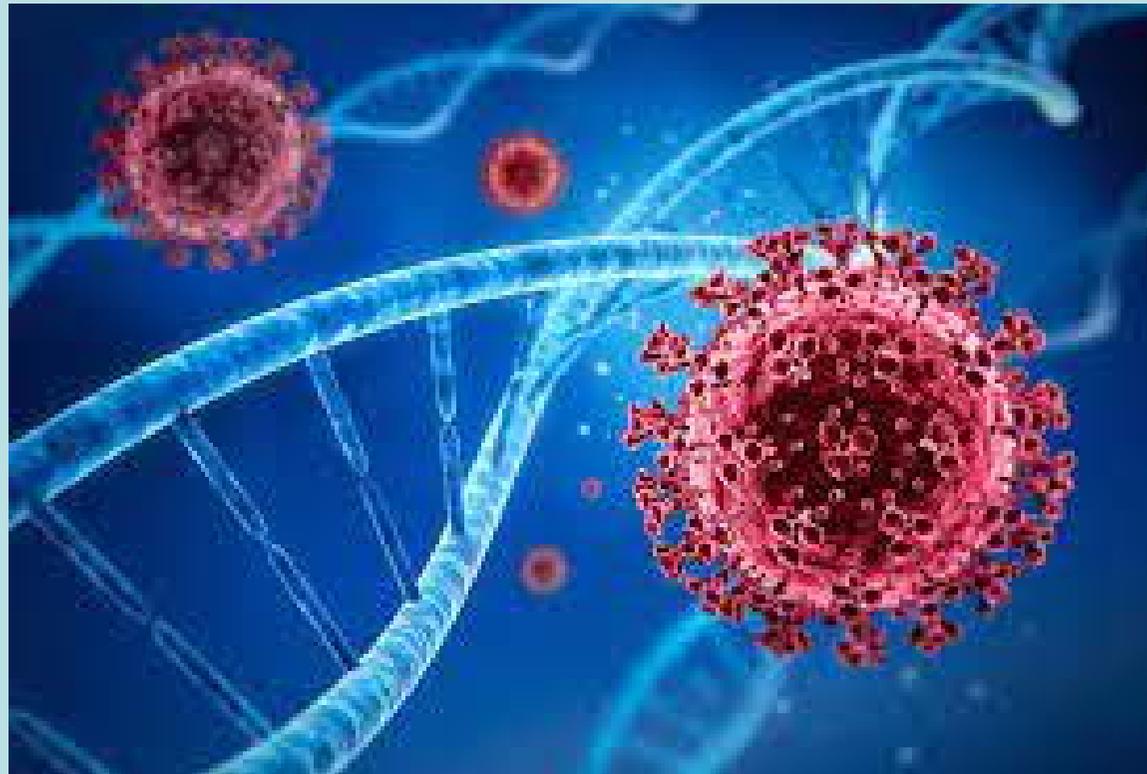


Genetica 3

Cosa c'è di nuovo in genetica?



Rita Dougan 2023

Liberi dalle trasfusioni grazie alla terapia genica

New Orleans, 12 dicembre 2022

A presentare i nuovi dati, al congresso della Società americana di ematologia (Ash), è stato Franco Locatelli, direttore del Dipartimento di Onco-ematologia e terapia cellulare e genica all'ospedale Bambino Gesù di Roma.

Tutti i pazienti avevano una grave forma di **beta talassemia**, una malattia ereditaria in cui l'organismo produce pochissima emoglobina.

90% circa dei pazienti con beta talassemia considerati nel campione, che dipendevano da regolari trasfusioni di sangue per sopravvivere, sono rimasti senza trasfusioni per tre anni dopo essere stati trattati con la **terapia genica**.

Beta-talassemia

La **beta-talassemia** o **anemia di Cooley**, anche nota come **anemia mediterranea**, è una malattia del sangue ereditaria caratterizzata da un'anemia cronica dovuta alla sintesi ridotta o assente di una delle catene polipeptidiche presenti nella molecola dell'emoglobina

E' causata da un'ampia gamma di **mutazioni genetiche** nel **gene della beta-globina** che provoca:
una distruzione precoce dei globuli rossi,
una minore presenza di emoglobina
quindi una scarsa ossigenazione di tessuti, organi e muscoli,
porta stanchezza e scarsa crescita.

Chi soffre di beta-talassemia deve sottoporsi a frequenti trasfusioni di sangue.

La talassemia

- Il nome “talassemia” deriva dal greco “thàlassa” (mare) e “haîma” (sangue), ed è stato scelto per via della grande diffusione di questa patologia nell’area del bacino del Mediterraneo.
- La malattia era tipicamente presente tra le popolazioni residenti nelle aree paludose o acquitrinose, infestate per secoli dalla malaria:
- nei talassemici, i globuli rossi anomali ostacolano la riproduzione del plasmodio della malaria, rendendoli più resistenti a questa malattia
- ciò ha portato, negli anni, una sorta di selezione naturale delle persone con talassemia in determinate zone d’Italia, come la Sardegna o il delta del Po.

Emoglobina

L'**emoglobina** (Hb) è una proteina che si trova all'interno dei globuli rossi, trasporta l'ossigeno dai polmoni ai tessuti, in tutti i distretti del corpo. Quindi garantisce una funzione fondamentale per l'organismo

L'emoglobina è una proteina globulare, tetramerica, costituita da quattro subunità:

due subunità α
due subunità β ,

ognuna delle quali presenta:

un **gruppo prostetico eme** (Fe^{2+}),
una catena polipeptidica (**globina**)

La **globina** (la componente proteica) è formata da:

2 catene α - 141 amminoacidi
2 catene β - 146 amminoacidi

Struttura dell'emoglobina

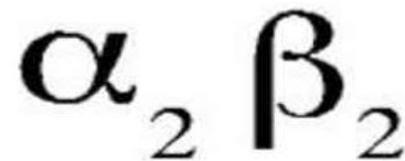
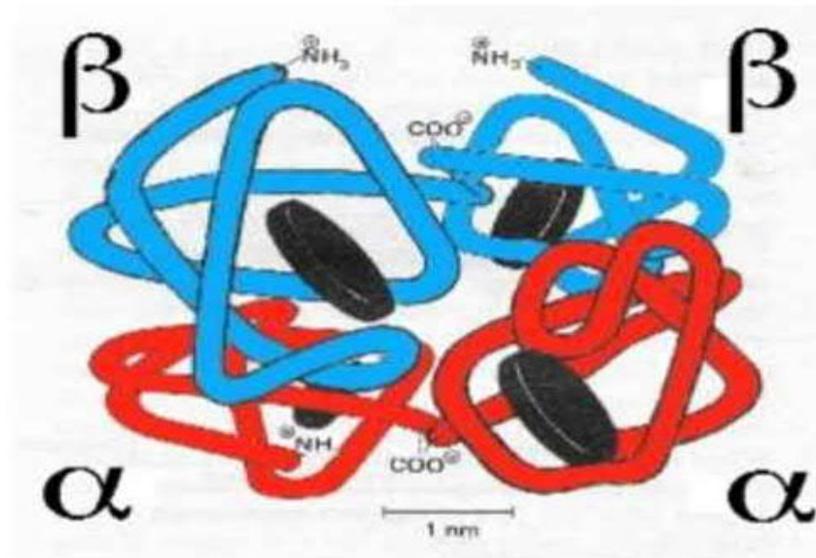
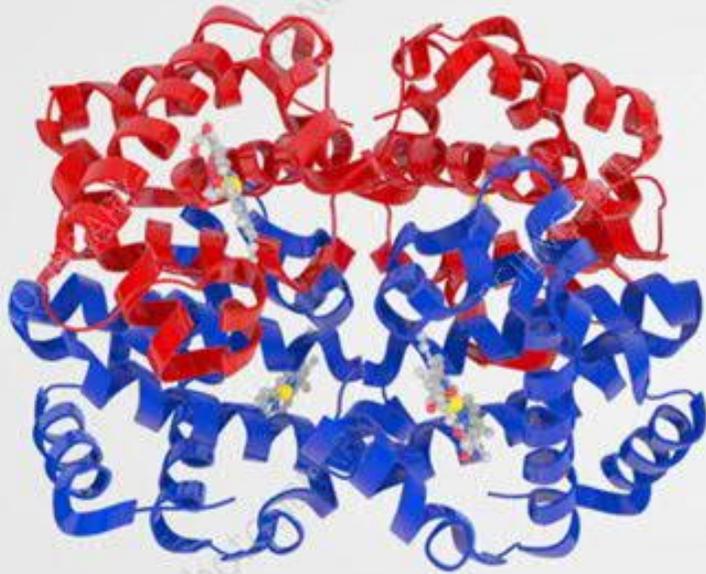


Fig.1. Struttura dell'emoglobina presente nell'uomo adulto.

Adult haemoglobin A
Structure $\alpha_2\beta_2$



Foetal haemoglobin F
Structure $\alpha_2\gamma_2$



Cosa sono le proteine?

Sono sostanze formate da molecole più piccole chiamate

AMMINOACIDI

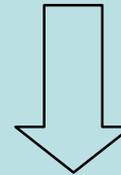
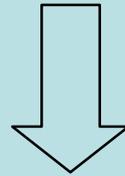
Gli amminoacidi sono 20 e sono come 20 mattoni di forma diversa con i quali si possono formare tutte le proteine presenti in tutti i viventi



Dogma centrale della biologia:

Trascrizione

Traduzione



DNA



RNA



PROTEINE

nucleo

citoplasma

Perchè le proteine di un uomo, di un animale o di una pianta sono diverse?

Le differenze dipendono dalla sequenza degli amminoacidi

la sequenza degli amminoacidi dipende dalla sequenza delle basi azotate nel DNA

Ogni gruppo di 3 basi azotate indica 1 amminoacido

E' il "linguaggio" in cui sono scritte tutte le informazioni contenute nel DNA

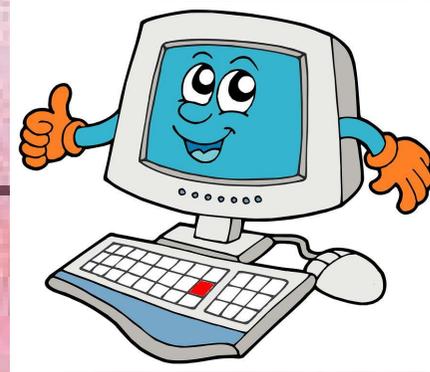
Questo "linguaggio" è il **CODICE GENETICO**

Codice genetico

		Seconda lettera				
		U	C	A	G	
Prima lettera	U	UUU UUC	UCU UCC UCA UCG	UAU UAC	UGU UGC	U C A G
		UUA UUG		UAA UAG	UGA UGG	
	C	CUU CUC CUA CUG	CCU CCC CCA CCG	CAU CAC	CGU CGC CGA CGG	U C A G
				CAA CAG		
A	AUU AUC AUA	ACU ACC ACA ACG	AAU AAC	AGU AGC	U C A G	
	AUG		AAA AAG			AGA AGG
G	GUU GUC GUA GUG	GCU GCC GCA GCG	GAU GAC	GGU GGC GGA GGG	U C A G	
			GAA GAG			

Terza lettera

Nucleo



Mitocondrio



Citoplasma

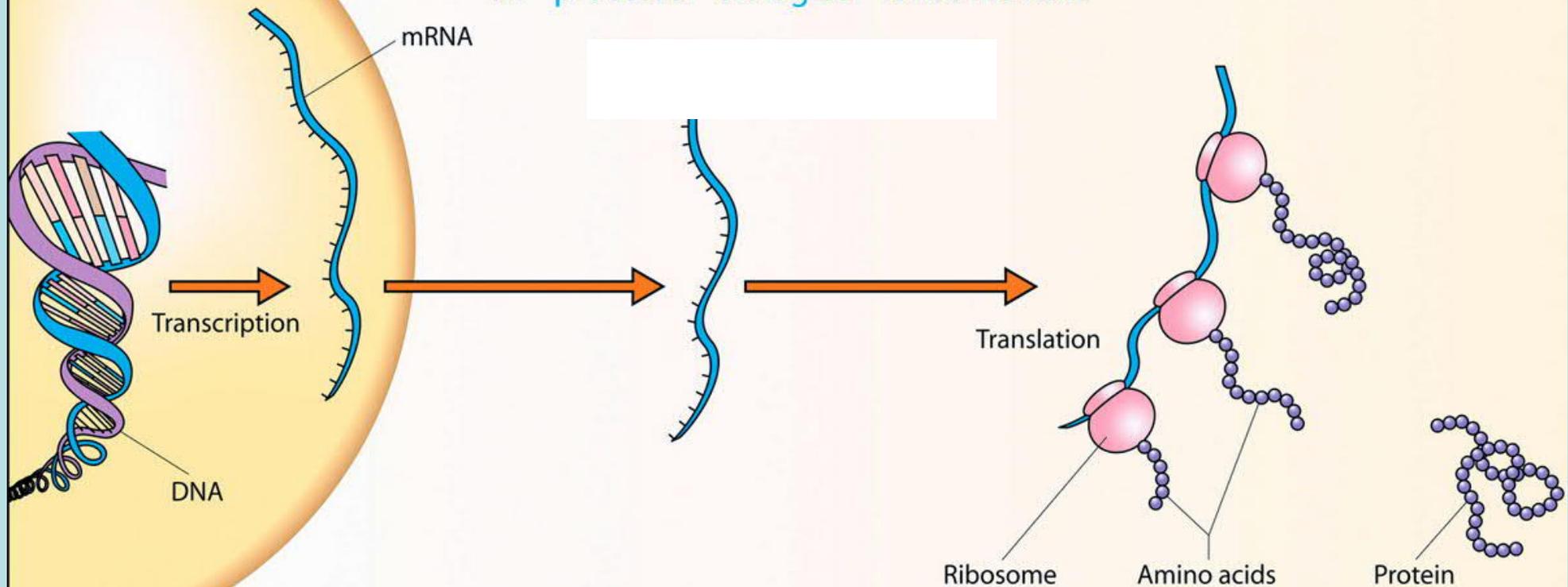


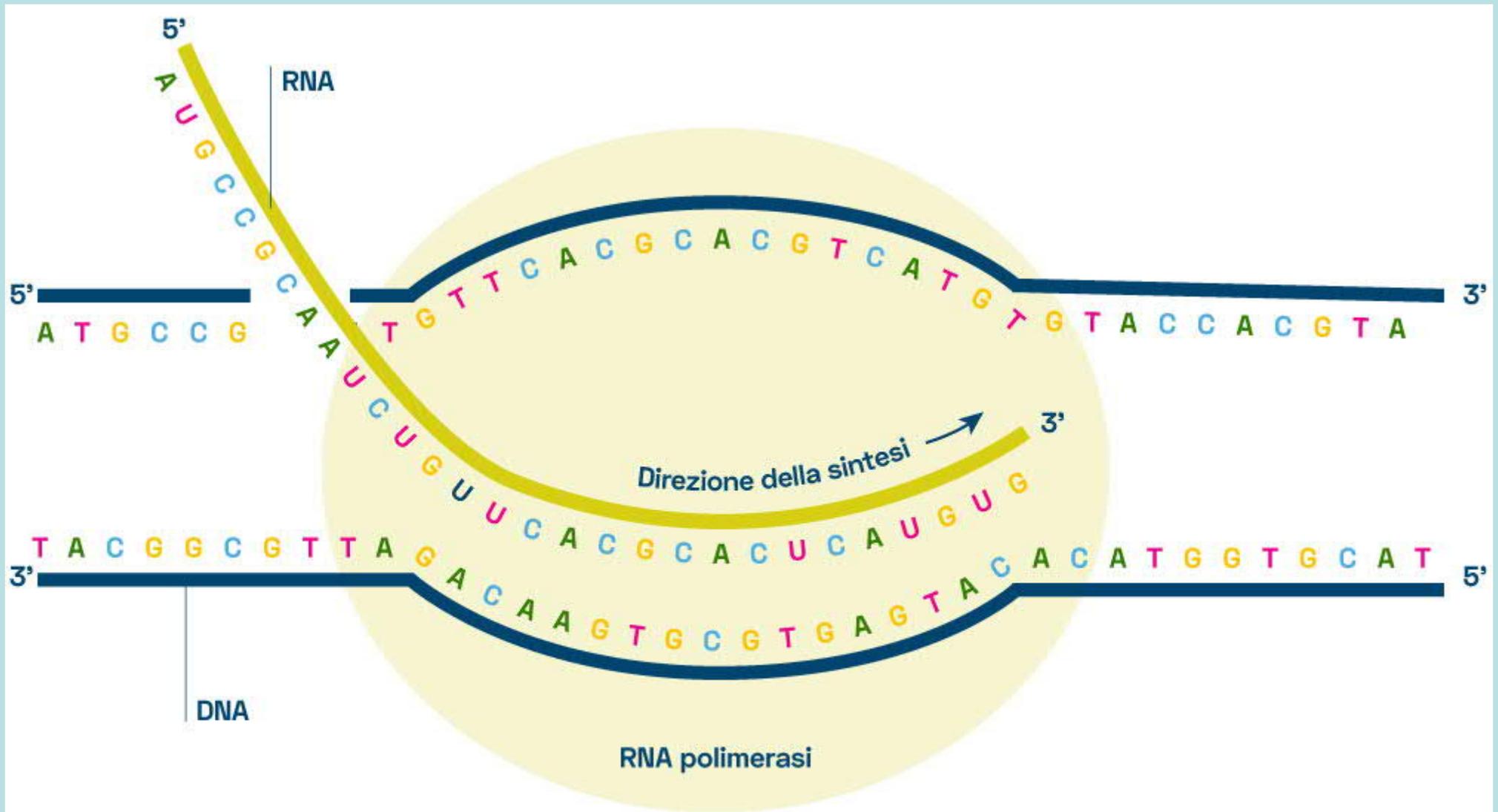
Membrana cellulare



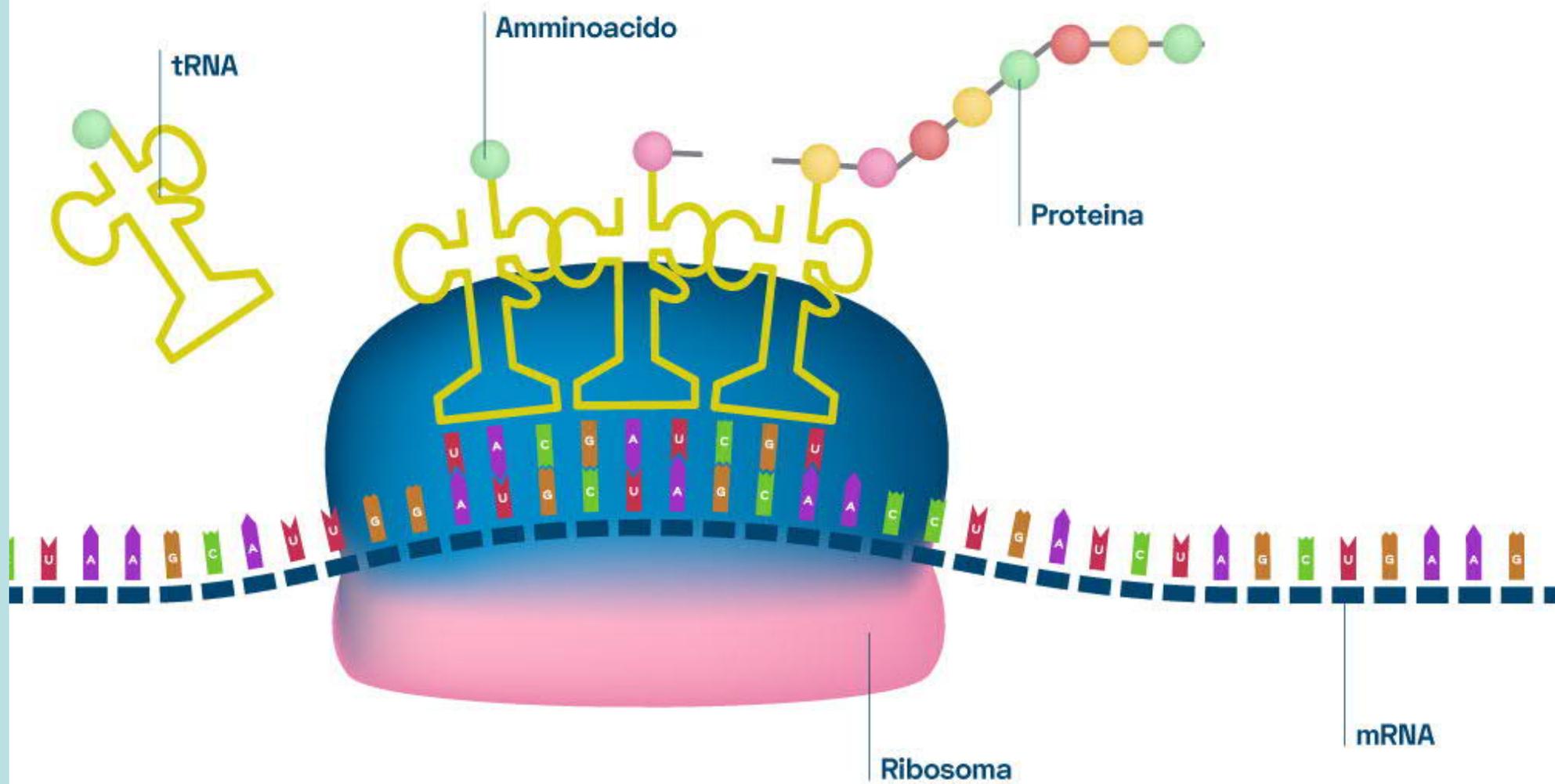
Sintesi Proteica

un processo biologico fondamentale





Trascrizione del DNA



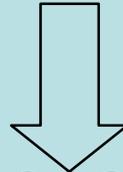
Traduzione dell'RNA

Sintesi proteica

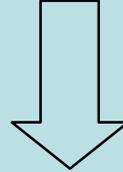
- Le informazioni contenute nel DNA sotto forma di triplette di basi vengono trascritte nel RNA messaggero
- RNA messaggero (mRNA) esce dal nucleo
- nel citoplasma grazie ai ribosomi le sequenze di basi vengono tradotte in sequenza di amminoacidi
- si forma la proteina

Sintesi proteica

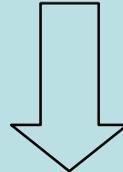
DNA (1 gene)



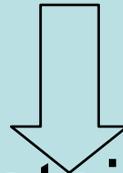
RNA messaggero



ribosomi



catena di amminoacidi



proteina

Mutazioni

Le **mutazioni** sono alterazioni o variazioni permanenti della sequenza di DNA considerata normale. Possono interessare:

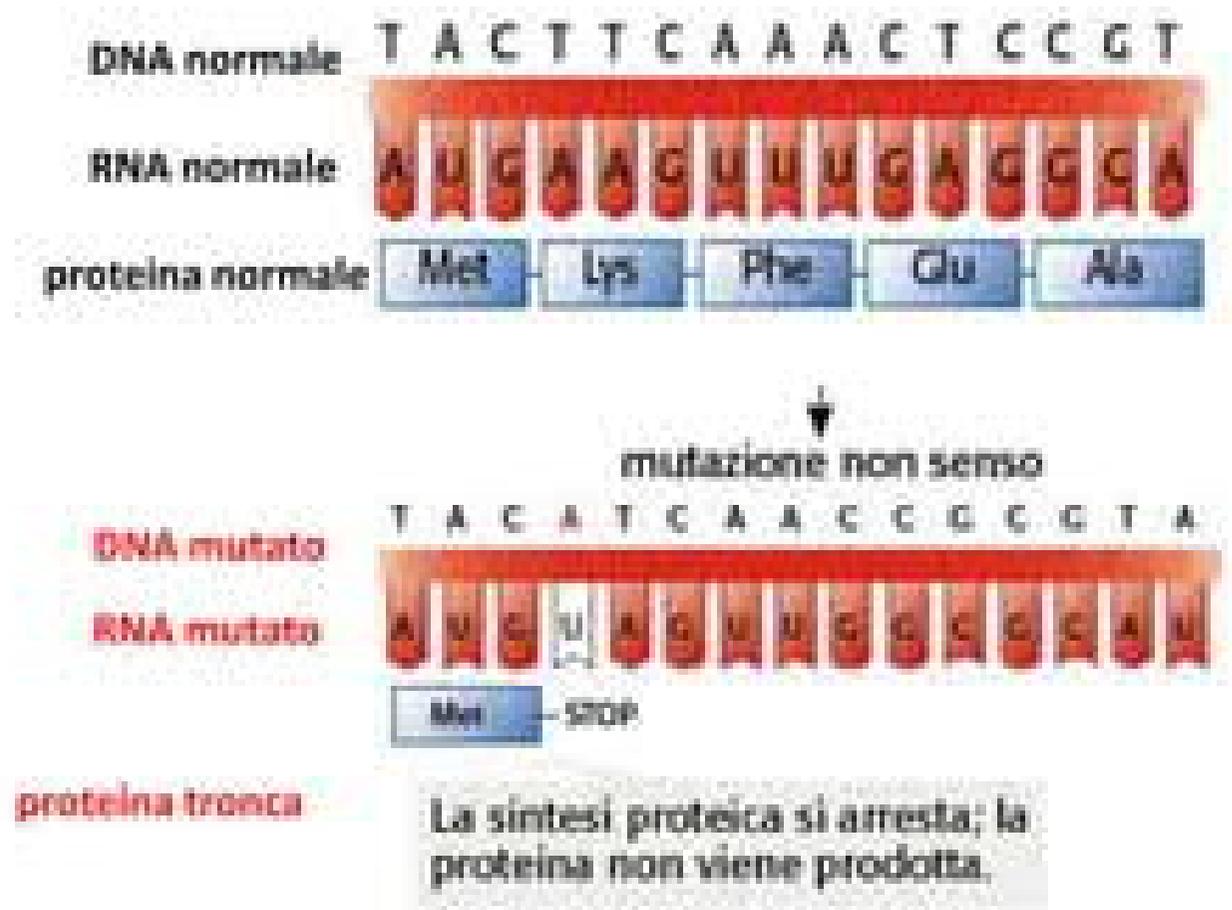
- singoli nucleotidi,
- una parte di un cromosoma,
- il numero dei cromosomi, che viene modificato

Le mutazioni possono essere causate da fattori interni:
“**errori**” casuali generati durante la replicazione del DNA che il macchinario di riparazione delle cellule non riesce a correggere.

Oppure possono essere dovute a fattori esterni:
agenti mutageni chimici o fisici, come per esempio il fumo di sigaretta o le radiazioni ultraviolette emesse dal sole.

EFFETTI DELLE MUTAZIONI GENICHE (PUNTIFORMI)

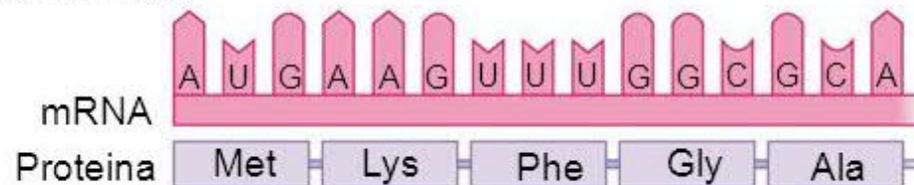
MUTAZIONI NON SENSO: si forma un codone di stop e la proteina prodotta è tronca rispetto al normale



Mutazioni

La **sostituzione**, l'**inserzione** o la **delezione** di nucleotidi alterano un gene con varie conseguenze sull'organismo.

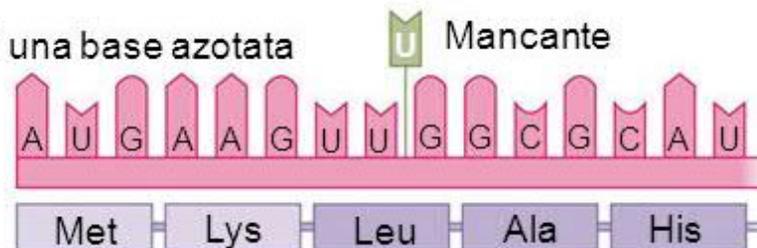
Gene normale



Sostituzione di una base azotata



Delezione di una base azotata



La causa genetica della talassemia

La sintesi delle **catene beta** è controllata dal **gene** della **beta-globina**, una proteina che concorre alla formazione dell'emoglobina, risiede nel braccio corto del cromosoma 11, la cui ridotta o assente funzione è causata da un gran numero di mutazioni puntiformi che interessano regioni diverse del gene

A seconda della mutazione nel gene (ne sono note circa 300), la malattia può essere più o meno severa.

Si distingue una forma **beta 0**, in cui la sintesi delle catene beta dell'emoglobina è completamente assente, o una forma **beta+**, in cui la sintesi delle catene beta dell'emoglobina è ridotta, anche se la malattia rimane in molti casi trasfusione-dipendente.

Cure tradizionali

Le cure della forme di **beta-talassemia** grave sono:

1. continue e periodiche **trasfusioni di sangue**
effetti collaterali: eccessivo accumulo di ferro che può arrivare a danneggiare i diversi organi, ripercussioni sulla vita di tutti i giorni legate ai disturbi associati alla malattia, ai ricoveri e alle necessità di sottoporsi a continue cure
2. **trapianto di midollo** da donatore compatibile. Una cura non sempre percorribile (meno del 40% dei pazienti possiede un donatore compatibile) e dai rischi non indifferenti

Nuove cure: terapia genica

L'idea di fondo è semplice: dal momento che le malattie genetiche sono causate da un difetto in un determinato gene, inserendo dall'esterno una copia funzionante è possibile ristabilire la corretta funzione di quel gene

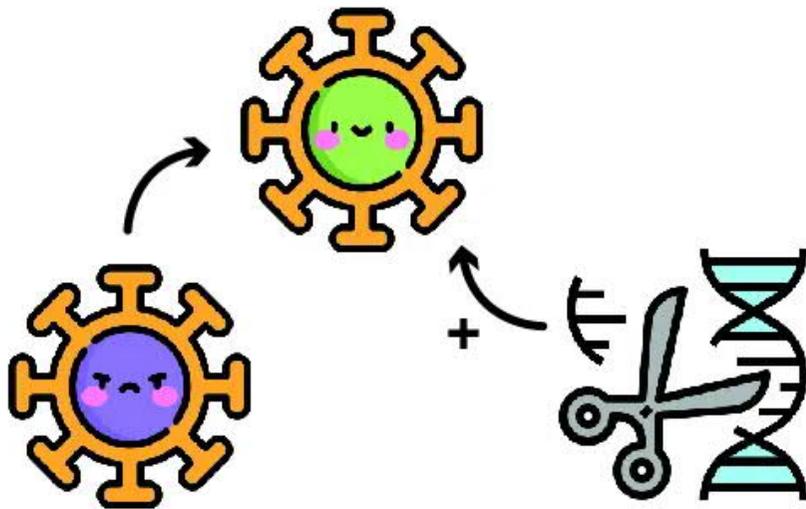


Terapia genica

Esistono due principali modalità di somministrazione per la terapia genica:

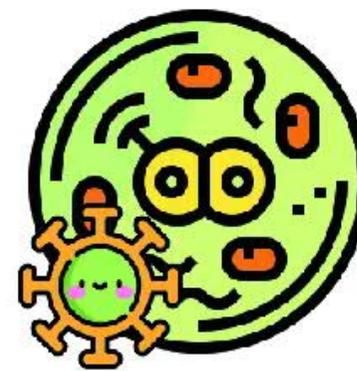
- **ex vivo**: la correzione avviene all'esterno dell'organismo del paziente. Le cellule bersaglio vengono prelevate dal paziente, modificate geneticamente e reintrodotte nel paziente stesso.
- **in vivo**: il “gene terapeutico” viene somministrato direttamente nell'organismo del paziente, mediante un'iniezione per via locale (organo bersaglio) o per via sistemica (nella circolazione sanguigna);
- Per veicolare il “gene terapeutico” all'interno delle cellule o dell'organismo si utilizzano generalmente dei vettori virali: ad oggi i più utilizzati sono i vettori virali adeno-associati (AAV).

Terapia gênica com vetores virais



1. O vírus que será usado como vetor é alterado geneticamente para se tornar inofensivo

2. O gene que o paciente precisa é inserido dentro do vetor viral



3. O vetor transporta o gene para dentro da célula



4. Dentro do núcleo celular, o novo gene se integra ao DNA da célula hospedeira

Nuove cure: terapia genica

Nel caso della beta-talassemia la terapia genica prevede:

il prelievo delle cellule staminali del sangue periferico dei malati

le cellule prelevate vengono trattate in laboratorio e fatte moltiplicare

successivamente, per ristabilire il corretto funzionamento di queste cellule e dei globuli rossi in cui possono differenziarsi, si inserisce al loro interno una copia funzionante del gene della beta-globina (β -globina AT87Q) per mezzo di un vettore virale BB305

Nuove cure: terapia genica

Le cellule modificate vengono sottoposte a controlli di sterilità.

Prima della reinfusione delle cellule gli stessi pazienti sono stati trattati con chemioterapia.

Infine le cellule staminali corrette vengono nuovamente infuse nei pazienti per via endovenosa, così da favorire il loro attecchimento nel midollo osseo.

Dopo aver completato due anni di follow-up, i pazienti possono arruolarsi in uno studio a lungo termine per continuare il follow-up fino a 15 anni.

Guarigione possibile

La sperimentazione con questo tipo di terapia è partita nel 2016 in Francia, Germania, Italia, Thailandia, Regno Unito e Stati Uniti ed ha coinvolto 63 pazienti con beta-talassemia dipendenti dalla trasfusione.

L'ospedale Bambino Gesù di Roma ha contribuito in maniera consistente, trattando un terzo dei pazienti arruolati.

Dalle analisi sul lungo termine è emerso che il 90% dei pazienti trattati si è raggiunta l'indipendenza trasfusionale.

La terapia è stata inoltre in grado di determinare il raggiungimento di valori di emoglobina molto consistenti in una percentuale elevata dei pazienti che hanno ottenuto l'indipendenza trasfusionale.

I costi della terapia

- Tale terapia denominata **betibeglogene autotemcel** è stata approvata dalla Fda degli Stati Uniti ad agosto come prima terapia genica per beta-talassemia per adulti e bambini.
- "Betibeglogene autotemcel, CD34+ hematopoietic stem cells and progenitor cells transduced with the BB305 lentiviral vector encoding the β -globin (β A-T87Q) gene."
- Resta tuttavia il problema dei costi: "L'azienda produttrice della terapia genica – spiega Locatelli – ha ottenuto un rimborso di 2,8 milioni di dollari per trattamento negli Usa, ma la produzione in Ue è stata sospesa nonostante l'okay dell'Agenzia europea dei medicinali per una mancata copertura di costi dell'azienda rispetto ai rimborsi delle agenzie governative Ue.
- Solo in Italia sarebbero infatti almeno 1.000 i pazienti candidabili, per un costo di 3 miliardi di euro

Terapia genica alternativa: tecnica Crispr

Esiste una valida alternativa alla terapia con il farmaco [betibeglogene autotemcel](#)

Il gruppo del Prof. Locatelli ha presentato a giugno i dati di uno studio sulla riattivazione dell'emoglobina fetale tramite la **tecnica Crispr**, che agisce sulla sequenza di DNA interessata

- . Si è visto che 42 dei 44 pazienti talassemici trattati, il 95%, hanno raggiunto l'indipendenza da trasfusioni, ed ora parte la sperimentazione pediatrica.

Al momento i pazienti hanno un'alternativa entrando in questi studi clinici, ma entro un anno dovrebbe esserci il via libera delle autorità e la disponibilità commerciale anche per questa terapia, i cui costi non sono però ancora noti

Editing genetico: tecnica Crispr

L'editing genetico prevede l'uso di **Crispr**, il cosiddetto "taglia e incolla" del DNA che nel 2020 ha vinto il Nobel per la chimica.

Evita l'uso dei vettori virali previsti dalla gene therapy.

Viene inattivando un gene chiamato BCL11A che dopo la nascita disattiva la forma di emoglobina chiamata fetale,

si riesce così a ripristinare la produzione di emoglobina fetale, di fatto correggendo la talassemia.

La diagnosi

Nella maggior parte dei casi il medico curante utilizza una prediagnosi clinica per valutare i sintomi dell'anemia: affaticamento, mancanza di respiro e scarsa tolleranza allo sforzo.

Studi di famiglia possono essere condotti per valutare la storia familiare.

Analisi cliniche e biochimiche, sulla quantità e il tipo di catene globiniche presenti nel sangue.

Il test del DNA è utile per valutare lo stato di portatore e il tipo di mutazioni presenti in altri membri della famiglia.

Distribuzione della malattia

In Italia, si stima che i pazienti talassemici siano circa 7.000, con concentrazione massima in alcune regioni del Centro-Sud:

la regione più colpita è la Sicilia, in cui si contano 2.700 pazienti,

seguita dalla Sardegna con 1.100;

i restanti 3.200 pazienti sono abbastanza uniformemente distribuiti in tutta la Penisola, con una frequenza più alta fra Puglia, Emilia Romagna, Lazio e Calabria.

Mentre sono più di 3 milioni i **portatori sani**, con punte di maggiore incidenza in Sardegna (12,9%), Sicilia (7-8%) e Puglia (5-8%).

LA TALASSEMIA IN CIFRE

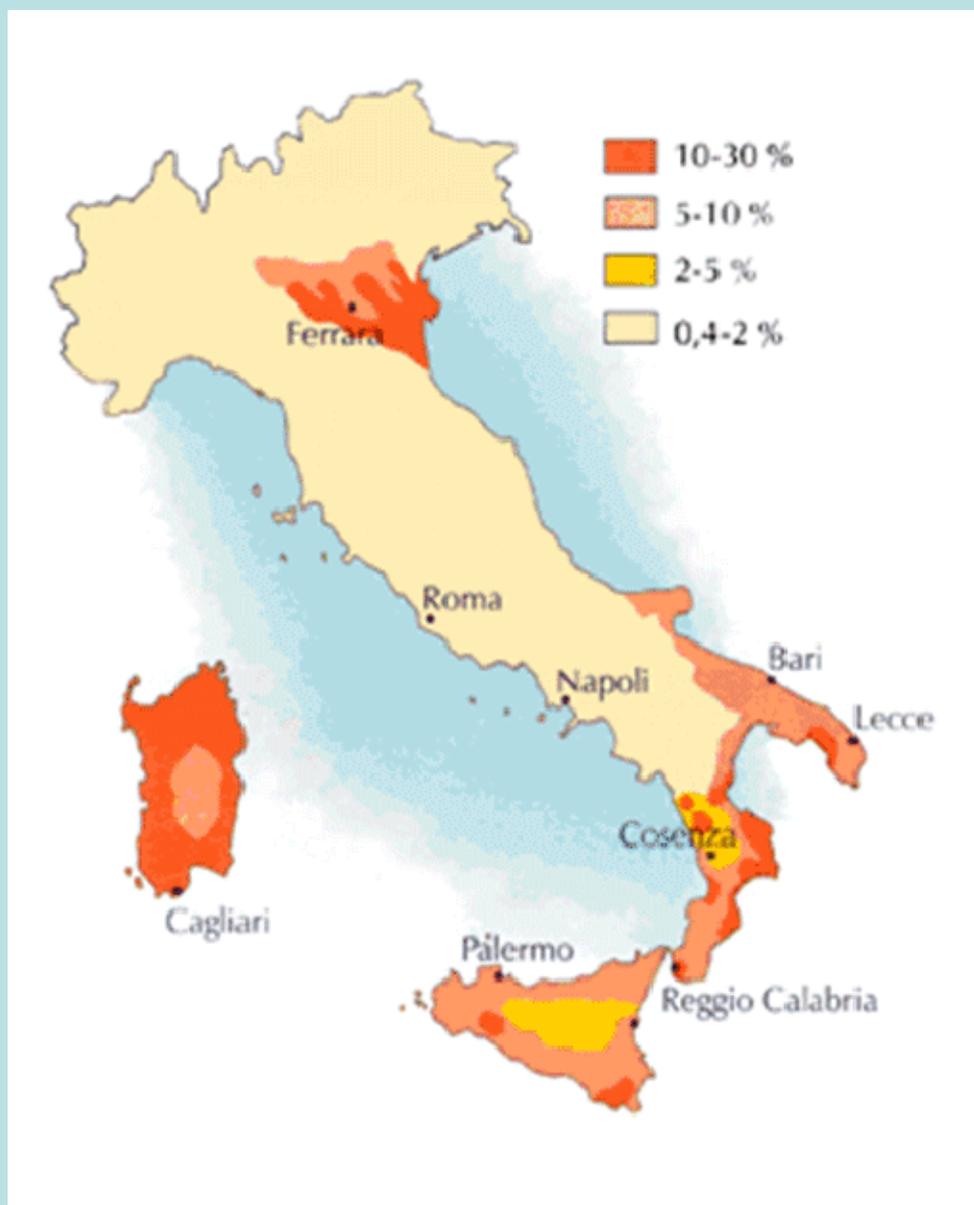
Si calcola che siano **3.000.000 ca.** i **Portatori Sani** in Italia.

Le regioni più a rischio:
(calcolo sulla popolazione regionale)

- **Sardegna:** 12,9 %
- **Sicilia:** 7-8 %
- **Puglia:** 5-8 %

Sono **7000 ca.** i **pazienti talassemici** in Italia, dei quali **2.700 ca.** in Sicilia e **1.100 ca.** in Sardegna.





Ministero dell'Interno - Direzione Generale di Sanità (1924). *La malaria in Italia ed i risultati della lotta antimalarica*. Libreria dello Stato, Roma.

Come si trasmette

La beta talassemia si trasmette con:

modalità autosomica recessiva:

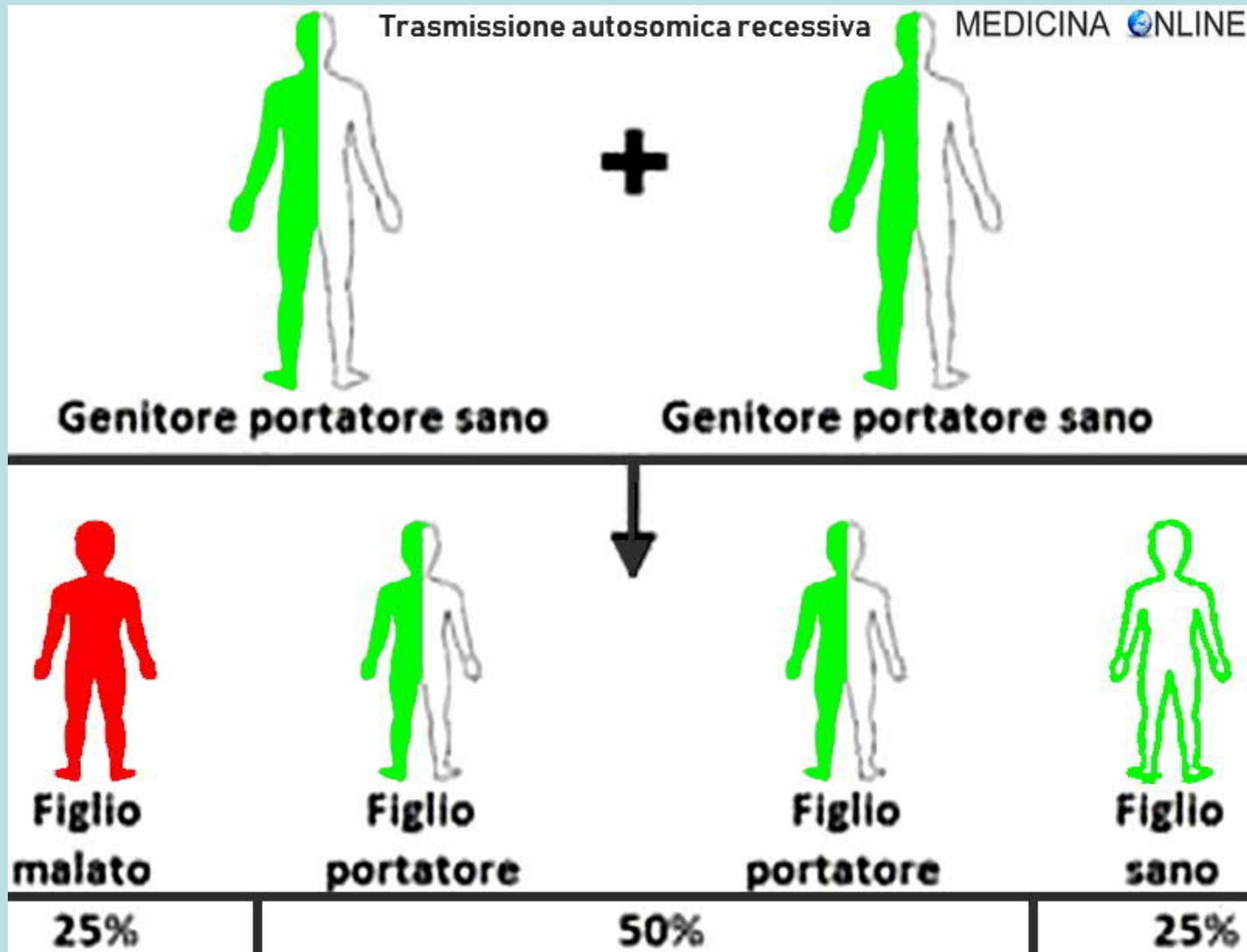
in una coppia di genitori con mutazioni nel **gene beta globinico**, ogni figlio avrà:

il **25%** di probabilità di essere **sano**,

il **25%** di probabilità di essere **malato**

il **50%** di probabilità di essere **portatore** della malattia.

Autosomica recessiva: entrambi genitori portatori



Autosomica recessiva: genitore portatore + genitore sano

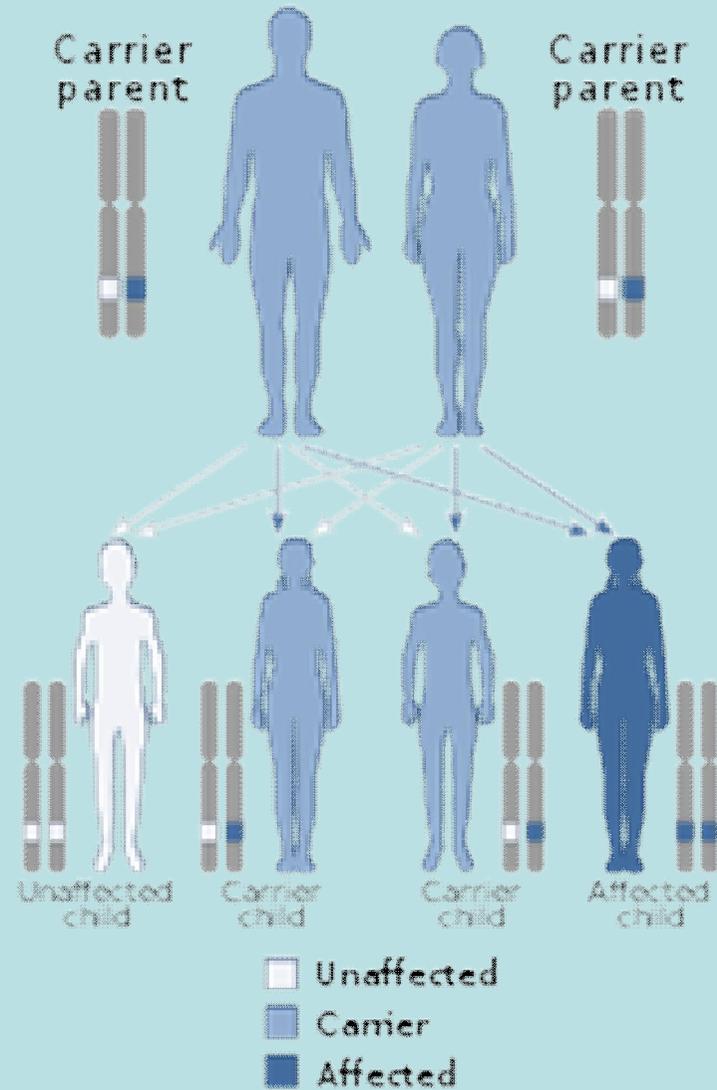


50% probabilità figlio portatore

50% possibilità figlio sano

Autosomica recessiva

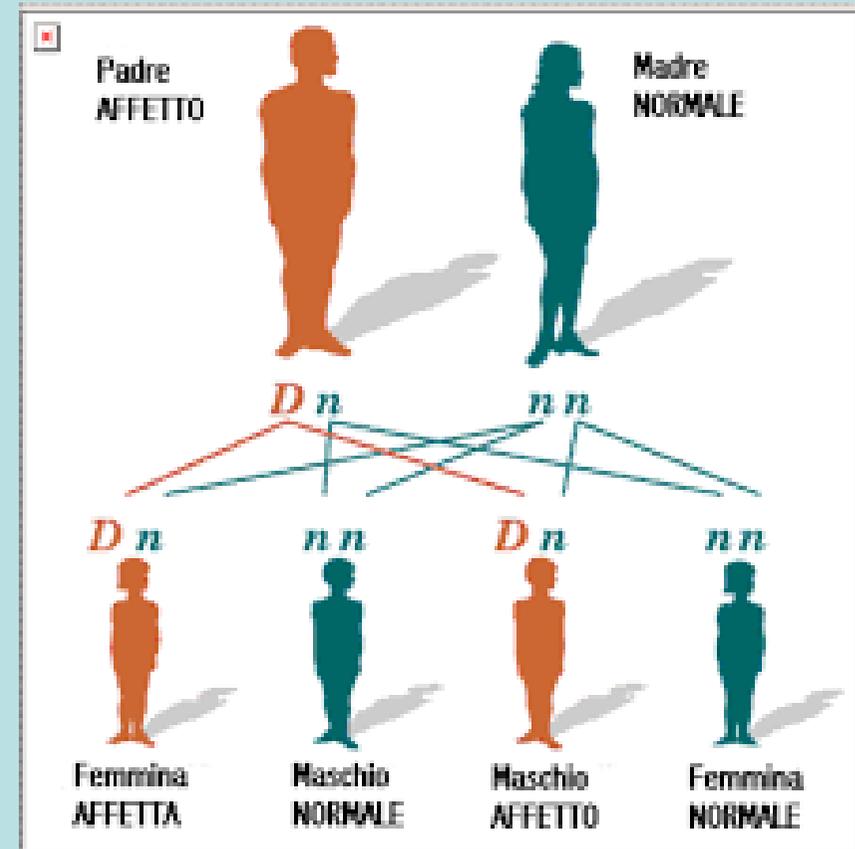
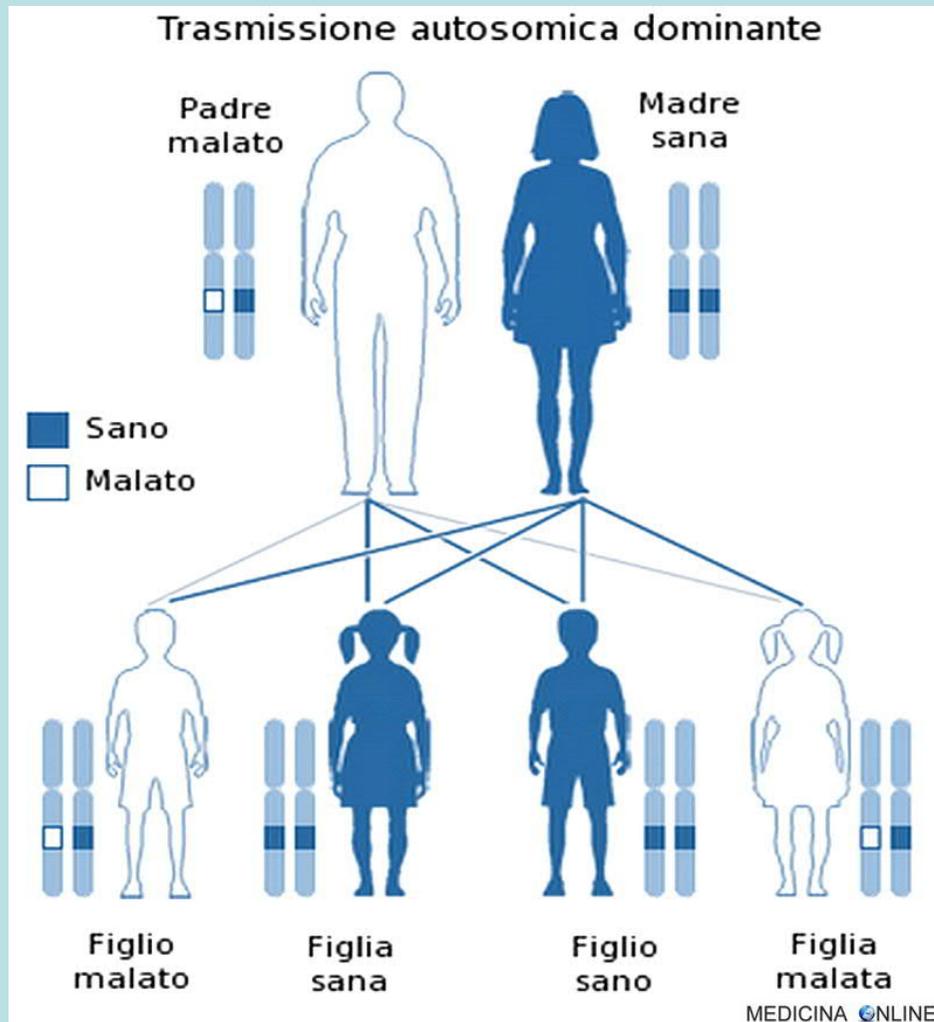
Autosomal recessive



Malattie ereditarie trasmesse da un allele recessivo

- Albinismo 1:20000 – 1:40000
- Fibrosi cistica 1:2000 – 1:4000
- Anemia falciforme 9 -15% in zone malariche o ex malariche
- Anemia mediterranea (talassemia)
- Fenilchetonuria 1:10000/15000

Autosomica dominante

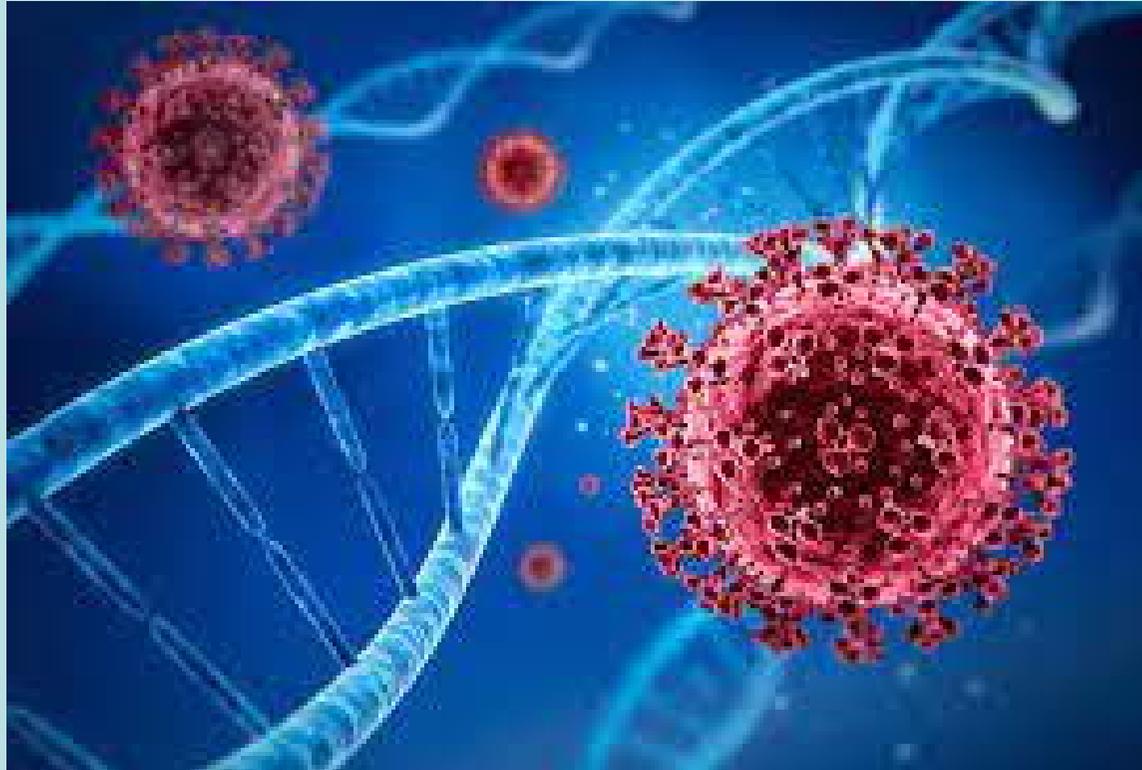


Malattie ereditarie trasmesse da un allele dominante

Corea di Hungtington 5 -10:100000

Nanismo acondroplastico 1:25000

Genetica 3



Grazie

Rita Dougan 2023