



UNIVERSITÀ DI PISA
FACOLTÀ di
INGEGNERIA

OGM

Organismi Geneticamente Modificati

Corso di
TECNICHE DI MEDICINA RIGENERATIVA
- Università di Pisa -

Sara Buccarella
Federica Giovannini
Giulia Monacelli
Chiara Dalle Vacche
Eleonora Filipponi

Sommario



- OGM: Cosa sono, storia, curiosità
- Tecniche di ingegneria genetica
- 1° applicazione medica: Trasmissione neuromuscolare
- 2° applicazione medica: Ipertrofia cardiaca e apoptosi miocardiocitaria
- 3° applicazione medica: Morbo di Parkinson

Cosa sono?



Organismo vivente che possiede patrimonio genetico modificato tramite tecnologia del DNA ricombinante, che consente l'**aggiunta**, l'**eliminazione** o la **modifica** di elementi genici



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.”

Come si realizzano?



Per ottenere un OGM si utilizzano le biotecnologie:
(l'insieme delle tecnologie che permettono di modificare la struttura e la funzione di organismi viventi per produrre materiali biologici)



AVANZATE



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



TRADIZIONALI



Tecnologie antichissime, basate su incroci tra organismi di razza diversa, come ad esempio agricoltura, zootecnia e lo sfruttamento delle attività fermentative dei microrganismi.

Storia degli OGM



1970

→ Scoperta degli enzimi di restrizione

← Arber,
Nathans,
Smith

↓
Tagliano le molecole del DNA (endonucleasi e esonucleasi) ,
in corrispondenza di una specifica sequenza di coppie di
basi, creando delle estremità appiccicose o coesive.

↓
I tagli avvengono sempre nella stessa sequenza di basi, quindi
tutti i frammenti hanno estremità coesive complementari, che
si uniscono spontaneamente.

1973

→ Primo clone: gene di rana in
Escherichia Coli

← Boyer,
Cohen

1977
1978

→ Proteine umane ricombinanti:
Somatostatina e insulina

← Genentech

Classificazione



Secondo Kaare Nielsen, gli OGM si possono classificare in 5 livelli, in relazione alla “distanza” genetica che intercorre tra organismo ricevente il gene e il donatore (virus, batterio, fungo, vegetale, animale):



- 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

Organismi a cui si fa riferimento:



Procarioti, piante, animali



Animali transgenici

Transgenesi



Cos'è un transgene?

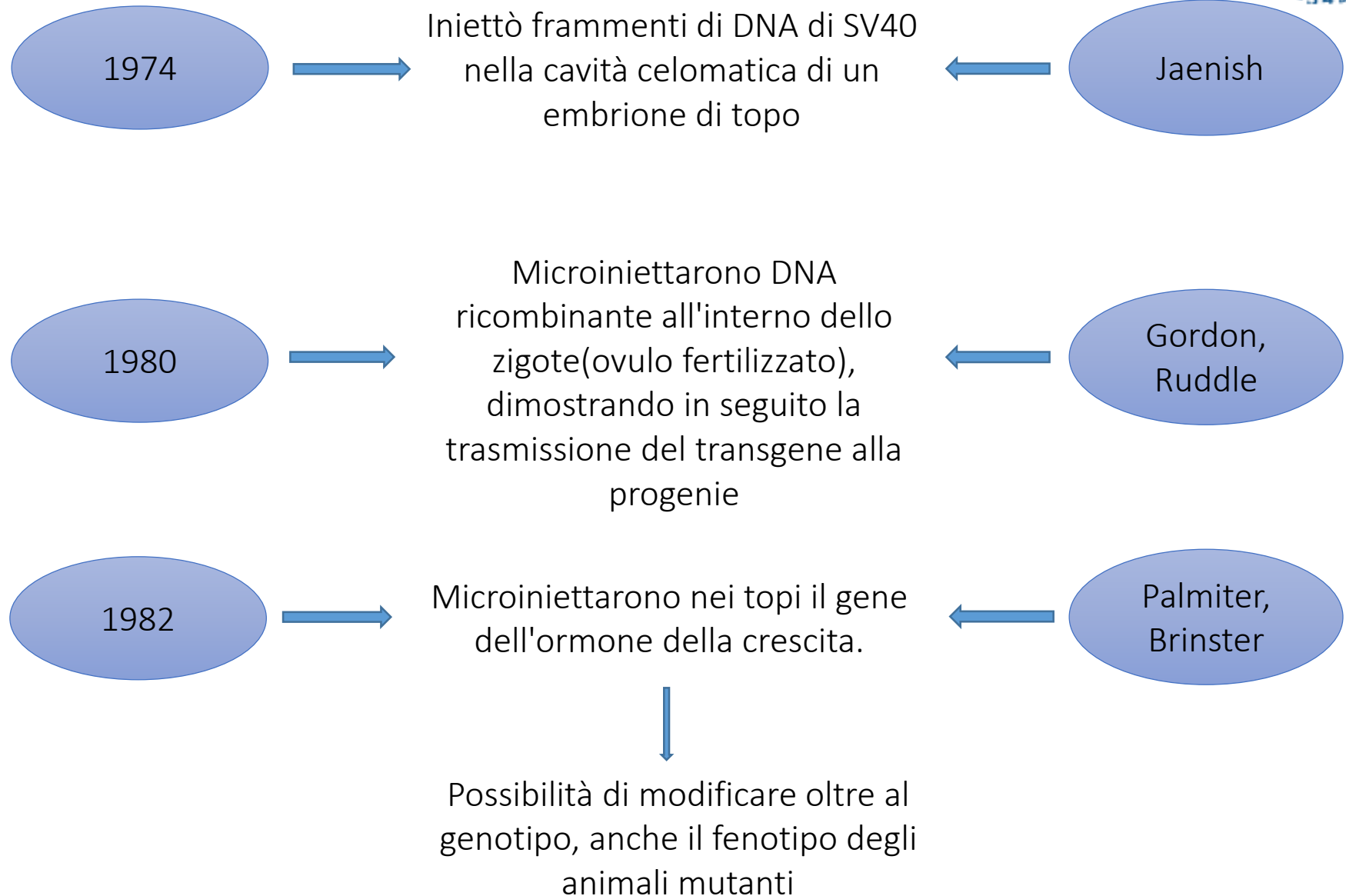


Gene estraneo inserito in un qualsiasi organismo tramite operazioni di ingegneria genetica



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.

Storia della transgenesi



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 organismi come l'oncotopo (usato nella ricerca sul cancro)



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. Rappresenta però un ostacolo dal punto di vista immunologico, perché potrebbe verificarsi un rigetto da parte dell'organismo, che inizia a produrre anticorpi contro l'organo trapiantato.
- **Miglioramento delle produzioni animali**

Campi di applicazione e curiosità



I campi di applicazione e curiosità del Golden Rice sono principalmente agricolo,

1. Piante: Golden Rice

Il Golden Rice è una varietà di riso geneticamente modificata che produce beta-carotene. In particolare, il Golden Rice è stato progettato per produrre beta-carotene, un precursore della vitamina A.

- psy (fitoenolo polifenolo ossidasi)
- crtI (carotenoidi)

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



Campi di applicazione e curiosità



2. Animali : Pecora Dolly (1996)

La pecora
una cellula
partiti dal m
Dorset. Il
riprogramm
crescita. Q
era stato t
cellula fusa
per 6/7 gi
sviluppara



ccesso da
zione, si è
razza Finn
quello di
candone la
dalla quale
odichè, la
o di coltura
olicava e si

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.

Campi di applicazione e curiosità



3. Uomini : Gemelli cinesi geneticamente modificati (26 Novembre 2018)

He Jiankui,
Southern University of
Science and
Technology

Si è trattato della modifica del DNA di alcuni embrioni umani per immunizzarli contro l'HIV, il virus dell'AIDS. Lo scienziato He Jiankui ha spiegato come con la tecnica di editing genomico CRISPR-Cas9 sia riuscito ad immunizzare i futuri umani dall'infezione da HIV, disattivando il gene CCR_5 negli embrioni. Questa notizia ha portato alla nascita di alcuni dibattiti, tra cui uno relativo al fatto che questo gene, sebbene costituisca la via d'accesso per la diffusione dell'infezione, potrebbe anche conferire resistenza ad altri tipi di virus, come quello dell'influenza. Quindi ci sono diverse obiezioni sia sullo svolgimento della pratica sia sull'etica: in particolare, alcuni esperti ritengono che l'approccio di He sia discutibile in linea di principio: CRISPR-Cas9 dà la possibilità di realizzare terapie per disattivare CCR_5 in persone adulte sieropositive, ma non negli embrioni → Metodo sicuramente più efficace e sicuro

Tecniche principali



- Ricombinazione del materiale genetico →

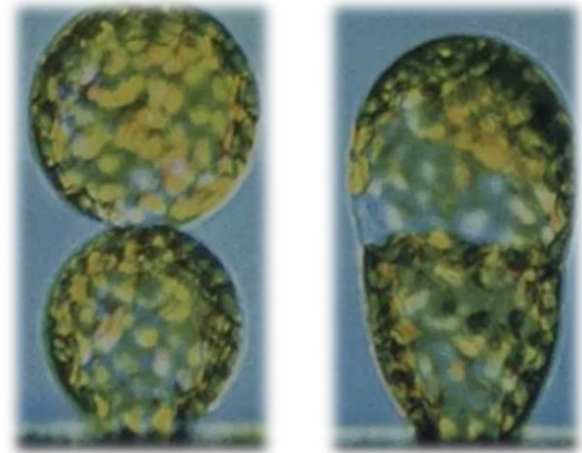


- Introduzione diretta in un organismo



Macroiniezione
Microincapsulamento

- Fusione cellulare o tecniche di ibridazione →



Fusione di protoplasti

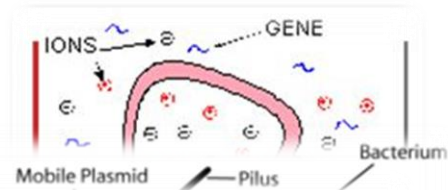
Procarioti



Trasformazione batterica

Tecniche per rendere «competenti» batteri che non lo sono naturalmente:

- Shock chimici e termici (CaCl_2)
- Shock elettrici **Elettroporazione**



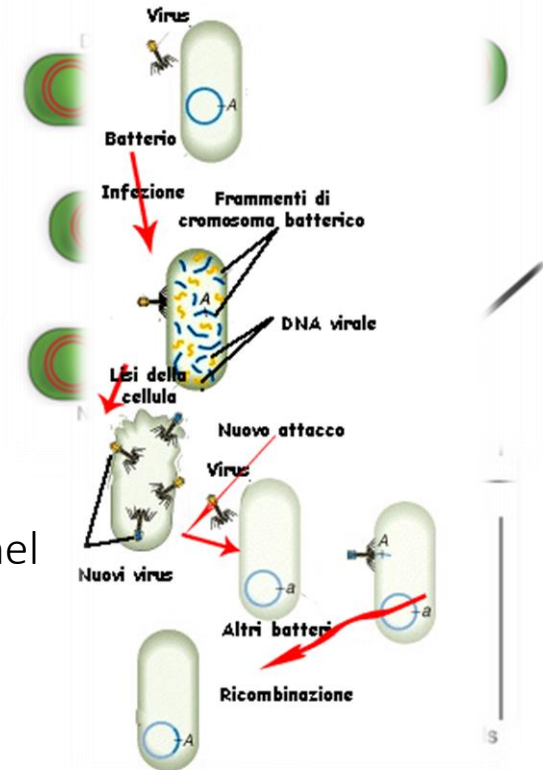
Coniugazione batterica

Trasferimento DNA da un batterio all'altro attraverso un pilum

Trasduzione batterica

Inserimento di materiale genetico nel batterio attraverso un virus batteriofago

Trasduzione batterica

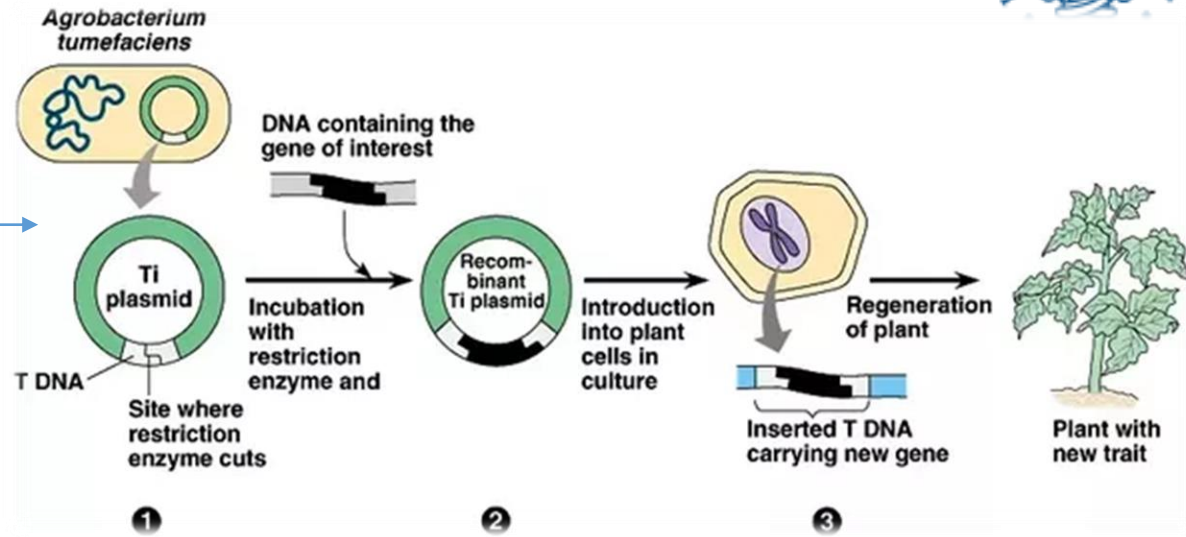


Piante



Agrobacterium tumefaciens

Capacità di penetrare ed integrarsi nel genoma della cellula

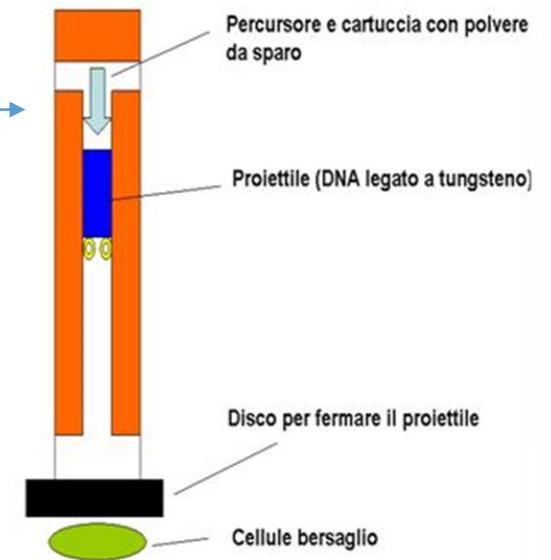


Metodo biolistico

Permette di sparare (500m/sec) microproiettili di oro o tungsteno e DNA

Cellule su traiettoria di tiro → uccise
Cellule zona concentrica vicina i proiettili → penetrano nelle cellule senza danneggiarle

Vantaggio: trasformazione di cellule vegetali integre

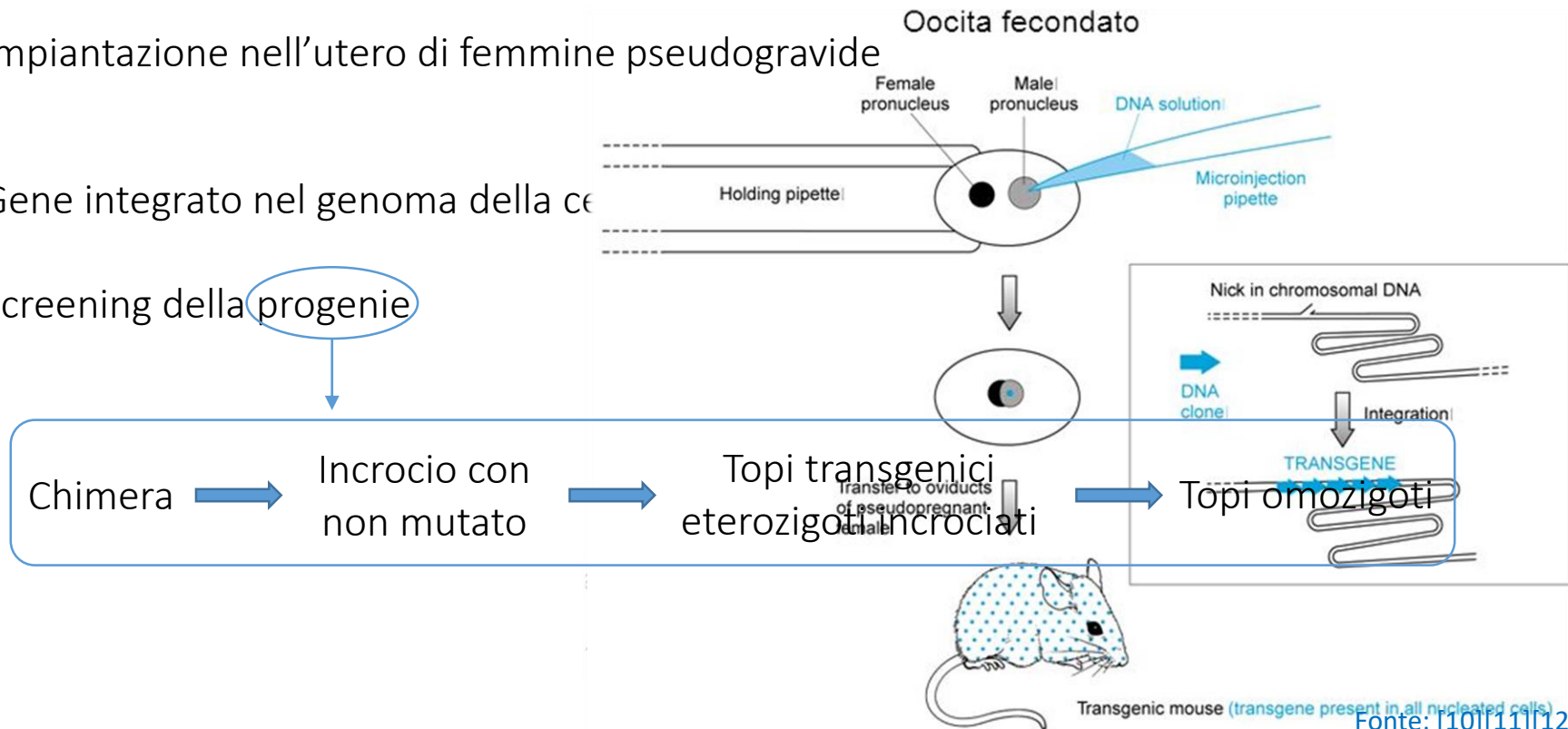


Animali



1. MICROINIEZIONE

- Frammenti di DNA iniettati con micropipetta nel pronucleo maschile di ovociti fecondati
- Amplificazione del costrutto (DNA esogeno + gene)
- Coltivazione in vitro degli embrioni → Morula
- Impiantazione nell'utero di femmine pseudogravide
- Gene integrato nel genoma della cellula
- Screening della progenie



Animali



1. MICROINIEZIONE

- Screening della progenie



Analisi tramite PCR:
permette amplificazione
enzimatica delle sequenze
di DNA

1. Denaturazione al calore di uno stampo di DNA che deve essere copiato (94-99 °C)
2. Appaiamento dei primer (annealing)
3. Sintesi dei nuovi filamenti

VANTAGGI

- DNA esogeno non necessita di clonazione in un vettore
- Frammenti DNA contenenti il gene di interesse si integreranno nel genoma dell' animale ospite in copie multiple casualmente

SVANTAGGI

- Integrazione random non controllabile e non sostituisce geni malati esistenti
- Iniezione nel pronucleo → animali «mosaico» , espressione genica limitata
- Bassa efficienza (animali transgenici vivi pari a circa il 5% delle uova inoculate)

Animali

2. GENE TARGETING

Ricombinazione omologa in cellule staminali; il risultato della mutazione:

- Knock out → inattivazione espressione gene
- Knock down → diminuzione espressione gene
- Knock in → inserzione gene difettivo

Fasi:

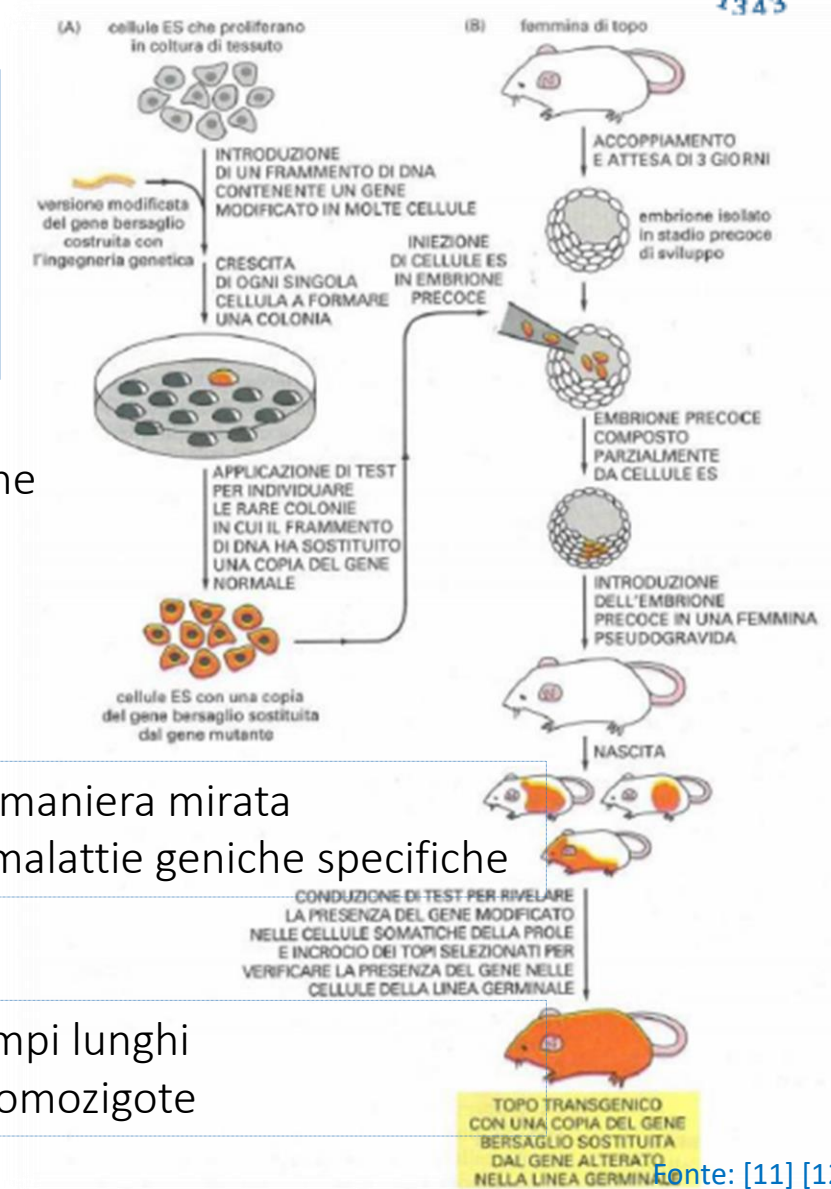
- a. Preparazione cellule ES pluripotenti e trasfezione
- b. Selezione cellule ES
- c. Iniezione cellule ES trasfettate in una nuova blastocisti
- d. Screening progenie

VANTAGGI

- Inserzione transgene in maniera mirata
- Utilizzabile per studi di malattie geniche specifiche

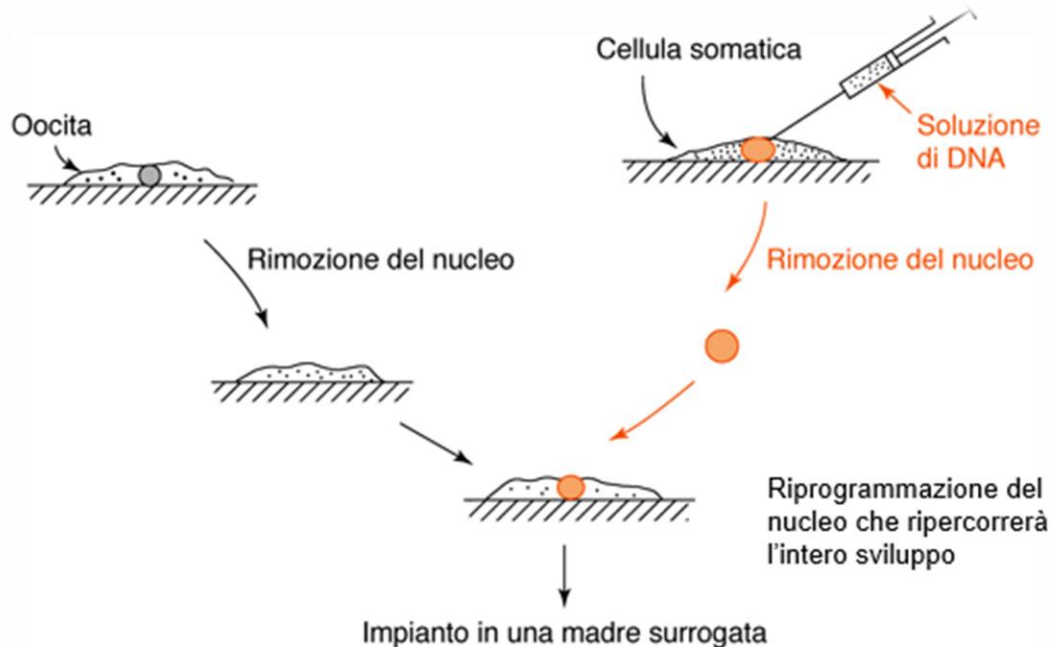
SVANTAGGI

- Metodo laborioso → tempi lunghi
- Alta mortalità progenie omozigote



Animali

3. TRASFERIMENTO NUCLEARE



- Clonazione riproduttiva: creazione di una copia
- Clonazione terapeutica: creazione di un clone pre-embrionale

VANTAGGI

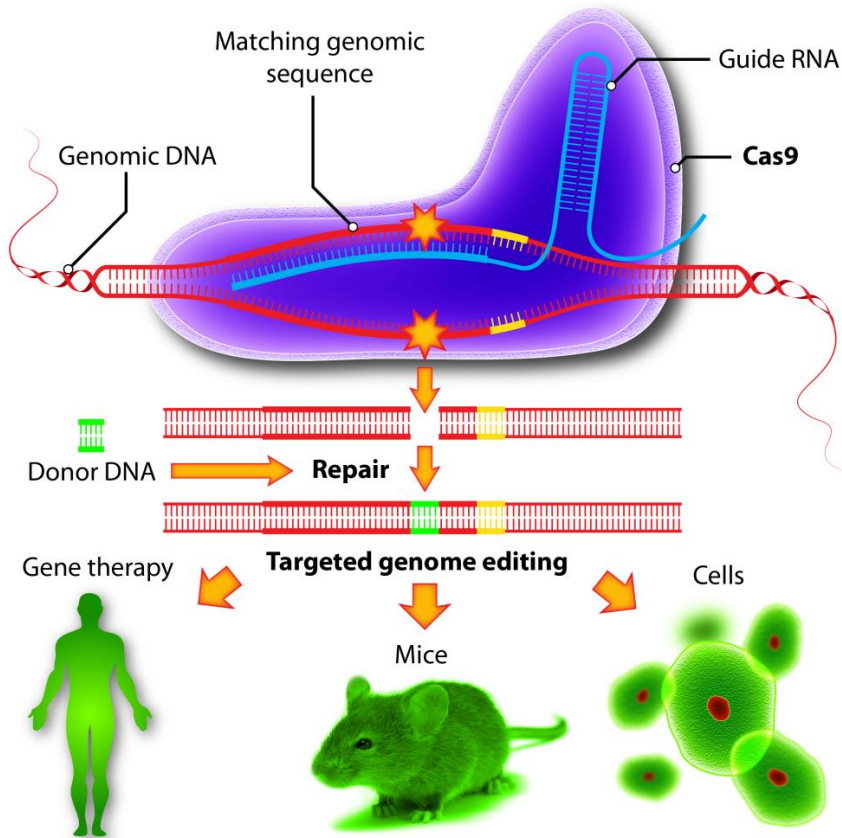
Creazione progenie in vitro; potenzialmente utile per xenotrapianto; produzione di grandi quantità di proteine ricombinanti; conservazione di animali in via d'estinzione

SVANTAGGI

Bassa efficienza; presenti anomalie in animali ed alterazioni della metilazione DNA; tendenza alla rottura → evitare pipette o aghi → sciogliere la membrana cellulare con saponi + campo elettrico

Animali

4. GENOME EDITING



CRISPR/Cas: «forbici del codice genetico»

VANTAGGI

- ↑ velocità
- Costi non eccessivi

SVANTAGGI

- Limitata alle sequenze riconosciute dalle nucleasi
- Rischio di off-targeting

Modello murino per malattie umane



Il DNA del topo è stato interamente sequenziato e mappato: possiede un genoma di circa 30.000 geni e quasi l'80% di questi sono in comune con la nostra specie.

E' il mammifero più utilizzato in letteratura, negli studi che riguardano la modifica di DNA, anche perché, in esso l'effetto che incide su un determinato gene è osservabile nell'intero organismo. La manipolazione dei geni può provocare in lui malattie dalle quali solitamente non sarebbe colpito.



Topo transgenico

Per definizione, un topo transgenico possiede i cromosomi alterati.

- ✓ Facilmente allevabile
- ✓ Piccole dimensioni
- ✓ Riproduce nidiata numerose
- ✓ Contrae molte delle malattie umane

**Modello
predittivo di
malattie**

Modello murino per malattie umane

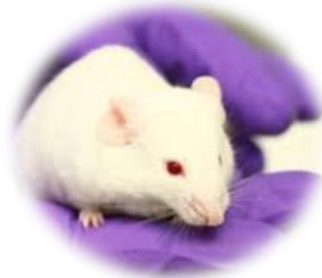


Esempi di topi transgenici



*Topi
grandi*

Oncotopi



*Topi
Doogie*



Topi Knock-out

1958



Lederberg

Scoprì che si potevano incrociare dei ceppi di batteri. Questi procreavano una prole che mostrava l'unicità della propria genetica.

2007



Capecchi
Smithies
Evans

Ricevettero il Premio Nobel per la medicina, in merito alla scoperta del topo Knock-out e del nuovo modello murino.

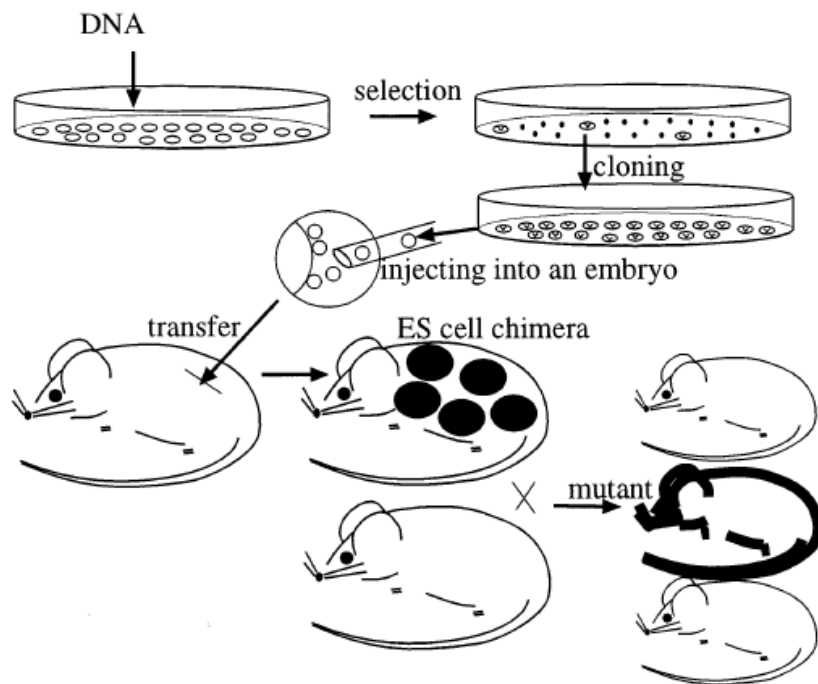
Topi Knock-out

Si introduce del DNA straniero nei geni che si trovano nel nucleo di ogni cellula del topo.

Tecniche introduzione DNA



- Iniezione di DNA nel pronucleo
- Utilizzo di cellule staminali embrionali



Processo di creazione di topi knock-out

I topi sono generati secondo la *tecnica gene-targeting*. 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 topo il cui DNA è stato originariamente alterato. Il successivo incrocio tra questa darà origine a topi knockout.

Trasmissione neuromuscolare in modello animale transgenico

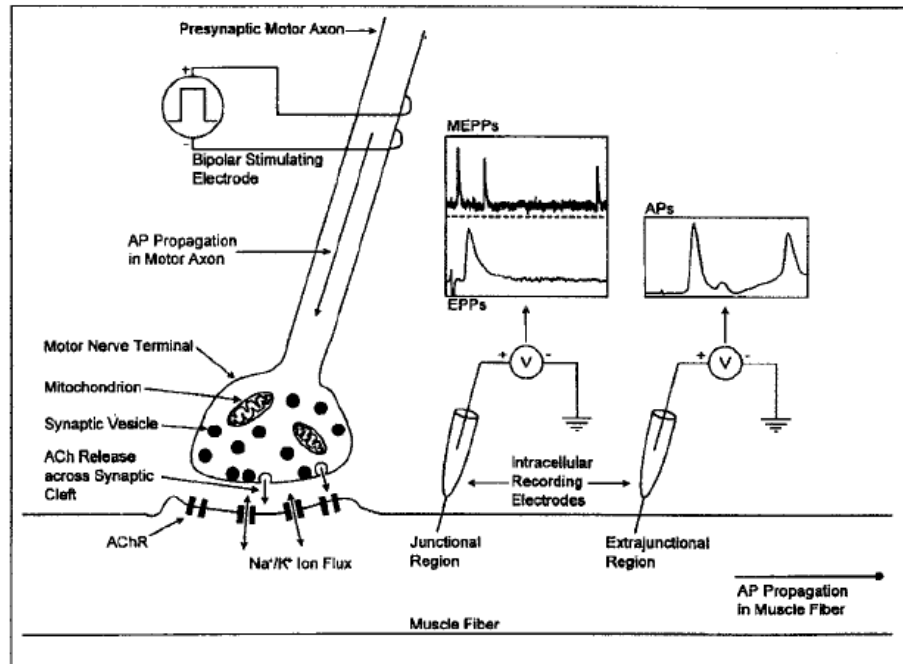
La malattia di Huntington è una malattia neurodegenerativa causata da una mutazione nei motoneuroni. Sono coinvolti sia i motoneuroni superiori della corteccia motoria, sia quelli inferiori del midollo spinale.

Nel modello animale transgenico, la perossidazione lipidica causata dall'espressione di SOD1 umano mutante, potrebbe originare la patogenesi, compromettere la ripolarizzazione della membrana e alterare la cinetica dei canali di calcio voltaggio-dipendenti. Tali modificazioni si manifestano come anomalie nella funzione del motoneurone.

Le diverse forme mutate del SOD1, sviluppano una patologia nei pazienti che si manifesta in modo diverso.

In questo studio si cerca di esaminare gli effetti della mutazione SOD1 sulla funzione del motoneurone ed esplorare il meccanismo alla base della malattia.

E' stato utilizzato un micro-elettrodo intracellulare che registra i biopotenziali sinaptici evocati dalla funzione neuromuscolare.



Si è tenuto conto:

1. dei potenziali evocati (EPP)
2. dei potenziali ridotti (MEPP)
3. del potenziale di membrana a riposo (RMP)

Si è confrontata, quantitativamente, la trasmissione neuromuscolare in tre gruppi di topi:

- ❖ Transgenici G1H e G1L con il gene SOD1 umano mutato
- ❖ Transgenici di controllo N29
- ❖ Animali normali, non trattati, di tipo selvatico usati come controlli (wild-type)

Metodi



Sono stati utilizzati topi G1H di 70-90 giorni e topi G1L di 130-150 giorni.

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, nei G1H, sono i principali a degenerare.

E' stata utilizzata una stimolazione del nervo a 2 Hz e un programma di campionamento computerizzato per la registrazione di potenziali ridotti spontanei MEPP e potenziali evocati EPP.

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 topi, i potenziali evocati sono stati calcolati in tre differenti modi:

$$m_d = \overline{EPP} / \overline{MEPP}, \quad (1)$$

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

$$m_f = \log_e N/N_f, \quad (3)$$

m_d metodo diretto

m_i metodo di varianza indiretta

m_f metodo per fallimento

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

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

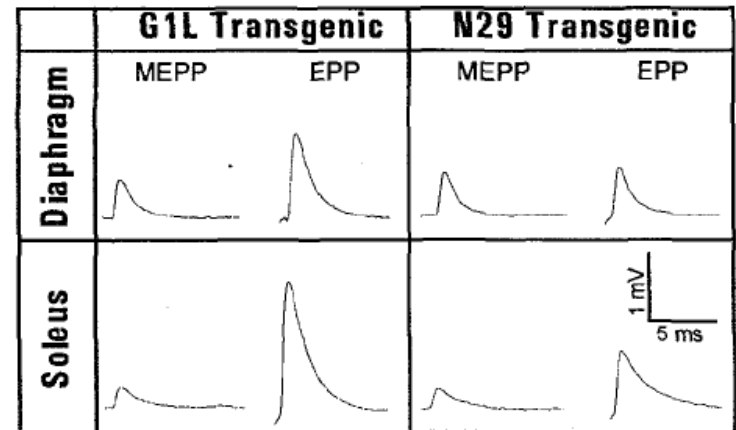
in cui E_c ed E sono rispettivamente le ampiezze corrette e non corrette e RMP è il potenziale di membrana a riposo [mV].

Risultati e conclusioni



L'afflusso di calcio, mediato dai canali voltaggio-dipendenti, verso il motoneurone, in linea generale, risulta aumentato nei topi con gene SOD1 umano mutato.

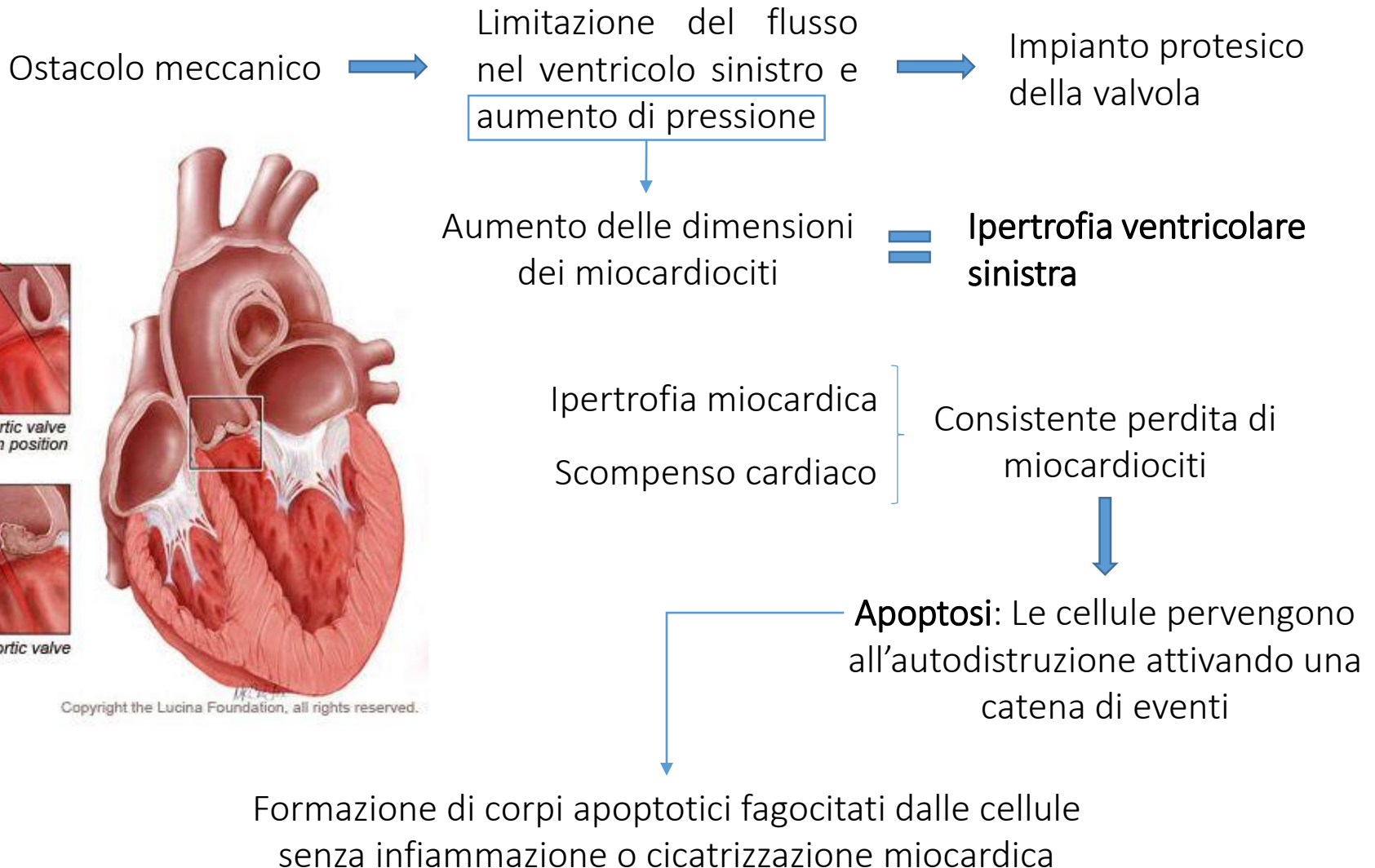
1. Nei muscoli del diaframma dei topi G1H il contenuto dei potenziali evocati è significativamente aumentato rispetto ai valori trovati nei corrispondenti topi di controllo N29 o animali wild-type.
2. I potenziali dei topi N29 non sono particolarmente diversi da quelli dei topi di tipo selvatico.
3. Le ampiezze dei potenziali ridotti (MEPP) non sono molto differenti tra i gruppi.



Interpretazione possibile: dipendenza dei canali di calcio dalla tensione.

Stenosi valvolare aortica

Tra le valvulopatie più diffuse nei Paesi sviluppati con prevalenza in aumento con l'avanzare dell'età



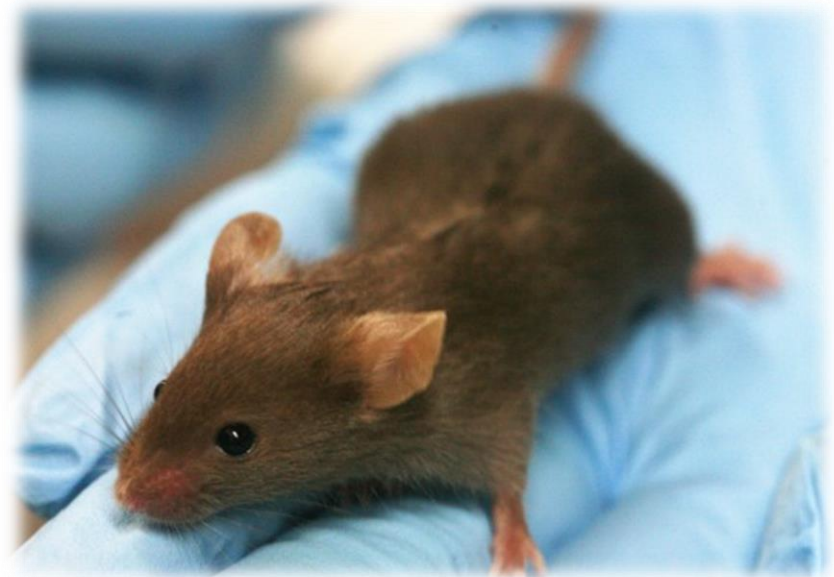
Stenosi valvolare aortica



Ipertrofia ventricolare sinistra ↔ Aumentata formazione di numerosi fattori di crescita

Prodotti in relazione al tipo di sovraccarico emodinamico; la produzione cambia in relazione allo stress di parete sistolico

Le recenti evidenze sperimentali e cliniche sulla rilevanza fisiopatologica dell'ipertrofia miocardica, della disfunzione microcircolatoria e dell'apoptosi miocardiocitaria nella stenosi aortica, suggeriscono che traguardi possano essere conseguiti sia sul piano scientifico sia clinico



↓
Studi che utilizzano
topi transgenici

- Ipertrofia cardiaca, O'Leary et al.
- Apoptosi miocardiocitaria, Wencker et al.

Ipertrofia cardiaca



O'Leary et al.

Topi geneticamente modificati, alterati per studiare alcuni aspetti dell'elettrofisiologia della membrana cardiaca

4 topi transgenici knockout caratterizzati da ipertrofia cardiaca con separazione tra le fibre ventricolari aumentata

- Cuore topo transgenico: 1.5 cm lungo l'asse maggiore
- Cuore topo gruppo di controllo: 1 cm lungo lo stesso asse

Sonda personalizzata per registrare gli elettrogrammi epicardici

16 elettrodi organizzati in una matrice 4x4 di area pari a 1 mm^2 sulla superficie epicardica del ventricolo destro anteriore



I dati sono raccolti effettuando, per ogni elettrodo, due misure, della durata di 5 secondi, prima in una posizione e poi con una rotazione di 90°

Ipertrofia cardiaca



Labview
Virtual
Instrument

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
- Sito di registrazione e orientazione dell'elettrodo marcati con penna micro-cauterizzante e cuore asportato
- Cuori incorporati in gel congelato o paraffina per il sezionamento

Utilizzato per l'analisi dei dati, per individuare i tempi di attivazione locale, creare mappe isocrone e plot dei vettori di velocità spaziale

Software
Matlab

➡ 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.

Ipertrofia cardiaca



Vettori di velocità spaziale
Mappe isocrone

Forniscono una prova visiva dei cambiamenti nei modelli di conduzione, risultato di un cambiamento nella struttura delle fibre del muscolo cardiaco



Indicazione di un tempo di attivazione più lento nei topi transgenici; i risultati istologici dimostrano l'allungamento previsto delle cellule e un aumento della spaziatura interstiziale

➡ 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

Conclusioni

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 cellule; questo riflette una differenza nella distribuzione della giunzione di gap nei topi transgenici e svolge un ruolo nell'attivazione epicardica

Apoptosi del miocita cardiaco



Wencker et al.

Utilizzo di topi transgenici in cui la morte delle cellule muscolari cardiache può essere **attivata a piacimento**

Proteina di fusione composta da 3 moduli di FKBP-12 umana attaccati ai domini catalitici p20 e p10 della caspasi-8 umana

Cataliticamente inattiva; può essere stimolata mediante somministrazione sistemica ai topi di una molecola (FK1012H2) che può indurre l'oligomerizzazione della proteina transgenica

Controllo: Ulteriore linea transgenica che si differenzia dalla prima per una mutazione puntiforme che inibisce l'attività della caspasi

Effetti
dell'induzione
acuta
dell'apoptosi

La letalità della molecola somministrata dipende dalla funzione della caspasi: la linea di controllo è risultata completamente resistente anche a dosi più elevate, mentre i topi transgenici sotto analisi sono morti

➡ L'attivazione di una caspasi-8 nel cuore determina una massiva apoptosi del miocardio e morte del topo

Apoptosi del miocita cardiaco



Intenzione: Valutare gli effetti di bassi livelli di apoptosi dei miociti sulla struttura e sulla funzione cardiaca



- Anche senza somministrazione della molecola, i topi della linea transgenica altamente espressiva presentavano un aumento della mortalità a partire da circa 8-9 settimane di età
- Normale durata di vita nei topi transgenici di controllo

→ **Ipotesi:** Riduzione della sopravvivenza nei topi della linea espressiva derivante dalla cardiomiopatia dovuta a bassi, ma comunque anormali, livelli di apoptosi dei miociti



Struttura cardiaca e funzione valutate in diversi momenti

- A 3 settimane l'ecocardiografia e l'analisi istologica sono risultate normali
- A 9 settimane i topi transgenici presentavano dilatazione ventricolare sinistra

Apoptosi del miocita cardiaco



- ➔ Colorazione su sezioni cardiache di animali che non avevano mai ricevuto la dose per indagare il ruolo dell'apoptosi dei miociti nella cardiomiopatia dilatativa

Valutazione della frequenza dell'apoptosi spontanea dei miociti

Nei topi transgenici era sensibilmente aumentata, ma comunque piuttosto bassa

Da 4 a 10 volte inferiore rispetto alle stime della morte dei miociti nei cuori umani

- ➔ L'induzione di un livello molto basso di apoptosi nei miociti è sufficiente a indurre una cardiomiopatia letale

Conclusioni

- Il meccanismo più probabile con cui l'attivazione della caspasi contribuisce alla cardiomiopatia è la morte del miocita cardiaco
- È possibile che le caspasi influenzino anche la struttura cardiaca
- I bassi livelli cronici di apoptosi dei miocardiociti sono una componente causale nella patogenesi dell'insufficienza cardiaca

Parkinson



Malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson sono sempre più in aumento e rappresentano problemi di salute difficili da studiare. 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 la malattia del Parkinson che continuano a fornire informazioni preziose, consentendo anche di sperimentare nuove strategie terapeutiche.

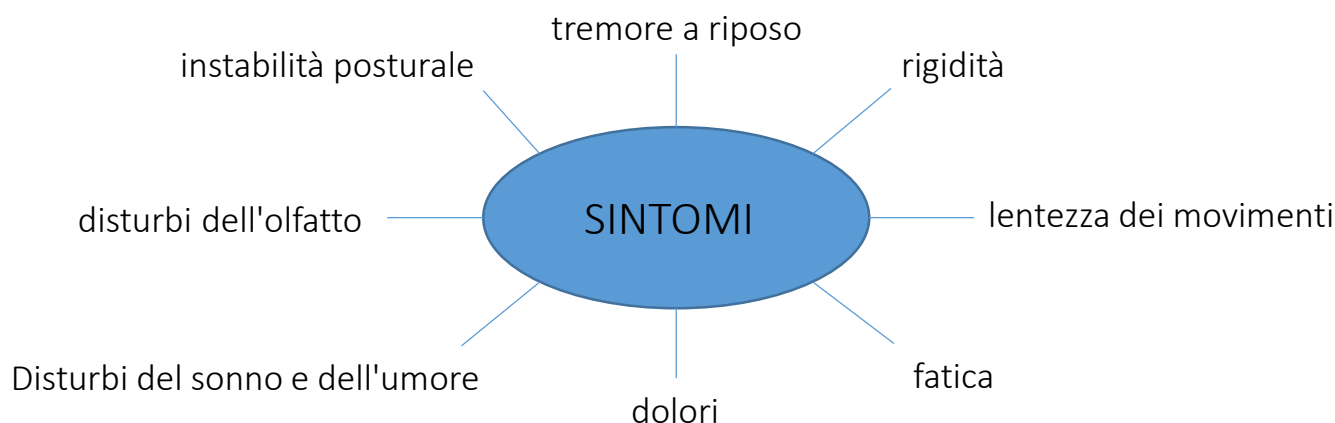


Parkinson



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.



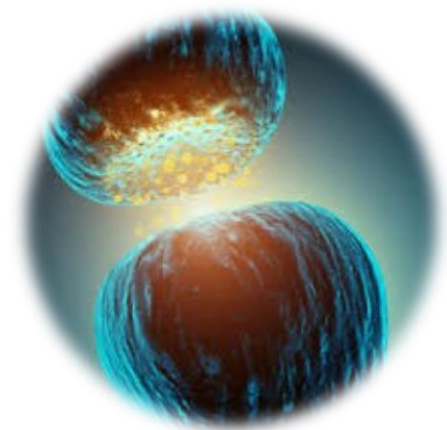
Parkinson



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 (cioè quelli che utilizzano dopamina per stabilire una sinapsi con gli altri neuroni) a livello della sostanza nera 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 malattia di Parkinson si manifesta quando la produzione di dopamina nel cervello cala consistentemente. I livelli ridotti di dopamina sono dovuti alla degenerazione di neuroni.



Dal midollo al cervello cominciano a comparire anche accumuli di una proteina chiamata alfa-sinucleina.



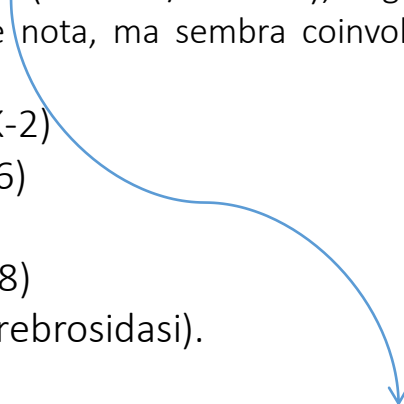
Quindi, lo studio dell'aggregazione di alfa-sinucleina è un obiettivo comune nello sviluppo di approcci farmaceutici per prevenire o migliorare la malattia del Parkinson e di altre numerose malattie neurodegenerative.

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), il gene PARK1 codifica la proteina α -sinucleina la cui funzione non è completamente nota, ma sembra coinvolta nella regolazione dell'integrità della membrana delle vescicole sinaptiche.
- parkina (PARK-2)
- PINK1 (PARK-6)
- DJ-1 (PARK-7)
- LRRK2 (PARK-8)
- GBA (glucocerebrosidasi).

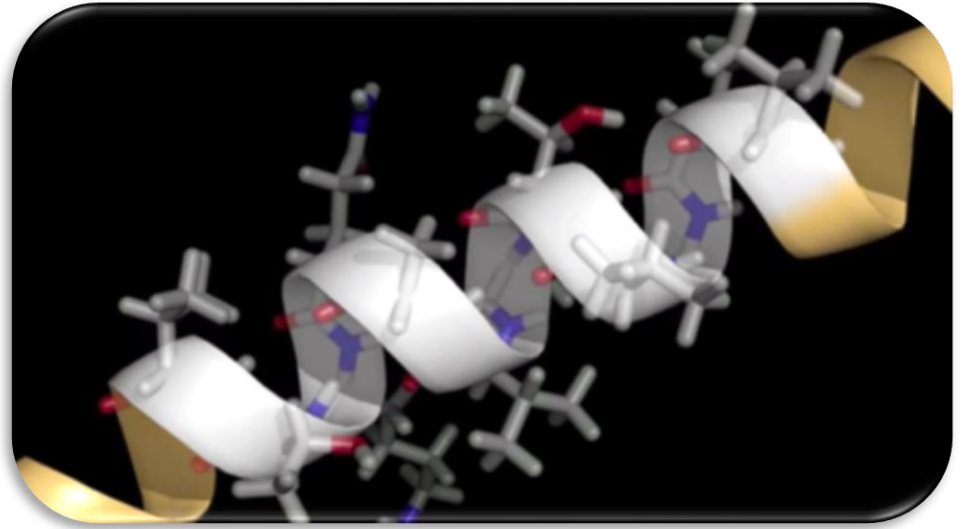


L'alfa-sinucleina (aSyn) è una proteina lunga 140 amminoacidi ed è normalmente espressa nei neuroni del sistema nervoso centrale e periferico. L'alfa-sinucleina è la principale proteina implicata nella patogenesi della malattia di Parkinson, in quanto i suoi aggregati formano i componenti primari dei corpi di Lewy e dei neuriti di Lewy, che sono le caratteristiche patologiche di questa malattia.

Alfa-sinucleina



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. 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.



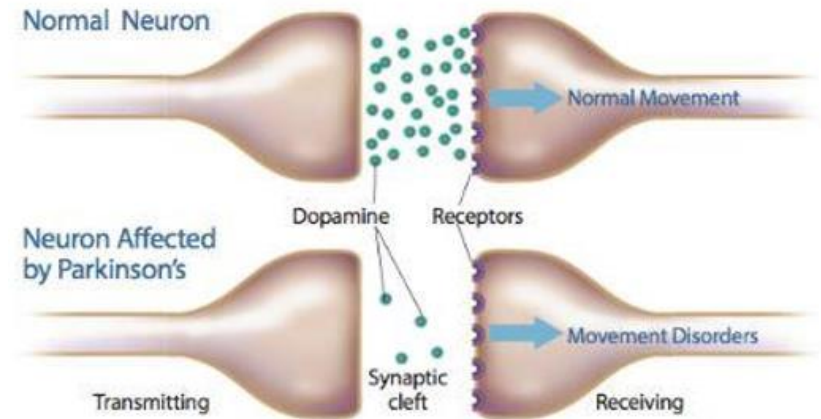
Alcuni ricercatori giapponesi hanno scoperto che la alfa-sinucleina interferisce con la trasmissione degli impulsi nervosi

Alfa-sinucleina



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. Sebbene la funzione di alfa-sinucleina non sia ben compresa, gli studi indicano 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 sostanza nera 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.



La dopamina è un neurotrasmettitore con il compito di veicolare le informazioni tra neuroni attraverso la sinapsi.

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).

A53T

Nel secondo modello transgenico, l'espressione di sinucleina viene indotta selettivamente nel 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", riduzione della dopamina striatale ed alterazioni motorie. Il fatto che le alterazioni anatomico-patologiche e funzionali siano più marcate è dovuto alla selettività anatomica ed alla maggiore quantità di espressione transgenica di alfa-sinucleina ottenibile con questa tecnica.

fenotipici più importanti deficit motori e appartiene non disponibili. I modelli si differenziano a seconda ubiquitaria oppure limitata al

Modelli transgenici



Esperimento

Il gene alfa-sinucleina sia in forma normale sia in forma di espressione. Vengono quindi micro iniettati nell'embrione. Il livello di espressione dell'alfa-sinucleina per entrambi i ceppi di topo sono state registrate le cortecce.



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 evitare la 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.

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.

Per limitare le sofferenze degli animali questi vengono soppressi dopo 10-20 giorni dalla prima manifestazione della patologia.

Modelli transgenici



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 sostanza nera, 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 mostrano 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.

Sviluppi futuri per la cura del Parkinson



In conclusione quindi, l'uso di modelli di animali transgenici permettono 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 su vari modelli animali della malattia di Parkinson, attualmente studiati a Monaco e nei laboratori a Gottinga sembra dimostrare che questa speranza di cura è fondata. 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 e memoria alterata. Il trattamento con anle138b ha normalizzato l'attività cerebrale e migliorato la capacità di apprendimento dei topi rispetto ai loro simili non trattati.

I ricercatori invitano però a non farsi prendere dall'euforia poiché 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 presenta molti ostacoli.



Un team di scienziati diretto da Armin Giese, dell'Università Ludwig Maximilian di Monaco e Christian Griesinger, dell'Istituto Max Planck di chimica biofisica di Gottinga: «**Anle138b, una molecola che regala speranza**»



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



Bibliografia

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".



Bibliografia

12. Materiale del corso di Biotecnologie, “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