

Si sono tenuti a Dresda (Germania) 3 Congressi sulla MdH: il 7-8 Settembre 2007 la Riunione annuale dei centri partecipanti all'EURO-HD Network e il 9-11 Settembre il Congresso Mondiale sulla Malattia di Huntington che si è svolto congiuntamente al Congresso della Associazione Internazionale dell'Huntington (International Huntington Association). Si è trattato di una immersione totale nelle problematiche e nelle ricerche più recenti sulla MdH.: tra tutti gli studi presentati vi riassumeremo in queste pagine quelli che ci sono sembrati più rilevanti

*International Huntington Association

**COLPIRE L'RNA PER TACITARE IL GENE DIFETTOSO
PROSPETTIVE E LIMITI DI UN NUOVO APPROCCIO TERAPEUTICO
Dr.ssa Marina Frontali***

In questi ultimi anni è stata molto attiva la ricerca su tecniche alternative alla terapia genica, in particolare sulla cosiddetta 'interferenza con l'RNA'. Si tratta, in buona sostanza, di colpire non direttamente il gene, ma il suo stampo di RNA (acido ribonucleico), cioè il cosiddetto RNA messaggero (mRNA). Un gene, come si sa, è scritto in sequenze di lettere chimiche ed è formato da due filamenti che si avvolgono su sé stessi formando una doppia elica. Lo stampo di mRNA ha una struttura simile ma è formato da un solo filamento. Questo stampo viaggia all'interno della cellula, portando con sé l'informazione contenuta nel gene, per andare a legarsi all'apparato che produce le proteine e lì presiedere alla costruzione di una specifica proteina. Dunque l'mRNA è essenziale perché un gene, come si dice in gergo tecnico, 'si esprima' possa cioè svolgere la funzione cui è deputato che è quella di produrre una proteina.

L'interferenza con l'RNA' è una tecnica che serve a distruggere l'mRNA o comunque a impedirgli di svolgere la sua funzione, ottenendo di fatto il risultato di silenziare o tacitare il gene corrispondente. Questo si può ottenere in vari modi. Una prima tecnica si basa sull'introduzione in una cellula di un piccolo RNA (shRNA) disegnato appositamente per essere simile a una sequenza di uno specifico mRNA stampo. La struttura di questo piccolo shRNA è a doppia elica come alcuni virus e l'apparato di difesa della cellula lo riconosce come estraneo e lo distrugge insieme a tutte le sequenze di mRNA simili.

Questa tecnica ha ovviamente acceso le speranze di poterla utilizzare nella terapia di varie malattie genetiche neurodegenerative dovute alla mutazione di una sola copia del gene in questione e alla corrispondente produzione di una proteina tossica. Se si riesce a silenziare la copia mutata del gene, lasciando funzionante la copia normale, si dovrebbe poter curare o prevenire la malattia. La sperimentazione su modelli animali è stata condotta sia per quanto riguarda la MdH sia per altre malattie, come ad esempio la Sclerosi Laterale Amiotrofica. Nella MdH, il gene IT-15 è presente nei malati con una copia normale che produce una proteina, la huntingtina normale, ed una copia mutata (con una espansione delle triplette ripetute CAG) che produce una huntingtina con funzioni tossiche. Per sfruttare la 'interferenza con l'RNA' come terapia si devono disegnare dei piccoli shRNA che distruggano l'mRNA stampo del gene mutato ma non quello del gene sano. Ora qui sta la difficoltà, perché la sequenza di lettere chimiche che compongono la copia mutata differisce da quella normale solo per il numero di ripetizioni della tripletta CAG in essa presenti, mentre per il resto sono identiche o quasi. Nei modelli animali il problema può essere risolto perché si tratta di animali nel cui patrimonio genetico è stato inserito un pezzo o tutto il gene umano mutato. Dunque la copia mutata umana e quella normale (del topo) differiscono nella loro sequenza di lettere chimiche. 'L'interferenza con l'RNA' in questo tipo di animali affetti da MdH ha dato buoni risultati, come ha illustrato la

Prof.ssa Beverly L. Davidson (Iowa, USA) perché si è potuto disegnare un shRNA che andasse a colpire solo la copia mutata. Nel caso della specie umana, invece, le due copie del gene IT-15 dei malati hanno, come si è detto, una composizione simile a parte il numero di ripetizioni della tripletta. Dunque l'introduzione di piccoli shRNA eliminerebbe la proteina anomala, ma anche quella normale.

La Prof.ssa Gillian Bates del Kings College di Londra (Regno Unito) ha fatto una rassegna delle prospettive e dei limiti di questo tipo di tecniche nel caso della MdH, sottolineando come sia necessario, innanzitutto, cercare di capire che effetti produce la assenza della huntingtina normale. Si sa che nello sviluppo embrionale la assenza della proteina non è compatibile con la vita. Tuttavia nulla è noto degli effetti che questa assenza avrebbe nell'individuo adulto e dunque una ricerca in questo senso dovrebbe portare qualche lume. D'altro canto è anche possibile cercare di vedere se una riduzione, anche solo parziale, delle due proteine possa ritardare la progressione della malattia, consentendo alla huntingtina normale, pur se ridotta, di svolgere la sua funzione.

Questi tuttavia non sono gli unici problemi connessi con l'uso della 'interferenza con l'RNA'. I piccoli shRNA possono entrare nelle cellule solo se veicolati da virus che vengono resi inoffensivi tramite manipolazioni genetiche. Esiste sempre la possibilità teorica che questi virus possano riacquistare col tempo la loro patogenicità e ridivenire dannosi. Sono attive le ricerche per tentare di introdurre shRNA senza virus.

Inoltre i costrutti virus-shRNA per raggiungere le specifiche cellule cerebrali che vanno incontro a degenerazione devono essere introdotti per via chirurgica in specifiche aree del cervello. Al momento si sa che le aree cerebrali più colpite sono il corpo striato e la corteccia dei lobi frontali. Tuttavia, altre ricerche stanno emergendo e fanno ritenere che la malattia colpisca anche altre zone cerebrali, se non il cervello nella sua totalità. Dunque è necessario sapere quante e quali zone del cervello devono essere raggiunte.

Un secondo approccio terapeutico, che ha sempre l' mRNA come bersaglio, sembra risolvere alcuni di questi problemi anche se non tutti. Si tratta di introdurre nelle cellule delle piccole sequenze di RNA, questa volta a elica singola invece che doppia, dette oligonucleotidi antisenso. Gli oligonucleotidi devono essere disegnati in modo da potersi attaccare allo specifico mRNA che si vuole silenziare. Si formerà così un tratto di mRNA a doppia elica che viene distrutto. Gli antisenso non hanno bisogno di essere veicolati da virus e non necessitano di interventi neurochirurgici. Possono essere introdotti nell'organismo attraverso il liquor (cioè il liquido che circola nel cervello e nel midollo spinale) mediante una apposita pompa, così come avviene già per molti farmaci. Attraverso il liquor essi possono raggiungere qualsiasi parte del cervello. Questo tipo di terapia è già in sperimentazione in pazienti colpiti da Sclerosi Laterale Amiotrofica dovuta a mutazione del gene SOD1. In questo caso il gene mutato e quello normale differiscono nella loro sequenza e quindi è possibile disegnare degli oligonucleotidi che colpiscano solo il gene mutato. Nel caso della MdH il sistema per differenziare i due geni deve ancora essere trovato.

**ALLA RICERCA DI INDICATORI PER MISURARE
L'EFFETTO DI NUOVE TERAPIE
Dott.ssa Marina Frontali***

La MdH progredisce lentamente e anche il suo inizio è subdolo, non è facile dire con precisione quando si passa da uno stato di salute ad uno di malattia. Questi due aspetti rendono difficile la ricerca di terapie che rallentino la progressione della malattia o che ne ritardino l'inizio. Infatti, se guardiamo l'aggravamento della malattia solo dal punto di vista dei segni rilevabili dal neurologo, si tratta di un processo che può diventare evidente nell'arco di qualche anno. Inoltre se nel frattempo il paziente prende dei farmaci che rendono meno evidenti i segni clinici, il progredire della malattia viene oscurato. Infine i segni clinici sono difficilmente misurabili in modo preciso ed il loro aggravamento viene valutato con difficoltà anche da neurologi esperti: in una analisi condotta dall'EURO-HD network sulla valutazione della gravità dei segni clinici di diversi pazienti da parte dei neurologi partecipanti al Registro è emerso che le valutazioni possono essere anche molto diverse da un neurologo all'altro. In questa situazione, per valutare in tempi relativamente brevi e in modo più attendibile se un nuovo farmaco rallenti l'aggravarsi della malattia o ne ritardi l'inizio, sarebbe estremamente utile avere un indicatore obiettivo, facilmente misurabile, sia dell'inizio che della evoluzione del processo di degenerazione delle cellule nervose. La ricerca di indicatori che possano essere utili in questo senso (detti anche markers o meglio biomarkers) è particolarmente attiva.

Si tratta di ricerche che focalizzano l'attenzione su cosa avviene nelle fasi che precedono l'inizio della malattia, cioè su un'area che non è stata finora sufficientemente esplorata - come ha rilevato il Prof. J. Gusella, del Neurogenetics Laboratory del Massachusetts General Hospital di Boston USA, che nel 1993 ha scoperto il gene della MdH.

Alcuni gruppi si concentrano soprattutto sulla misurazione del volume di diverse strutture cerebrali eseguite a partire da immagini della Risonanza Magnetica Nucleare. Buoni risultati sono stati ottenuti con la misurazione del volume del nucleo caudato da un gruppo dell'University College di Londra, con la misurazione dello spessore della corteccia cerebrale (Center for Biomedical Imaging, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, USA) o del volume cerebrale in toto (Divisione di Diagnostica per immagini del IRCCS Pascale di Napoli). Questi ultimi dati dimostrano anche che il processo degenerativo, già fin dall'esordio, è esteso anche a zone del cervello che finora non si ritenevano colpite dalla malattia. Il limite di questo tipo di ricerche è la difficoltà di rendere omogenee le misurazioni tra immagini ottenute con apparecchiature diverse in posti diversi.

Altri gruppi invece hanno preferito seguire la strada di markers cosiddetti fluidi, cioè ricavabili da sangue, urine o liquor. Particolarmente rilevanti sono sembrate le ricerche che hanno messo in luce un aspetto finora poco noto della MdH cioè la presenza nel cervello, accanto alla degenerazione delle cellule nervose, anche di processi infiammatori e immunitari fin dalle fasi precedenti l'inizio della malattia. Questi processi inducono nel sangue la presenza di sostanze legate all'infiammazione e alla reazione immunitaria alcune delle quali aumentano la loro concentrazione al progredire della malattia e costituiscono quindi dei potenziali biomarkers (dati ottenuti da un gruppo guidato da S Tabrizi dell'University College di Londra). Altri markers potenziali derivano dagli studi del gruppo della Prof.ssa Elena Cattaneo che ha messo in luce un difetto della sintesi del colesterolo nelle cellule cerebrali colpite dalla malattia. Il colesterolo circolante nel sangue non riesce ad entrare nelle cellule cerebrali, le quali devono provvedere a sintetizzarlo per

conto loro. Il colesterolo è infatti un componente essenziale per l'attività dei neuroni. Questo complesso processo di sintesi del colesterolo è compromesso nelle cellule affette da MdH e il difetto, presente già prima dell'inizio della malattia, si aggrava col suo progredire. Questi risultati non solo portano alla luce il ruolo del metabolismo del colesterolo come nuovo bersaglio per possibili terapie future, ma possono rivelarsi importanti per trovare nuovi biomarkers. Infatti il processo di sintesi del colesterolo potrebbe essere correlato con la presenza di [24S-idrossicolesterolo nel sangue](#). E' da segnalare che un progetto per indagare questo ultimo aspetto è coordinato dal Dr. Stefano Di Donato dell'Istituto Neurologico Besta di Milano e ad esso partecipano vari centri italiani, compreso quello di Roma.

*** Ist. Neurobiologia e Medicina Molecolare CNR**