

Dr. Andrea Cerase

Riattivazione del cromosoma X inattivo come potenziale approccio terapeutico per la sindrome di Rett e Cdk15

Andrea Cerase
Dynamics of Epigenetic Regulation group
EMBL-Rome

Fondazione T.i.am.o
Viareggio
2 Giugno 2018



Oggi vi parlo di un progetto di ricerca che è stato finanziato dal Rett Syndrome Research Trust il cui scopo è quello di riattivare il cromosoma X inattivo per liberare una dose di proteina sana nei pazienti Rett e CDKL5. La mia presentazione è per le famiglie e quindi abbastanza semplificata, però è importante per farvi capire i concetti generali.

Allora incominciamo dalle basi.

Cos'è un gene?

- Un gene e' una porzione di DNA
- Codifica per le **proteine**, i reali effettori delle funzioni biologiche e i determinanti dei caratteri fenotipici.



Con il termine **fenotipo** (dal greco *phainein*, che significa "apparire", e *týpos*, che significa "impronta") si intende l'insieme di **tutte le caratteristiche manifestate da un organismo vivente**, quindi la sua morfologia, il suo sviluppo, le sue proprietà biochimiche e fisiologiche comprensive del comportamento.

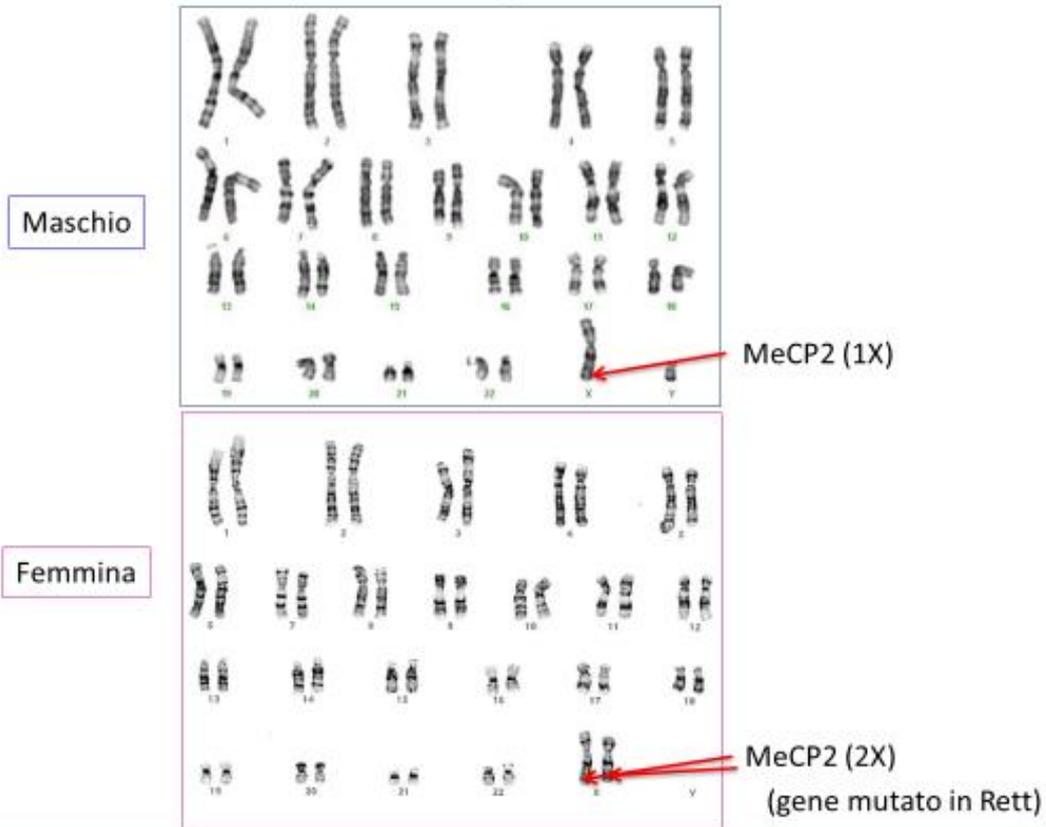
Che cos'è un gene:

Sappiamo che il gene è un pezzo di DNA, quindi è un'entità fisica che codifica per le proteine, e noi sulle proteine ci dobbiamo concentrare per capire quello che vogliamo fare in questo progetto. Perché le proteine sono i reali effettori di tutte le funzioni biologiche e i determinanti dei caratteri fenotipici.

Che cos'è il fenotipo:

Il fenotipo è l'insieme di tutte le caratteristiche manifestate da un organismo vivente, quindi è come un organismo appare, come si sviluppa e tutte le sue proprietà fisiche, biofisiche e di comportamento, per cui anche della parte cognitiva che è uno degli aspetti delle malattie in questione.

Nell'uomo i geni sono organizzati in cromosomi



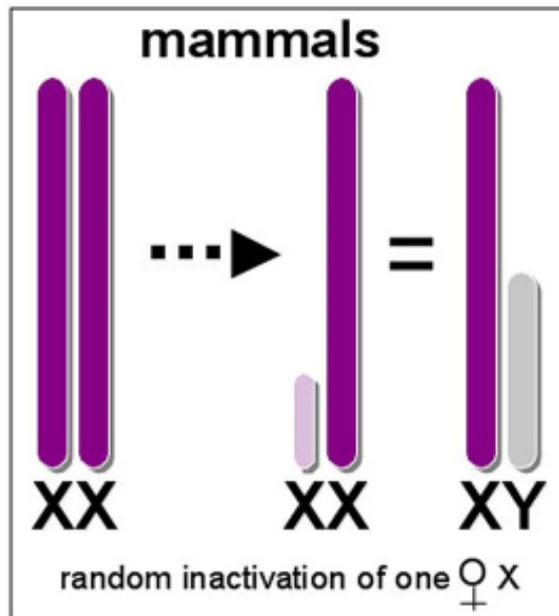
Noi sappiamo che nell'uomo i geni, quindi queste entità fisiche, ovvero pezzi di DNA, sono organizzate in cromosomi e come potete vedere dalle diapositive l'unica differenza tra il maschio e la femmina riguarda i cromosomi sessuali; nel maschio c'è un X e un Y e nella femmina ci sono 2 cromosomi X.

Come potete notare, anche a vista, il cromosoma Y è piccolo piccolo e ci sono veramente pochi geni sul Y che fanno proteine. L'altra cosa che probabilmente sapete già tutti è che il gene responsabile della sindrome di Rett, così come il gene responsabile di CDKL5, sta sul cromosoma X. Sapete pure che nel maschio c'è una copia mentre nelle femmine ce ne sono due.

Qui introduco il concetto di **inattivazione dell'X**:

Inattivazione del cromosoma X (compensazione epi-genetica X/Y)

Uno dei due cromosomi X nelle femmine e' silenziato e non produce proteine!



Doppia dose proteine
(se non compensato)

Stessa dose proteine

abbiamo detto all'inizio che i geni sono dei pezzi di DNA che fanno delle proteine. Quindi se vuoi considerate che nelle femmine ci sono due cromosomi X e nel maschio solo uno è un Y, che fa poco e niente, a parte determinare il sesso maschile, sembra chiaro che ci serve un meccanismo di compensazione affinché il numero di proteine e la quantità di proteine prodotta nelle femmine e nei maschi sia equivalente, questo processo si chiama **inattivazione del cromosoma X**.

Questo processo si chiama compensazione **epi-genetica** (in un'altra slide vi dirò cos'è epigenetica) che garantisce la stessa dose di proteine tra i maschi e le femmine. La cosa importante è che questo processo è **completamente reversibile**.

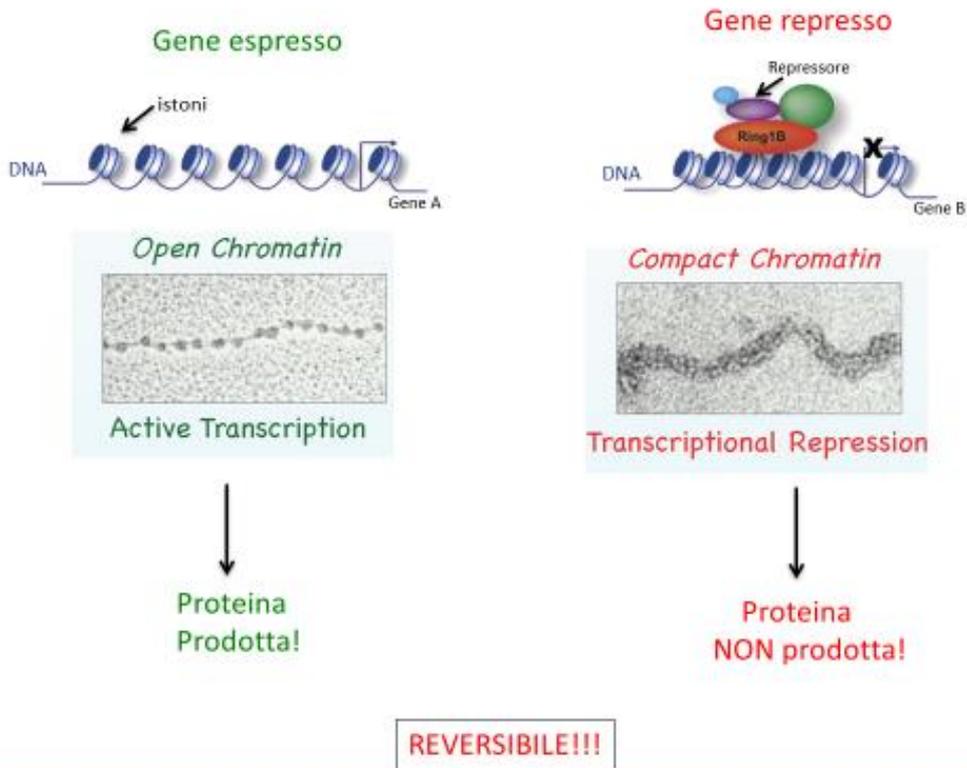
Epigenetica

Definita come lo studio dei meccanismi responsabili di cambiamenti ereditabili nelle funzioni del genoma senza alcuna modificazione nella sequenza del DNA

L'epigenetica che studia i cambiamenti del DNA che passano da una generazione cellulare all'altra e che non riguardano la sequenza del DNA e questo è importante perché dopo introdurrò il concetto di mutazione genetica che è invece quello che accade nei casi di sindrome di Rett e CDKL5.

Che cos'è la **regolazione epigenetica**:

Regolazione epigenetica della espressione genica



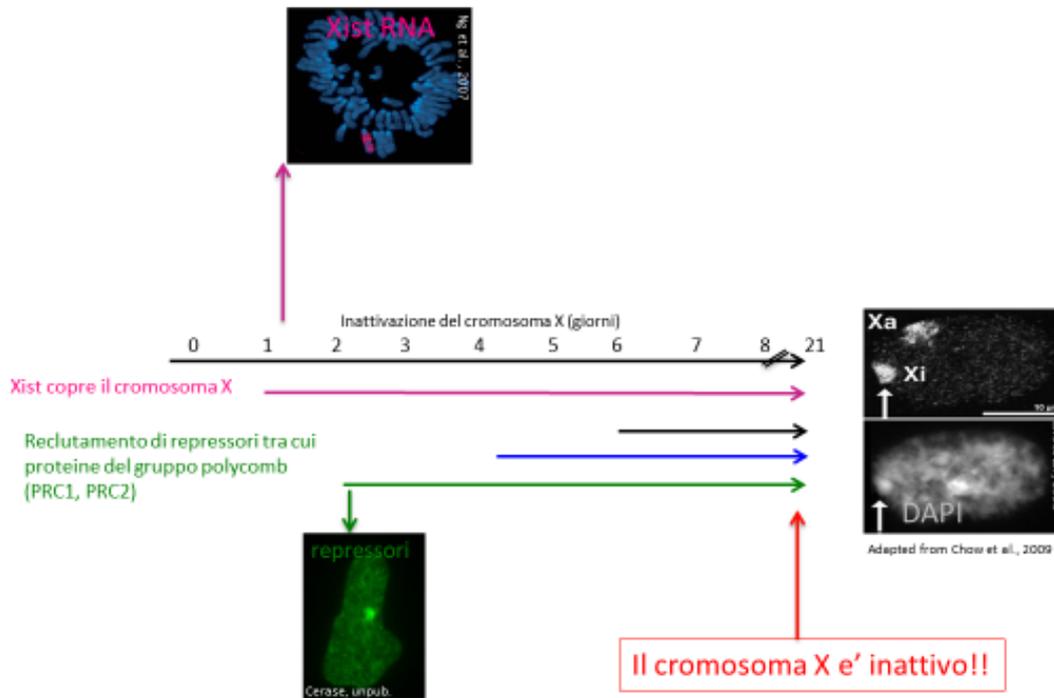
EMBL

La regolazione epigenetica fa in modo che un gene faccia una proteina o meno in funzione della compattazione del DNA. Quindi se vi riferite all'immagine a sinistra, il gene espresso in verde, vedete che il DNA è avvolto intorno a delle proteine che si chiamano istoni e il tutto si chiama cromatina. Se questo DNA è avvolto in modo lasso il gene A può fare la proteina A, e qua vedete, in questa microscopia elettronica, la cosiddetta collana di perle dove potete notare gli istoni e DNA disposti in maniera molto lassa quindi di una cromatina aperta che produce la proteina.

Se invece, immagine di destra, a un pezzo del DNA si lega un repressore che compatta la cromatina, il DNA e queste proteine sono compattate, vedete che i nucleosomi non sono più separati e la cromatina non è più separata. In questa condizione non si può produrre proteina quindi è equivalente funzionalmente una mutazione ma è completamente diversa perché questa è reversibile e noi cercheremo di sfruttare questa caratteristica nel progetto di cui vi parlerò.

Allora per capire su che piano vogliamo agire vi propongo una piccolissima introduzione sull' inattivazione dell' X, in questa caso è una diapositiva del modello di topo, ma nell'uomo è molto simile,

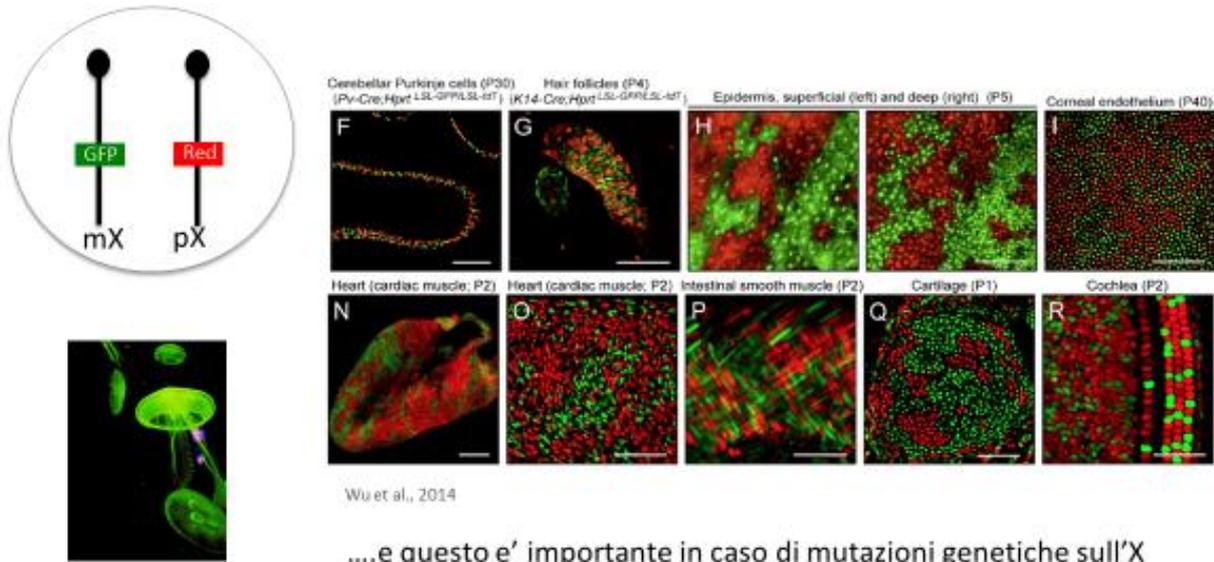
X Chromosome Inactivation (XCI) in topo (simile in uomo)



la prima cosa che succede è che su uno dei due X che deve essere silenziato nelle femmine un RNA ricopre completamente il cromosoma silenziato e recluta i repressori, tali repressori sono quelle molecole, come ho detto, altre proteine che compattano la cromatina, quindi rendono impossibile per il gene la sua espressione. Quindi se vedete alla fine del processo, questo è il cromosoma X inattivo, non so se vedete la freccia anche sul monitor, è molto compatto quindi vuol dire che il cromosoma non è attivo non può fare le proteine, quindi di fatto questo processo ha equiparato maschio e femmina per quanto riguarda tutte le proteine sul cromosoma X.

Perché questo è importante:

L'inattivazione del cromosoma X e' casuale



vi voglio dire che l'inattivazione dell'X è casuale, quindi se abbiamo in ogni femmina un cromosoma X che viene dal papà e uno dalla mamma, uno dei due diverrà l'X inattivo e la scelta è completamente casuale.

Nella ricerca, in biologia, possiamo sfruttare delle proteine fluorescenti che prendiamo dalla natura, in questo caso da una medusa. Queste sono proteine che quando vengono illuminate emettono una luce che consente di capire se un gene produce o no una proteina, in questo caso i ricercatori hanno messo una proteina rossa su un cromosoma, sul cromosoma del papà e una verde sul cromosoma della mamma, questo lavoro è stato seguito dal gruppo di Jeremy Nathans.

Quindi è chiaro, se vi concentrate su questa parte dell'orecchio, che la coclea, queste sono cellule se sono verdi è silenziato il cromosoma del papà e sono rosse nel caso contrario, come vedete il tessuto è completamente un mosaico, c'è sono più o meno il 50% delle cellule che esprimono l'X del papà o l'X della mamma. Questo è veramente importante in caso di mutazione sull'X e che questo vale sia per la sindrome di Rett che per CDKL5.

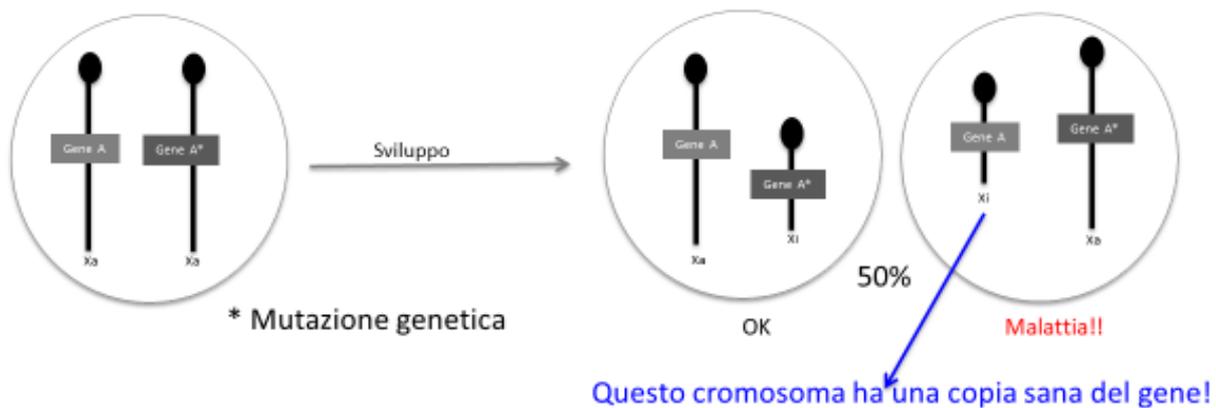
Allora ora introduco il concetto della **mutazione genetica** che voi probabilmente conoscete tutti molto bene.

Mutazioni genetiche

- Le mutazioni sono variazioni della sequenza nucleotidica del DNA. Possono essere causate da:
 - errori durante la duplicazione del DNA.
 - esposizione delle cellule ad agenti fisici o chimici (agenti mutageni)

Mutazioni genetiche producono poca/nessuna proteina o non funzionante (irreversibile)

Ruolo dell'inattivazione dell'X in caso di mutazioni sul cromosoma X nella sindrome di Rett



Le mutazioni della sequenza del DNA sono generalmente causate o da un errore della duplicazione del DNA, nel caso di MECP2 generalmente dalla parte del papà - o l'esposizione di cellule ad agenti fisici o chimici, così detti mutageni.

Qual è la **conseguenza di una mutazione**:

la conseguenza è che c'è poca o nessuna proteina, oppure la proteina non è funzionale e generalmente questa è una cosa irreversibile. A meno che non si attui la terapia genica di cui vi parlava Monica.

(Solo per inciso sono stato al meeting del RSRT a Boston la settimana scorsa per la terapia genica e soprattutto la parte del meeting relativa alla modifica dell' RNA, è sembrata molto promettente.)

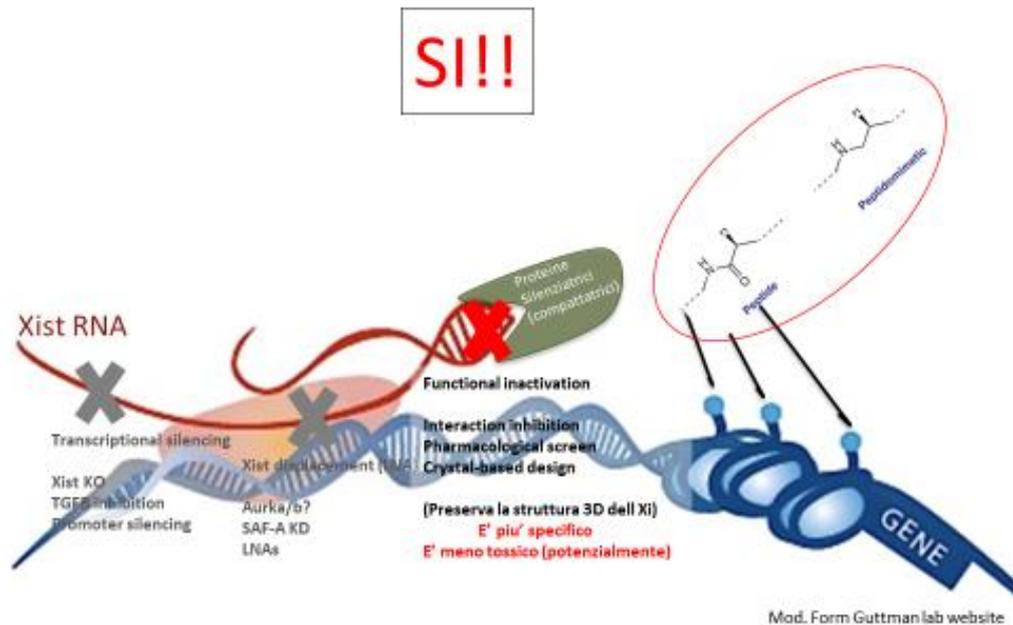
Le mutazioni sono irreversibili però nelle femmine (purtroppo questo non applicabile ai maschi) nel caso in cui ci sia una mutazione su uno dei due cromosomi X come potete vedere qua, in questo caso, durante lo sviluppo, come abbiamo detto, c'è il processo di inattivazione dell'X, quindi il cromosoma del papà o della mamma vengono silenziati per equiparare ai maschi il numero di proteine dell' X.

Quindi se venisse silenziato sempre il cromosoma mutato in questo caso del papà, la femmina sarebbe perfettamente normale e non avrebbe nessun fenotipo avverso perché ha una dose normale della proteina in questo caso MECP2. Se invece al contrario venisse sempre e solo espressa la copia mutata del papà e silenziato il cromosoma della mamma questo si assocerebbe ad una malattia molto grave e molto simile a quella del maschio, ma in realtà l'inattivazione dell'X è 50 e 50 e quindi potete pensare a quel **mosaico di cellule**

verdi e rosse, per cui ci saranno cellule che hanno la proteina sana quindi perfettamente sane e quindi neuroni perfettamente sani e neuroni che purtroppo non hanno la proteina e non riescono a svolgere le loro funzioni, non riescono a maturare le sinapsi, non riescono a stabilire le giuste connessioni. Però le femmine diciamo che hanno un asso nella manica, come si suol dire, perché loro hanno in ogni caso una copia sana in tutte le cellule. Quindi se questa copia è stata silenziata su base epigenetica - cosa che può essere reversibile - e quindi un po' di proteine possono essere estratte dal cromosoma sano e questo dovrebbe se non altro alleviare tutti i sintomi, se ciò si riuscisse a fare specificamente al 100% potrebbe essere la cura definitiva.

Allora come si fa a **bloccare o invertire l'inattivazione dell'X**:

E' possibile bloccare o revertire l' inattivazione dell'X??



La Rett Syndrome Research Trust ha finanziato questo progetto di riattivazione dell' cromosoma X inattivo per rilasciare una dose di proteina MeCP2 funzionale nella cellula.

EMBL

si può agire in differenti modi diversi; vi ho detto nella slide di introduzione che c'è un RNA che controlla il processo, questo RNA lo possiamo chiamare il master regolatore del processo, quindi si può fare in modo che questo RNA non venga prodotto, la prima "X" che vedete qua o che questo RNA non si diffonda su tutto il cromosoma X e questa è una seconda possibilità.

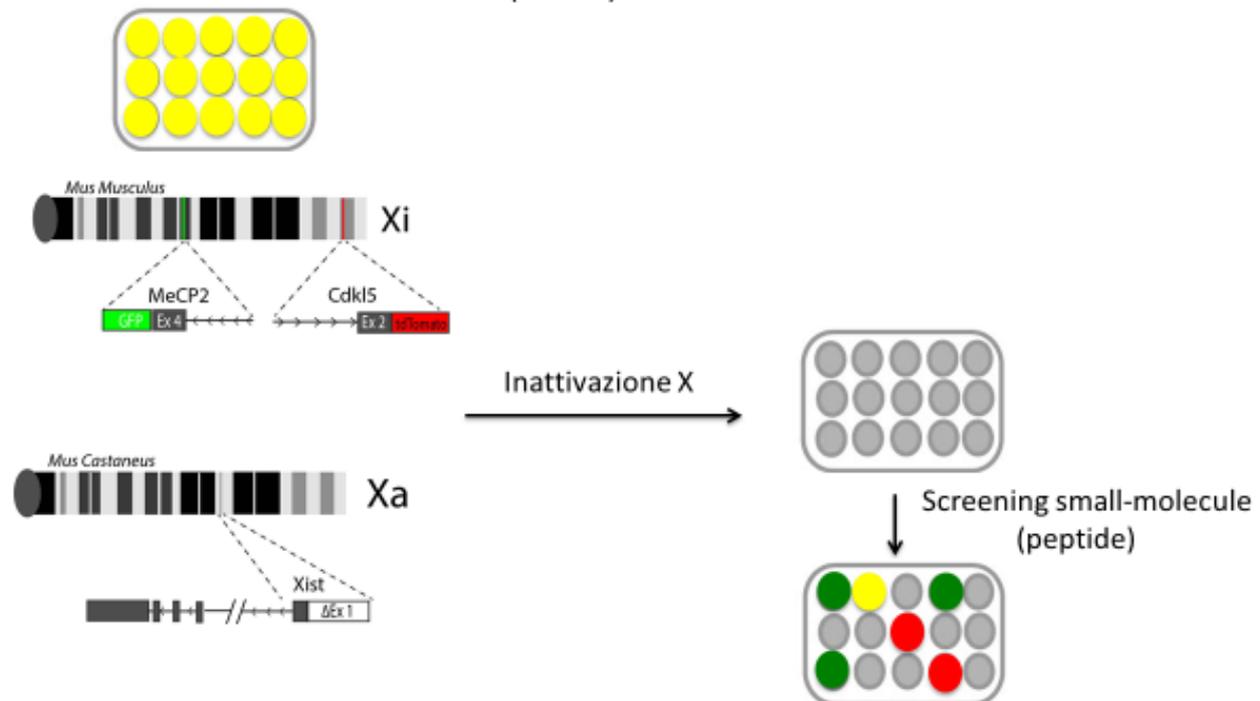
L'ultima possibilità, che è quella che è stata finanziata dal consorzio americano di Monica Coenraads (RSRT) è quello di bloccare questo RNA non-coding (non codificante, che non produce proteine) con l'interazione di queste proteine compattatrici.

Quindi se questo RNA non porta le proteine compattatrici sull'X, il gene in genere lentamente dovrebbe riprendere a fare la proteina. Abbiamo deciso di fare questa cosa usando delle librerie di piccoli composti, in questi casi dei peptidi, che sono delle piccole proteine modificate in modo da bloccare l'interazione tra questo RNA e queste proteine silenziatrici. Così si blocca questa interazione, le proteine compattatrici non possono raggiungere i target tra cui MECP2 e CDKL5, quindi il gene dovrebbe essere nuovamente espresso.

Quella che segue è l'unica slide che è un po' più complicata. Però possiamo possiamo spiegarvela in dettaglio, allora qui di nuovo utilizziamo queste proteine fluorescenti che sono prese dalla natura, quindi hanno un pezzo di DNA codificante e producono una proteina che se viene illuminata con raggi ultravioletti emette un colore verde o rosso.

Sistema per studiare la riattivazione dell'X Screening di composti peptidici

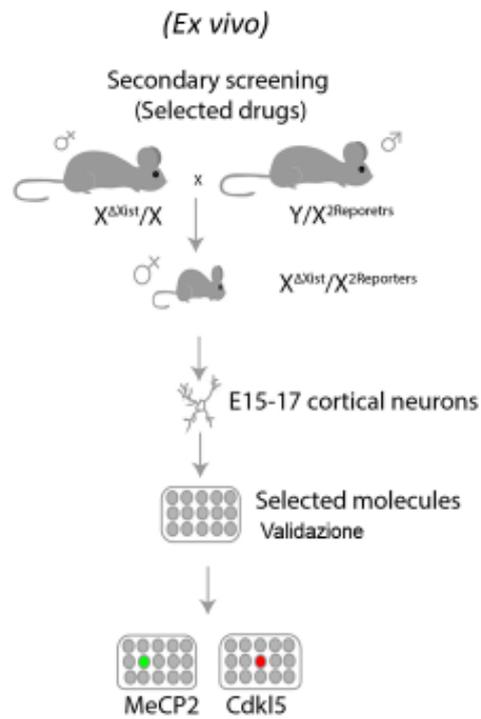
(In vitro)



EMBL

Noi abbiamo ingegnerizzato delle cellule che hanno questa proteina o sotto il promotore MECP2 o sotto il promotore CDKL5. Questo che vuol dire: che quando uno o l'altro gene o entrambi, come in questo caso, sono espressi, entrambe le proteine fluorescenti sono presenti e perciò vediamo giallo (se si meschia colore verde e rosso si ottiene il giallo). Nella situazione di partenza entrambi i geni sono espressi, quando invece ci sarà l'inattivazione dell'X e noi sappiamo che sarà sempre questo cromosoma ad essere inattivato perché abbiamo rotto l'RNA di Xist (X inactive specific transcripts) su quell'altro cromosoma, abbiamo tolto il master regulator dell'inattivazione dell'X dall'altro cromosoma, questi geni saranno sempre silenziati. Come facciamo a riattivarli, per riattivarli facciamo uno **screening**, di cui pure Monica parlava prima, usando queste **piccole molecole**. Quindi diamo a queste cellule queste piccole molecole e se queste molecole bloccano questa interazione, a poco a poco dovremmo rivedere queste due proteine che vengono riprodotte; e come ce ne accorgiamo che queste proteine sono riprodotte? misurando la fluorescenza. Se queste questo blocco di interazione riattiva solo MECP2 vediamo le cellule che diventano verdi se si riattiva solo CDKL5 vediamo che le cellule hanno questa fluorescenza rossa. Se invece li riattiva entrambi essi avranno una fluorescenza gialla. Questo è il nostro sistema sperimentale e questo è il modo in cui stiamo procedendo; chiaramente i procedimenti sulle cellule verranno testati prima sui neuroni di topo. Seguiremo lo stesso principio per la riattivazione e poi continueremo nei sistemi modello che sono i topi a cui mancano queste proteine ed infine nelle linee umane.

Validazione dei composti riattivanti dello screening primario in neuroni



- PreClinical Trials nell animale modello (MeCP2/CDKL5)

Quindi questo è il progetto che è stato finanziato. Vi ringrazio per la vostra attenzione e resto a disposizione per eventuali domande.