

2. Novembre

## Terapia genica: traferimento e integrazione funzionale del gene della otoferlina

*La scienza contemporanea si regge su entità sottilissime,  
come i messaggi del Dna, gli impulsi dei neuroni, i quark, i bit senza peso.*  
Italo Calvino



ESGCT

### 30th ANNUAL CONGRESS BRUSSELS 24-27 Oct 2023



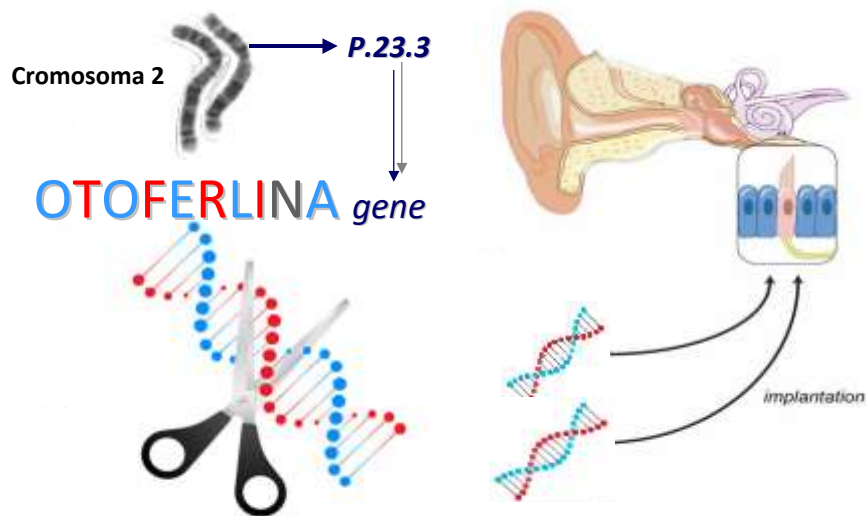
Il 26 ottobre in occasione di un incontro della **Società europea per la terapia genica e cellulare a Bruxelles**, **Yilai Shu**, chirurgo/genetista **dell'Università Fudan di Shanghai** ha presentato i dati Relativi ai primi cinque bambini da lui curati attraverso terapia genica

Quattro di loro hanno acquisito l'udito nell'orecchio trattato, ma uno no, probabilmente a causa dell'immunità preesistente al tipo di virus utilizzato per trasportare il nuovo DNA nel corpo.

Il chairman della sessione, **Lawrence Lustig**, della **Columbia University** ha commentato la presentazione: *“Come primo passo, questo è enorme.”*

Il nuovo trattamento non aiuterà tutti i sordi. Si applica solo a una causa specifica di sordità alla nascita: un difetto in un gene che produce una proteina chiamata **otoferlina**. L'orecchio interno contiene circa **16.000 cellule ciliate**, così chiamate perché hanno estensioni a pettine che vibrano a diverse frequenze del suono. Senza **otoferlina**, queste cellule non possono trasmettere le **sostanze chimiche** che trasmettono le informazioni al cervello. Questi pazienti, **fondamentalmente**, non hanno un segnale proveniente dalle cellule ciliate.

I difetti del gene dell'**otoferlina** sono la causa di circa **l'1-3% dei casi di sordità congenita** e in Cina si registrano solo circa 900 nuovi casi all'anno, il che significa che la condizione è rara. Ma si prevede che il successo cinese stimolerà i gruppi di ricerca che lavorano sui trattamenti genetici correlati.



Il nuovo trattamento è progettato per aggiungere una copia funzionante del gene dell'**otoferlina**. A causa delle grandi dimensioni del gene, è lungo circa 6.000 nucleotidi, è stato necessario dividerlo in due parti, ciascuna confezionata separatamente in milioni di copie di un virus innocuo. **Shu** quindi ha iniettato nella coclea, utilizzando **adenovirus ingegnerizzati AAV**, le due sezioni del DNA che ricombinandosi ricostituiscono un gene completo in grado di guidare la produzione della **otoferlina**.



*"Questa tecnica di solito non viene eseguita clinicamente, perché il processo di ricombinazione può essere piuttosto inefficiente", ha affermato **Nicole Paulk**, CEO di Siren Biotechnology ed esperta di **virus adeno-associato o AAV**. **Se i dati descritti [sono] veri, allora questo è un risultato fantastico.**"*

**Shu** pensa anche che il suo trattamento possa essere reso più potente. Ma, dice, *l'udito dei bambini è già migliorato, in media, dal non sentire nulla sotto i 95 decibel (forte come una motocicletta) all'udire suoni tra 50 e 55 decibel, più o meno il livello di una normale conversazione...raggiungono, forse dal 60% al 65%, dell'udito normale*

Alcuni dei soggetti trattati sono solo bambini piccoli, che non possono dire nulla ai medici su come siano le loro prime esperienze sonore. Ma i loro genitori stanno vedendo cambiamenti comportamentali. *Secondo Shu*, un bambino, che non aveva mai parlato, ha iniziato a dire "baba"

e “mamma” dopo il trattamento. *Shu* ritiene che l'ideale sarebbe trattare i bambini intorno all'anno di età, un momento chiave per lo sviluppo del linguaggio.

*Yiyi* è il più grande dei bambini trattati, aveva precedentemente ricevuto un impianto cocleare.

Con l'impianto nell'orecchio destro da quando aveva due anni, *Yiyi* aveva già imparato a parlare, anche se sua madre dice che quando lo scollega (il ricevitore e la batteria sono esterni), ***“non riesce a sentire assolutamente nulla”***.

La situazione è cambiata dopo il trattamento, che le è stato applicato nell'altro orecchio. Solo poche settimane dopo *Yiyi* riuscì a sentire naturalmente da quell'orecchio. Sua madre nota che a volte si disconnette l'impianto mentre gioca con i vicini.

*“Quando ho sentito parlare per la prima volta del processo, all'inizio non credevo che fosse reale. Ho chiesto ad alcuni audiologi e anche loro hanno detto che potrebbe non essere reale”,* afferma. Ma dopo aver viaggiato a Shanghai e aver incontrato *Shu* e altri medici, ha deciso di iscrivere sua figlia. *“Non riesco ancora a credere che abbia funzionato”*.



*Shu* ritiene che la terapia genica potrebbe offrire un udito migliore di quello che si può ottenere con un impianto. ***“Gli impianti cocleari sono le protesi neurali di maggior successo mai sviluppate”,*** afferma, ***ma presentano dei limiti. Con un impianto, puoi sentire la musica, ma le sfumature spariscono completamente: si sente solo il ritmo. Sentiamo il vento tra gli alberi e gli uccelli cantare, ma loro non possono. Quindi l'obiettivo di tutti è stato come invertire la perdita dell'udito”***.

La decisione di prendere di mira il tipo specifico di sordità di *Yiyi* non è stata un incidente. Le cellule ciliate uditive rispondono relativamente bene alla terapia genica, assorbendo facilmente nuovo DNA. E non crescono né vengono sostituiti durante la vita di una persona. Questo è il motivo per cui i rumori molto forti possono portare alla perdita permanente dell'udito: possono uccidere le cellule ciliate. Ma significa anche che se un gene sostitutivo viene aggiunto alle cellule, potrebbe rimanere attivo per tutta la vita, anche se *Shu* ammette che non è noto per quanto tempo persisterà l'effetto.

L'apparente successo significa che la squadra cinese ha vinto il primo giro in una gara che coinvolge almeno tre aziende biotecnologiche occidentali. Tra questi c'è ***Akouos***, che l'anno scorso è stata acquisita per 500 milioni di dollari da ***Eli Lilly***, e ***Decibel Therapeutics di Regeneron***. Entrambi hanno attivato studi clinici per terapie geniche mirate anche al gene dell'otoferlina e Decibel ha trattato almeno un paziente

Il lavoro presentato a Bruxelles è stato sponsorizzato da una piccola azienda biotecnologica, la **Shanghai Refreshgene Therapeutics**. Il fondatore dell'azienda, **Nova Liu**, ha affermato che il trattamento dell'udito fa parte di una strategia per sviluppare terapie geniche a prezzi ragionevoli. Questo potrebbe essere il caso dei trattamenti per l'occhio e l'orecchio, poiché l'iniezione della terapia genica in entrambi può richiedere circa un millesimo della quantità di materiale necessario per somministrare tali trattamenti come infusioni endovenose.

Per **Yiyi**, sentire meglio è un fatto sicuramente positivo, ma ci sono alcuni aspetti negativi. La famiglia vive al quindicesimo piano di un condominio, ma nelle vicinanze c'è molto traffico il cui rombo arriva fino alle finestre. Prima della terapia genica, **Yiyi** scollegava l'impianto e durante la notte non sentiva nulla. Ora, dice sua madre, "si lamenta che è troppo rumoroso".



Allegato

## OTOFERLINA

**Una mutazione del Gene dell'otoferlina OTOF (DFNB9) provoca DFNB9, una forma non sindromica di sordità,**

Le mutazioni del gene dell'otoferlina sono responsabili della forma recessiva DFNB9. L'otoferlina è una proteina che interviene nella regolazione delle vescicole presinaptiche delle cellule cigliate interne. La sordità è prelinguale di grado severo- profondo. La particolarità di questa forma di sordità è che essa può presentarsi come una neuropatia auditiva, con otoemissioni acustiche OAE inizialmente conservate e ABR assente. Starr [67] ha per primo utilizzato il termine di neuropatia uditiva per designare nell'adulto delle sordità, spesso bilaterali, associate a un'alterazione dei potenziali evocati uditivi (PEU) contrastante con la presenza di otoemissioni acustiche (OEA) normali. Queste forme sono oggi meglio conosciute nell'adulto e nel bambino e giustificano la valutazione delle otoemissioni per individualizzarle nel corso della gestione di una sordità di percezione. La frequenza di disordini uditivi attribuiti a neuropatia è relativamente elevata fra i casi di neonati in terapia intensiva (1%). Fra questi neonati la prevalenza di otoferlina anomala è probabilmente minoritaria. L'importanza di una diagnosi molecolare nei casi di "neuropatia uditiva" risiede nel fatto che i casi con anomala otoferlina sono dei candidati all'impianto cocleare con prospettive di un ricupero funzionale comparabile a qualsiasi altra cocleopatia. Mutazioni in questo gene sono la causa di

non sindromica sordità neurosensoriale DFNB9 recessiva. La forma breve della proteina codificata ha 3 C2 domini, un unico transmembrana dominio carbossi-terminale trovato anche in fattore spermatogenesi di *C.elegans*, RES-1, e anche in disferlina umana, mentre la forma lunga ha sei domini C2..

### L'OTOFERLINA SINAPTICA ALTERATA E' CAUSA DI SORDITA'

Ruolo dell'otoferlina nella fisiologia sinaptica, è un'ulteriore prova dei rapporti fra questi studi di base e la patologia. Un gruppo di ricerca guidato da Roux, nel laboratorio di Christine Petit, identificando il ruolo dell'otoferlina nelle sinapsi delle cellule ciliate della coclea (IHC), ha definito il processo alla base della grave forma di sordità causata da alterazioni nel gene di questa proteina (Roux I., *et al.*, Otofelin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell* 127, 277-289, 2006).

Per convertire la complessa struttura del suono in impulsi nervosi, le IHC devono trasmettere eguali al nervo acustico secondo una codifica di alta precisione; in tali processi sembrano avere un ruolo importante le loro speciali giunzioni note come ribbon synapses, la cui configurazione molecolare è oggetto di intensi studi, ma la cui fisiologia è ancora scarsamente nota. Impiegando l'immunofluorescenza, Roux e i suoi colleghi hanno localizzato l'otoferlina nelle IHC e, successivamente, con l'ausilio della *immunogold electron microscopy*, hanno condotto uno studio ultrastrutturale molto dettagliato, che ha consentito loro di precisarne la sede in corrispondenza delle vescicole sinaptiche.

I topi privi di ofoferlina sono sordi e, in seguito a stimolazione acustica, non presentano le normali risposte dei neuroni del tronco encefalico (*potenziali evocati*), sebbene abbiano una struttura sinaptica normale. Dunque, i ricercatori hanno ipotizzato che il ruolo della proteina fosse da ricercarsi in processi legati alla dinamica delle vescicole sinaptiche.

Le prime indagini hanno mostrato che il numero di vescicole sinaptiche presenti nei terminali delle IHC dei topi con deficit di ofoferlina, era simile a quello dei topi di controllo e che la localizzazione presso i siti della membrana presinaptica risultava del tutto normale.

Quando i ricercatori hanno valutato la presenza della normale esocitosi conseguente all'ingresso di calcio nelle IHC dei topi con deficit di ofoferlina, hanno rilevato una grossa anomalia, ossia la quasi completa assenza di questa risposta.

Il ruolo dell'otoferlina, dunque, sembra consistere nel controllo dell'ultimo stadio del processo di esocitosi delle vescicole contenenti il neurotrasmettitore. Roux e collaboratori hanno allora cercato di definire con maggiore precisione il meccanismo dell'azione della molecola da loro studiata. Poiché la sequenza aminoacidica del polipeptide corrisponde a quella di una proteina di membrana legante il calcio, hanno valutato questa possibilità, trovandone poi conferma: l'otoferlina lega il  $Ca_{2+}$  necessario per l'esocitosi.

Gli esperimenti di legame *in vitro* e l'immunoprecipitazione hanno rivelato che l'otoferlina interagisce con i componenti dell'apparato di secrezione sinaptica mediante una modalità calcio-dipendente.

E' stato riportato che l'esocitosi indotta da depolarizzazione è linearmente dipendente dall'entità del flusso in entrata del  $Ca_{2+}$  presinaptico, cosa che, nel caso delle cellule IHC, vuol dire diretto rapporto fra intensità del suono ed esocitosi.

Christine Petit e colleghi propongono che la capacità dell'otoferlina di legare il  $Ca_{2+}$ , e la dipendenza dal legame col calcio per l'interazione con l'apparato secretorio, consentono a questa proteina di agire da *trigger* del  $Ca_{2+}$ , inducendo una rapida e precisa esocitosi in risposta alle vibrazioni sonore che depolarizzano le IHC. Infine, suggeriscono che l'otoferlina sostituisca le sinaptotagmine I e II che non sono state trovate nelle ribbon synapses delle cellule IHC.

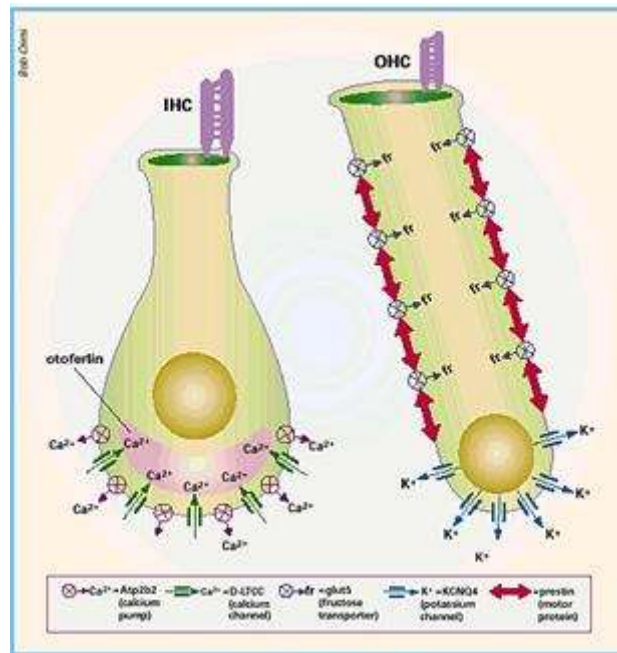


Fig. 1. illustrazioni schematiche di una cellula ciliata interna (IHC, a forma di pallone) e una cellula ciliata esterna (OHC, cilindrico) che mostra posizioni nella membrana basolaterale prodotti genici funzionalmente importanti. Le cellule ciliate interne sono veri recettori sensoriali che segnalano la ricezione del suono al cervello attraverso sinapsi afferenti al nervo uditivo. E' quindi forse non è sorprendente trovare difetti dell'udito associati con le molecole che possono influenzare la funzione di rilascio del trasmettitore sinaptico di queste cellule: dei canali del calcio di tipo L voltage-gated per consentire flusso di calcio, la pompa del calcio Atp2b2 e l'otoferlin. Le cellule ciliate esterne hanno una funzione motoria localizzata all'interno della coclea con cui si pensa che Prestin e possibilmente Glut5 siano associati. Il canale del potassio KCNQ 4 è probabilmente coinvolto nel riciclaggio del potassio. Il pattern di espressione diversa di questi geni nelle cellule ciliate interne rispetto alle cellule ciliate esterne enfatizza le diverse funzioni nelle risposte cocleari.

## Quale sono i cambiamenti nel gene *OTOF* ?

### Sordità sindromica - causata da mutazioni nel gene *OTOF*

sono stati identificati Almeno 16 mutazioni nel gene *OTOF* nei pazienti con una forma di sordità non sindromica (perdita di udito senza segni e sintomi correlati che interessano altre parti del corpo) ha chiamato DFNB9. Le persone con queste mutazioni hanno un tipo di perdita uditiva chiamata neuropatia, che si verifica quando il suono non viene trasmesso correttamente dall'orecchio interno al cervello dell'udito.

Alcune mutazioni nel gene *OTOF* determinano una produzione di otoferlin anormalmente ridotta, versione non funzionali di otoferlin o impediscono alle cellule la produzione di una qualsiasi di questa proteina. Altre mutazioni genetiche probabilmente alterano la struttura 3-dimensionale dell' otoferlin, che compromette la sua capacità di legarsi al calcio.

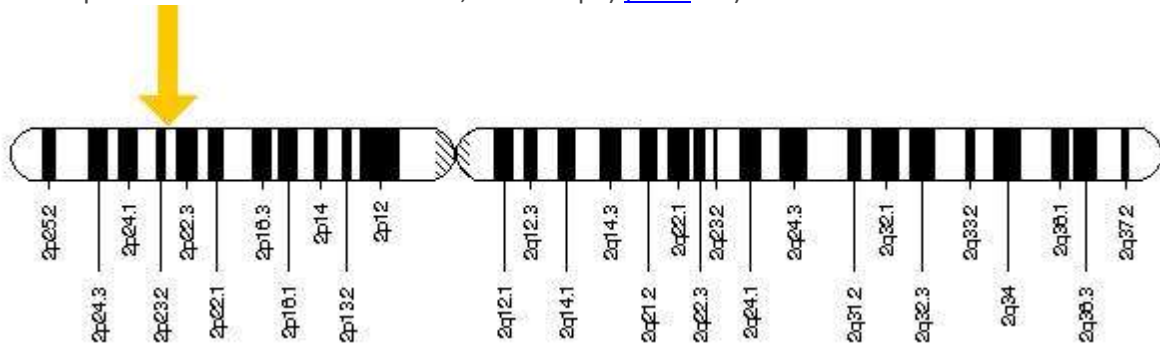
Una particolare mutazione *OTOF* è una causa comune della sordità non sindromica nella popolazione spagnola. Questa mutazione sostituisce un blocco di costruzione amminoacido, la glutammina, con un segnale che interrompe la produzione di proteine prematuramente alla posizione 829 nella proteina otoferlin (scritto come Gln829Ter o Q829X). La mutazione Q829X provoca una versione anormalmente corto di otoferlin , che interrompe la funzione della proteina e porta alla perdita dell'udito.

### Dove si trova il gene *OTOF*?

Citogenetica Località: 2p23.1

Posizione molecolare sul cromosoma 2: coppie di basi 26.457.203 a 26,558,698

(Homo sapiens Annotazione di uscita 107, GRCh38.p2) ([NCBI](#) )



Il gene *OTOF* si trova sul breve (p) braccio del [cromosoma 2](#) alla posizione 23.1.

Più precisamente, il gene *OTOF* si trova dalla coppia di basi 26.457.203 di paia di basi 26.558.698 sul cromosoma 2.



# TERESINA

Teresina, 80 anni, ricoverata in una struttura di residenza assistita si presenta per la valutazione di un dolore "profondo" lentamente progressivo alle cosce e agli stinchi che dura da 3 a 4 mesi.

Nota anche disagio e ispessimento della punta delle dita.

**Ha ipertensione, diabete di tipo 2, demenza** lieve e una storia di fumo di sigaretta di 40 pacchetti-anno. L'esame dei sistemi identifica affaticamento, tosse che occasionalmente produce una piccola quantità di sangue e 9,1 kg di perdita di peso involontaria negli ultimi 6 mesi.

All'esame, Teresina è apiretica e presenta segni vitali normali.

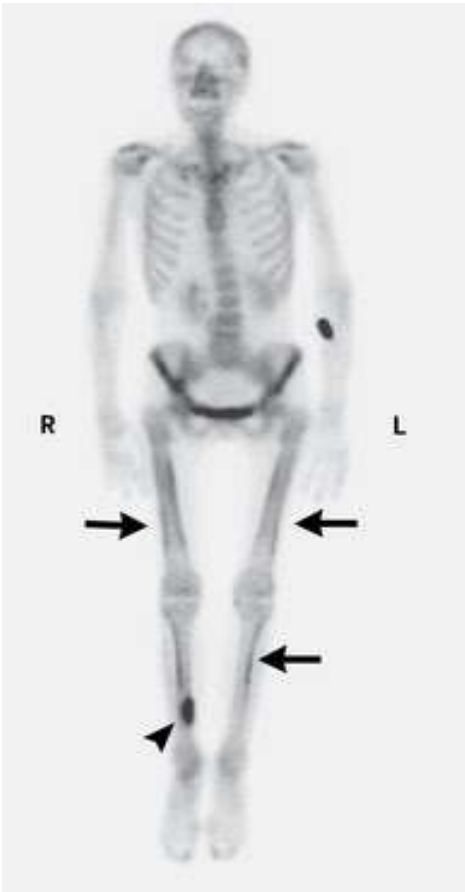
Gli esami del cuore, dei polmoni e dell'addome non sono significativi. Né le cosce né gli stinchi sono dolenti al tatto e c'è una gamma completa di movimento sia delle ginocchia che delle caviglie.

È presente un **evidente ippocratismo digitale** delle dita con allargamento del bulbo sulla punta delle dita e lieve eritema sul letto ungueale.

L'esame di laboratorio rivela una **conta leucocitaria e piastrinica normale**, nonché un livello di **creatinina sierica normale** per l'età del paziente e risultati normali dei test di funzionalità epatica.

Il paziente ha un **ematocrito del 32%** (intervallo di riferimento, 36–46), una velocità di sedimentazione eritrocitaria di 62 mm/ora (1–25) e un livello di proteina C-reattiva di **18 mg/litro (0,08–3,10)**.

Una radiografia del torace è normale. La scintigrafia ossea:





**Quale dei seguenti test è più appropriato per Teresina?**

- » 1. Analisi delle urine
- » 2-TC del torace
- » 3-Ecocardiogramma
- » 4-Test di funzionalità polmonare
- » 5- TC dell'addome