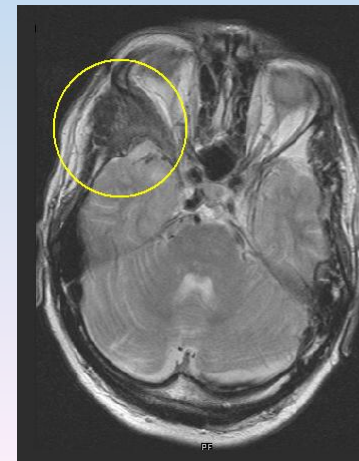


Progetto di terapia genica nella cura della

DISPLASIA

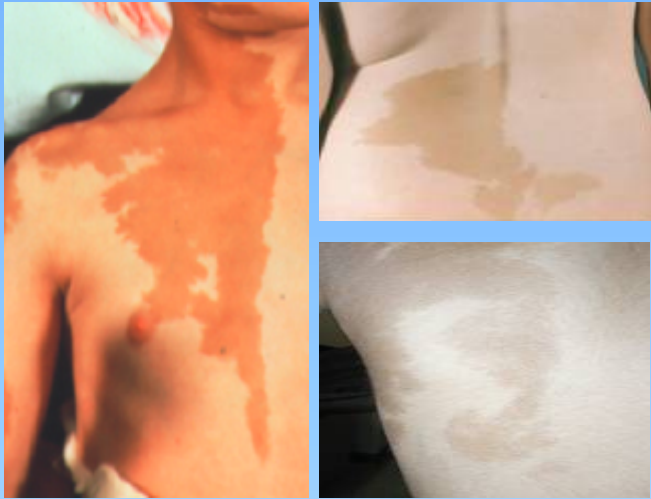
F O



Mariano Martina
Papacci Francesca
Pecce Valeria
Proietto Marco

Anno Accademico 2010/2011

Macchie cutanee



Iperfunzione endocrina multipla



Displasia Fibrosa Ossea



Mixomi Intramuscolari
(Sindrome di Mazabraud)

- Formazione di tumori benigni intramuscolari

Sindrome di
Mc Cune -
Albright

Macchie cutanee



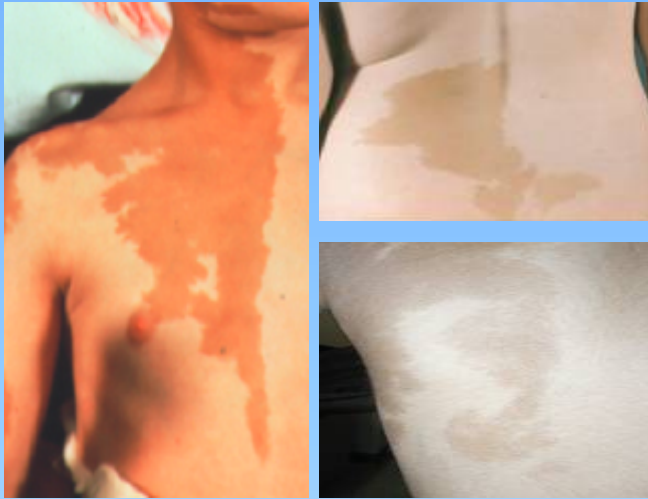
- Macchie più scure a livello delle pieghe cutanee
- Forma e dimensioni variabili
- Non causano problemi medici

Iperfunzione endocrina multipla



- Pubertà precoce
- Ipertiroidismo
- Gigantismo
- Sindrome di Cushing

Macchie cutanee



Iperfunzione endocrina multipla



Displasia Fibrosa Ossea



Sindrome di
Mc Cune -
Albright

Mixomi Intramuscolari
(Sindrome di Mazabraud)

- Formazione di tumori benigni intramuscolari

Displasia Fibrosa Ossea



Best Practice & Research Clinical Rheumatology
Vol. 22, No. 1, pp. 55–69, 2008
doi:10.1016/j.berh.2007.11.004
available online at <http://www.sciencedirect.com>



Fibrous dysplasia of bone and McCune–Albright syndrome

Roland D. Chapurlat* MD, PhD

Professor of Rheumatology

INSERM Research Unit 831, Université de Lyon, and National Reference Centre for Fibrous Dysplasia of Bone, Department of Orthopaedics, Rheumatology and Bone Diseases, Hôpital E Herriot, Lyon, France

Philippe Orcel MD, PhD

Professor of Rheumatology

Université Paris Diderot (Paris 7), and National Reference Centre for Constitutive Bone Diseases, Department of Orthopaedics, Rheumatology and Bone Diseases, Hôpital Lariboisière (AP-HP), Paris, France

- Crescita di tessuto fibroso nell'ambito del tessuto osseo
- Mono-ostica: riguarda un solo osso, 60% pz
- Poli-ostica: riguarda più ossa (tendenza all'asimmetria), 40% pz
- Colpisce principalmente le ossa lunghe e cranio-facciali



**Associazione Europea
Amici della Sindrome di Mc Cune-Albright
ed altre malattie genetiche rare**

<http://www.eamas.net/main.php?modulo=lasindrome>

MANIFESTAZIONI DELL'ETA' PEDIATRICA

- Sindrome di Cushing neonatale
- Menarca precoce nelle femmine
- Cisti ovariche ricorrenti
- Displasia fibrosa delle ossa lunghe con fratture, deformità e dolore.

MANIFESTAZIONI NELL'ADOLESCENZA

- Progressione della displasia fibrosa con coinvolgimento cranico
- Iperteroidismo
- Gigantismo

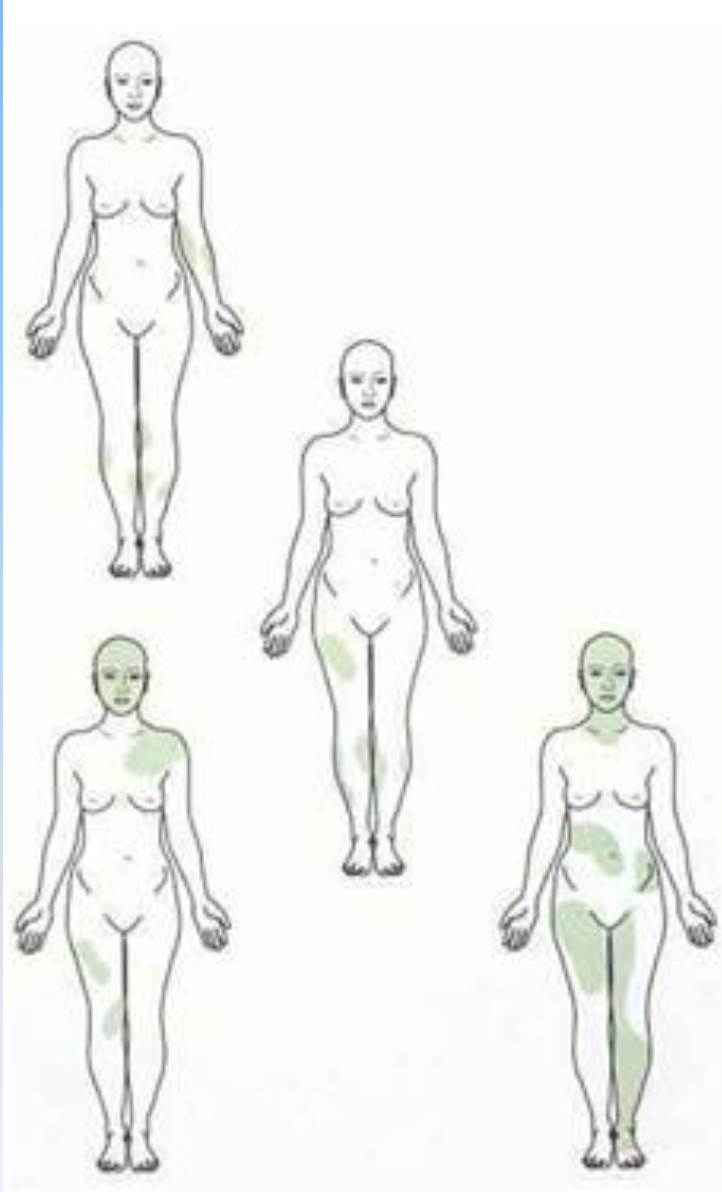
MANIFESTAZIONI DELL'ETA' ADULTA

- Esiti e conseguenze della displasia fibrosa
- Iperteroidismo
- Alterazioni mestruali, presenza di cisti ovariche
- Aumentato rischio di neoplasie ossee, mammarie e tiroidee

Altre manifestazioni

- Epatiti e pancreatici
- Tachiaritmie cardiache
- Polipi intestinali
- Ematopoiesi Extramidollare
- Iperplasia timica
- Disordini dello sviluppo neurologico

Cosa causa il mosaicismo?



Il mosaicismo è dato dalla mutazione che avviene a livello post zigotico; i progenitori che derivano dalle cellule embrionali mutate si distribuiscono in diversi organi causando difetti diversi nei malati.

Cosa causa la displasia fibrosa?

INDIVIDUI MALATI



Associazione Europea
Amici della Sindrome di Mc Cune-Albright
ed altre malattie genetiche rare

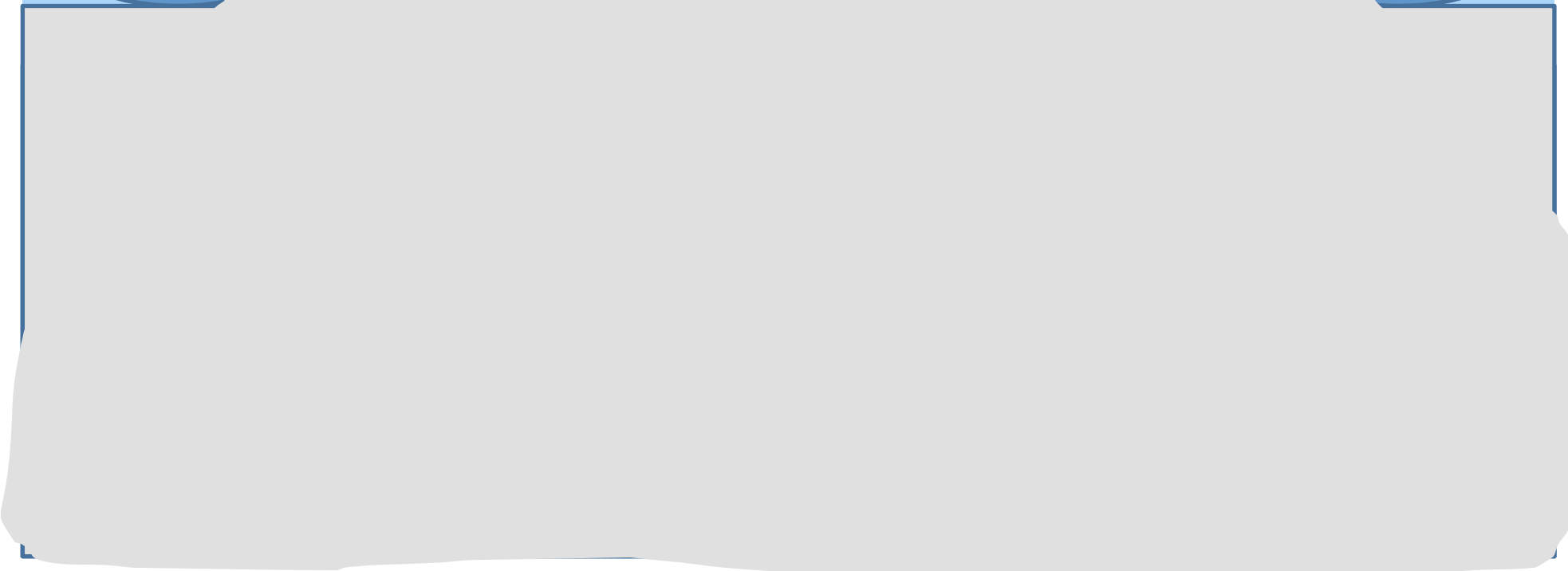
<http://www.eamas.net/main.php?modulo=lasindrome>

Osteoblasti

Osteoblasti

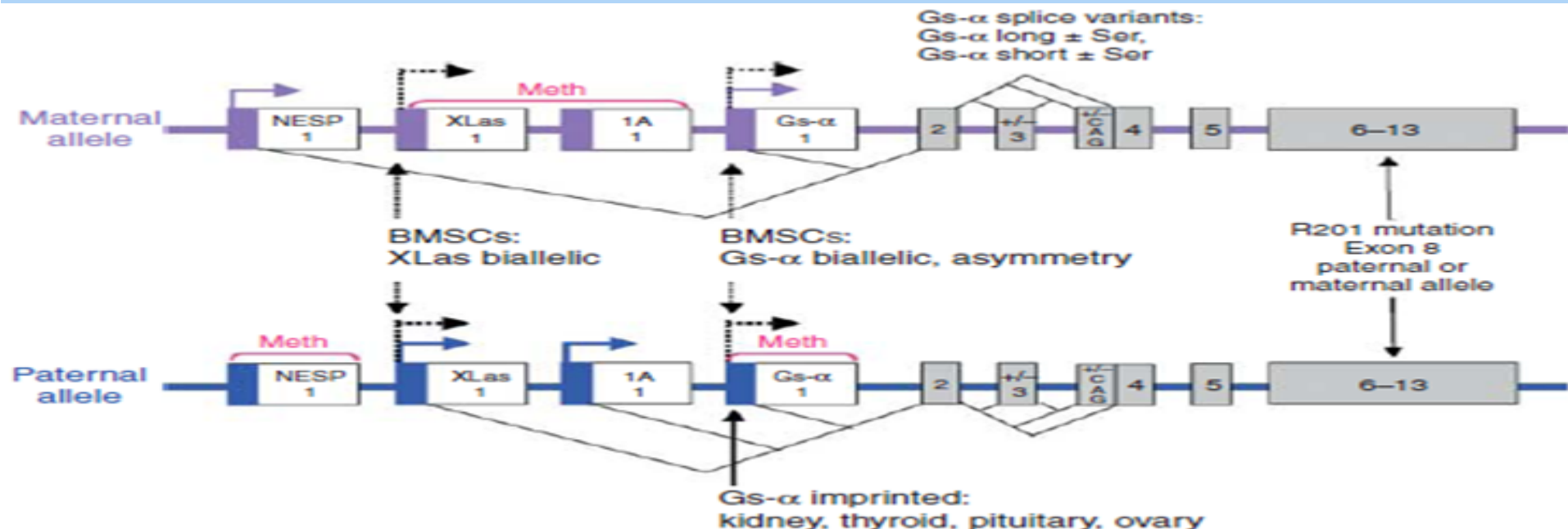
Osteoblasti

Osteoblasti



Cosa causa la displasia fibrosa?

- Mutazione puntiforme del gene GNAS.
- GNAS produce 4 trascritti (Nesp55 , XLas , A/B , Gα(s)) che hanno in comune gli esoni dal 2 al 13.
- Ogni trascritto utilizza un proprio promotore, e tramite splicing alternativo elimina l'esone 1 corrispondente ad un altro trascritto
- Differenti pattern di metilazione negli alleli paterni o materni



J Clin Endocrinol Metab. 2004 May;89(5):2107-13.

Activating Gsalpha mutations: analysis of 113 patients with signs of McCune-Albright syndrome--a European Collaborative Study.

Lumbroso S, Paris F, Sultan C; European Collaborative Study.

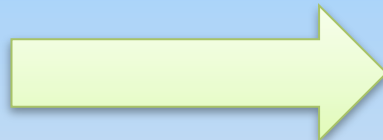
Service d'Hormonologie, Hôpital Lapeyronie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Montpellier and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Montpellier, France 34295.

POOL AFFETTO

98 ragazze

15 ragazzi

113



49 ragazzi (43%) mostrano mutazioni in GNAS

34 mostrano una mutazione

R201H cioè Arg -> Hys cioè Basico -> Basico

15 mostrano una mutazione

R201C cioè Arg -> Cys cioè Basico -> Polare

**Tutti i pazienti mostrano mutazioni
missenso dell'amminoacido R201**

Region 201
 /gene="GNAS"
 /gene_synonym="GNAS1"
 /gene_synonym="GSP"
 /region_name="Variant"
 /experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
 /note="R -> C (in MAS and somatotrophinoma). /FTId=VAR_017843."

Region 201
 /gene="GNAS"
 /gene_synonym="GNAS1"
 /gene_synonym="GSP"
 /region_name="Variant"
 /experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
 /note="R -> G (in MAS). /FTId=VAR_017844."

Region 201
 /gene="GNAS"
 /gene_synonym="GNAS1"
 /gene_synonym="GSP"
 /region_name="Variant"
 /experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
 /note="R -> H (in MAS, somatotrophinoma and AIMAH). /FTId=VAR_017845."

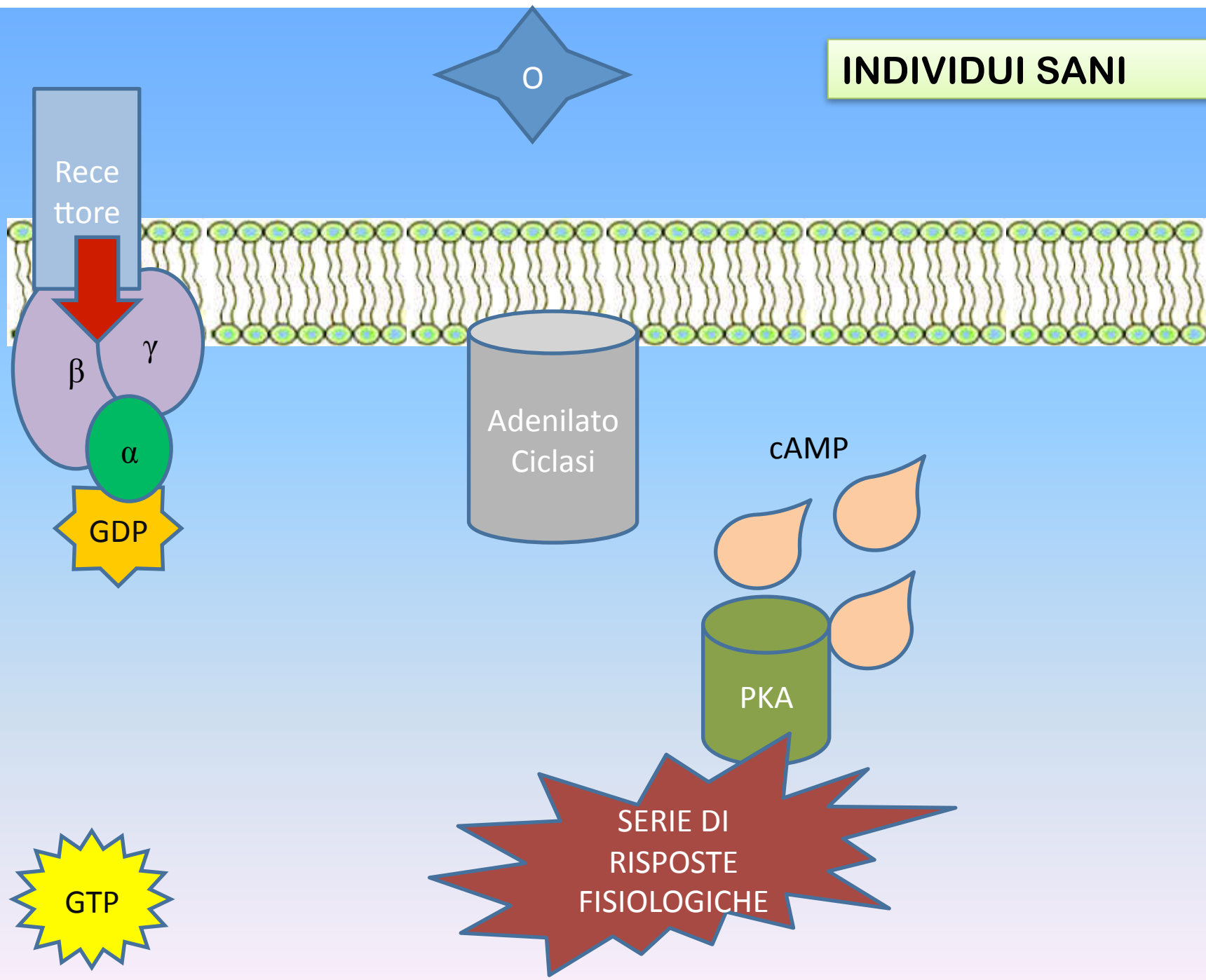
Region 201
 /gene="GNAS"
 /gene_synonym="GNAS1"
 /gene_synonym="GSP"
 /region_name="Variant"
 /experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
 /note="R -> L (in non-MAS endocrine tumors). /FTId=VAR_017846."

Region 201
 /gene="GNAS"
 /gene_synonym="GNAS1"
 /gene_synonym="GSP"
 /region_name="Variant"
 /experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
 /note="R -> S (in AIMAH, pituitary tumor and polyostotic fibrous dysplasia). /FTId=VAR_017846."

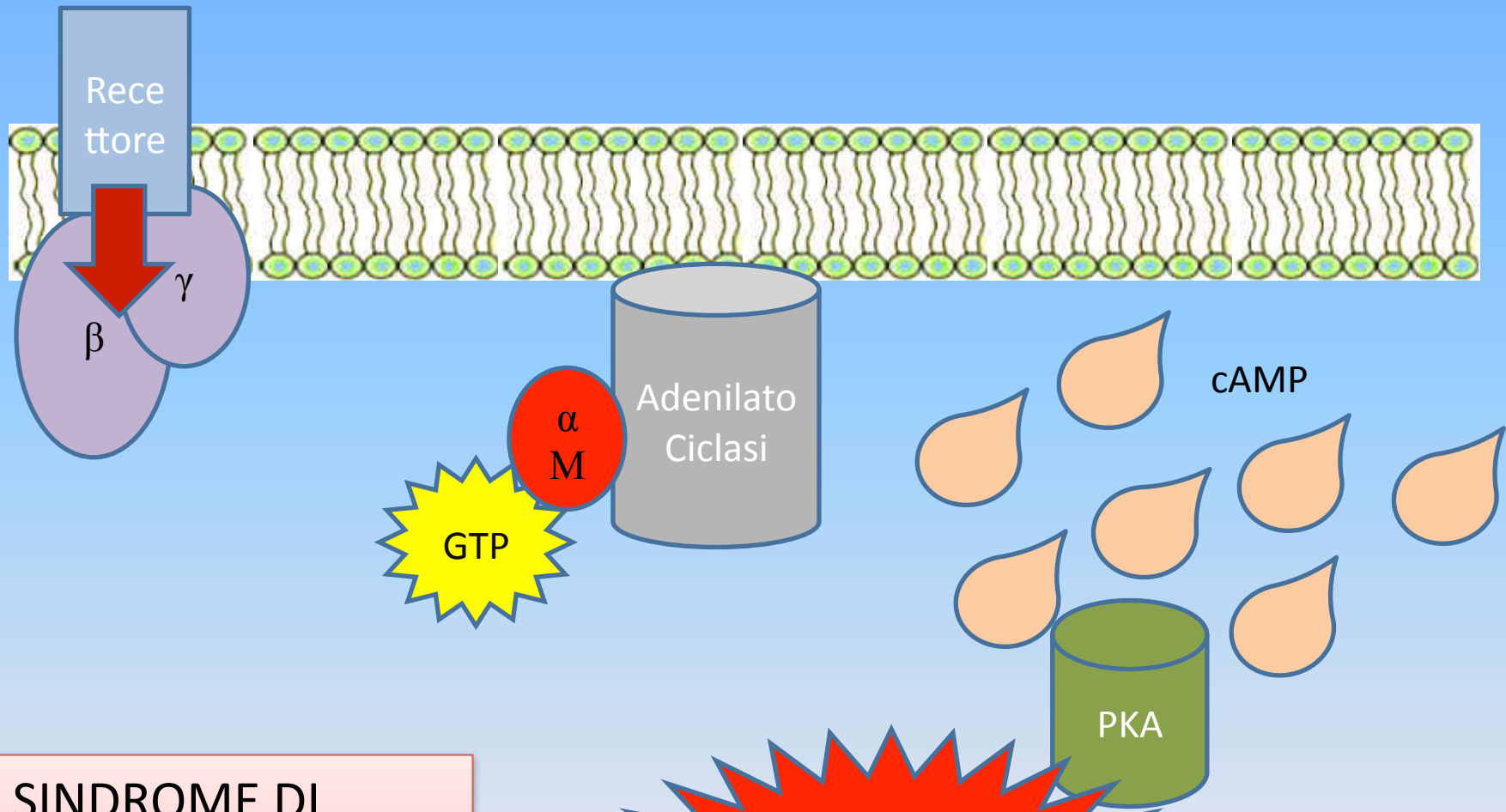
Site 201
 /gene="GNAS"
 /gene_synonym="GNAS1"
 /gene_synonym="GSP"
 /site_type="modified"
 /inference="non-experimental evidence, no additional details recorded"
 /note="ADP-ribosylarginine; by cholera toxin (By similarity)."

Da una analisi bioinformatica si nota come il particolare residuo R201 possa mutare in vario modo, originando una serie di disturbi

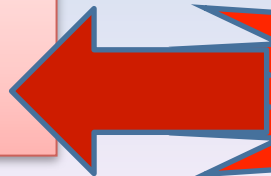
INDIVIDUI SANI



INDIVIDUI MALATI



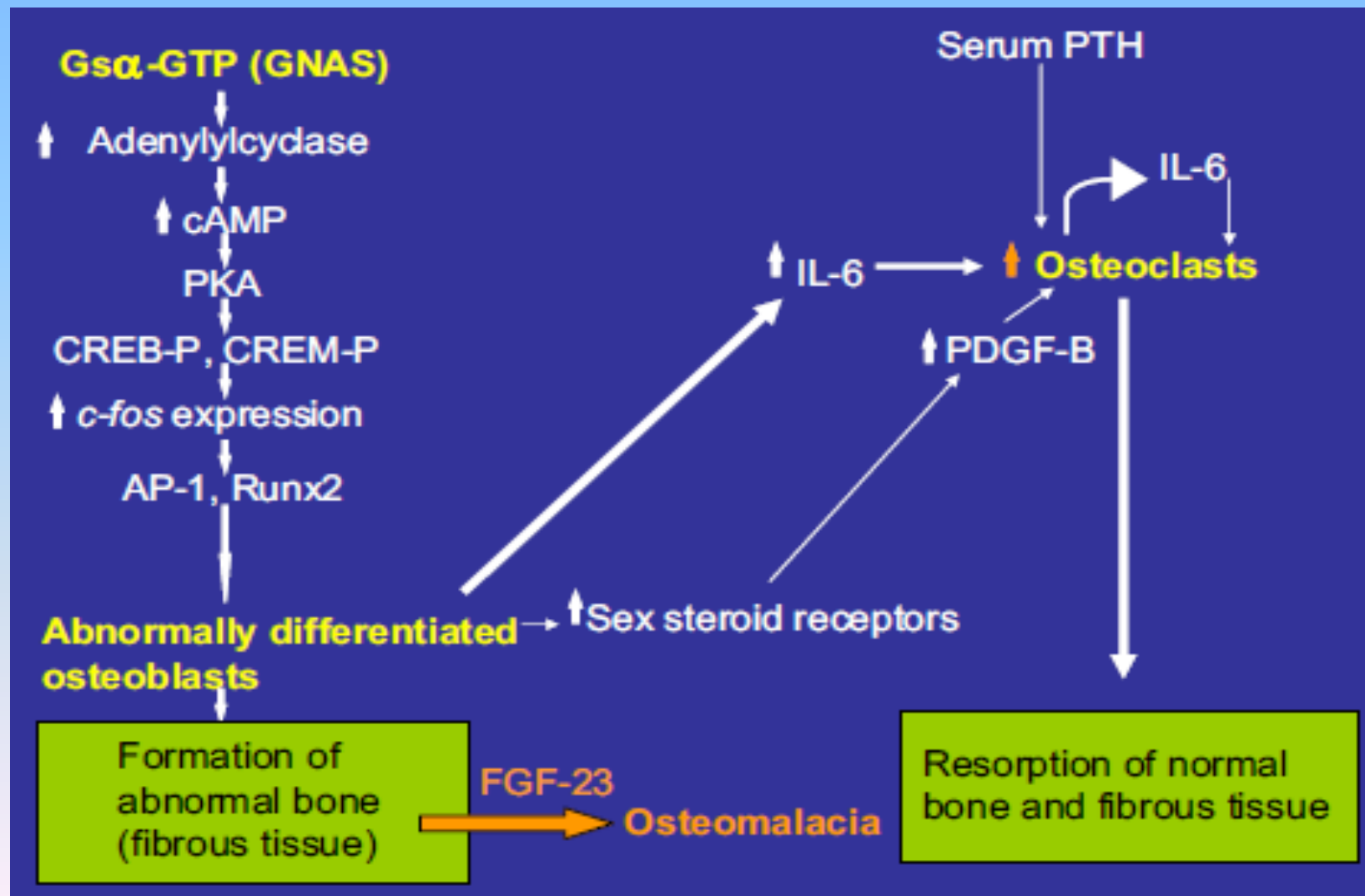
SINDROME DI
MC CUNE e
ALBRIGHT



**DEREGOLAZIONE
RISPOSTE
FISILOGICHE**

Fibrous dysplasia of bone and McCune–Albright syndrome

Roland D. Chapurlat · Philippe Orcel





- 1937: McCune and Bruch

- Anni '60

Descr

Helv P

MCCU

POLYD

ERNAM

Diagn

- Anni '70

- Anni '90

Eziopatogenesi:
Genetica

- possibile ruolo della G protein
- possibile mutazione attivante del gene GNAS1
- identificazione di 1 mutazione attivante del gene GNAS1
- identificazione della stessa mutazione attivante del gene GNAS1 su tessuto affetto da BFD
- varie manifestazioni endocrine e non endocrine associate alla mutazione attivante del gene GNAS1

Patologia

- anomalie nella formazione dell'osso della BFD in MAS
- ruolo della IL 6 nella BFD

Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jun 1; 89(11): 5152-6.

Identification of a mutation in the gene encoding the alpha subunit of the stimulatory G protein of adenylyl cyclase in McCune-Albright syndrome.

Schwindinger WF, Francomano CA, Levine MA.

J Pathol. 1999 Jan; 187(2): 249-58

The histopathology of fibrous dysplasia of bone in patients with activating mutations of the Gs alpha gene: site-specific patterns and recurrent histological hallmarks.

Riminucci M, Liu B, Corsi A, Shenker A, Spiegel AM, Robey PG, Bianco P

J Bone Miner Res. 1999 Nov; 14(11): 1987-9.

A novel GNAS1 mutation, R201G, in McCune-albright syndrome.

Riminucci M, Fisher LW, Majolagbe A, Corsi A, Lala R, De Sanctis C, Robey PG, Bianco P.

- bisfosfonati

Med Klin (Munich). 1998 Jun 15;93(6):352-9 Effect of pamidronate on clinical symptoms and bone metabolism in fibrous dysplasia and McCune-Albright syndrome. Pfeilschifter J, Ziegler R



Anni 2000

Perdita renale di fosfati

J Clin Invest. 2003 Sep; 112(5): 683-92.

FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting.
Riminucci M, Collins MT, Fedarko NS, Cherman N, Corsi A, White KE, Waguespack S,
Gupta A, Hannon T, Econs MJ, Bianco P, Gehron Robey P.

La genetica

Mol Pathol. 2002 Feb; 55(1): 58-60.

An R201H activating mutation of the GNAS1 (G α) gene in a corticotroph pituitary adenoma.



Riminucci M, Collins MT, Lala R, Corsi A, Matarazzo P, Gehron Robey P, Bianco P.

- trattamento con bisfosfonati nelle forme lievi, a scopo preventivo

J Pediatr Orthop. 2002 Mar-Apr; 22(2): 255-60.

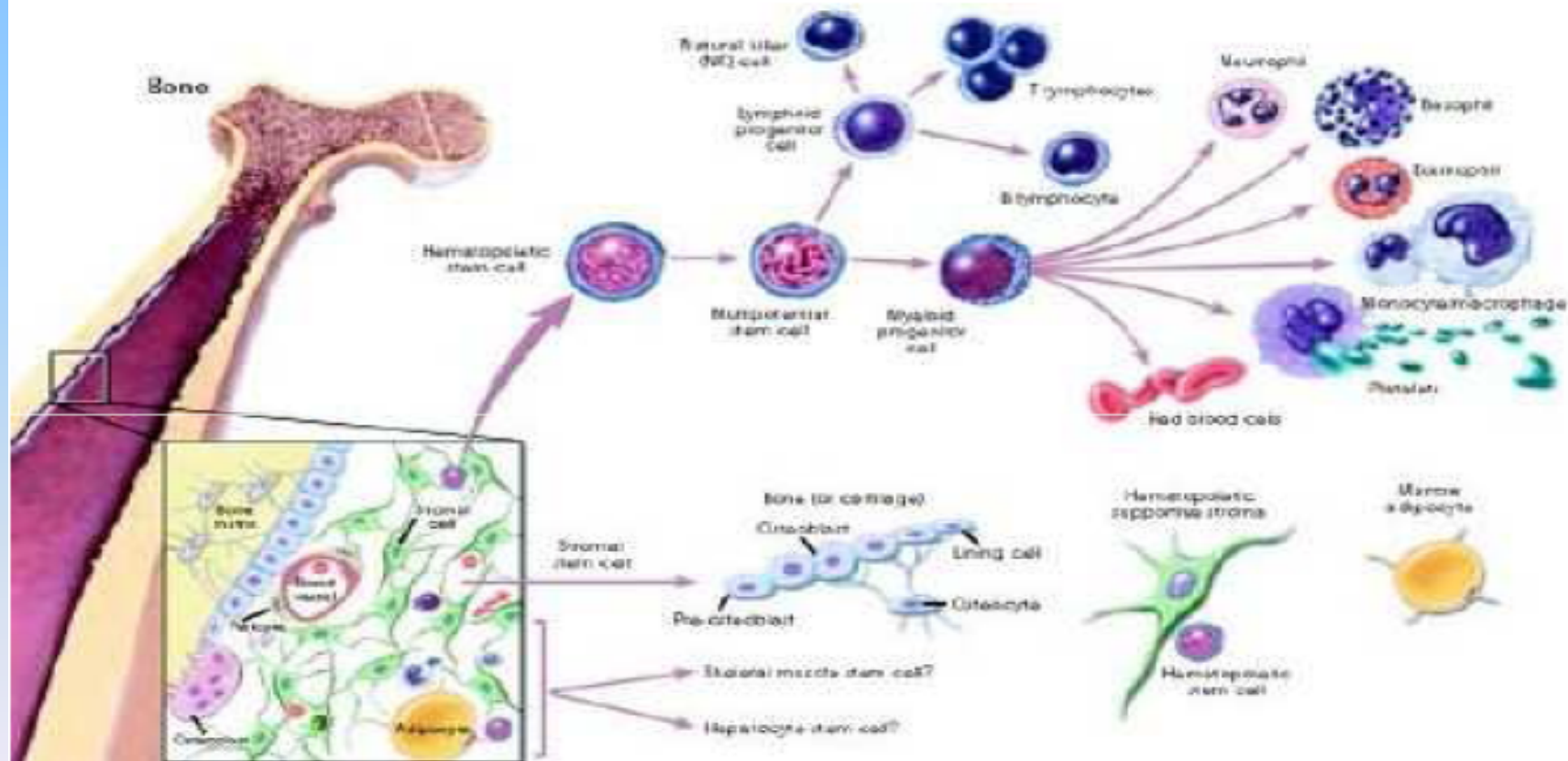
Intramedullary rodding and bisphosphonate treatment of polyostotic fibrous dysplasia associated with the McCune-Albright syndrome.

O'Sullivan M, Zacharin M

	201 Arg 	 201 X	Cure disponibili
IL-6	Secreta dagli osteoblasti per stimolare il differenziamento degli osteoclasti	Ipersecrezione causa iperproduzione di osteoclasti che indebolisce osso e favorisce i rimodellamenti	Bifosfonati per frenare azione degli osteoclasti
PTH	Aumenta mobilità del calcio osseo	Iperproduzione indebolisce osso	Diidrossivitamina D3 regola livello di calcio
FGF-23	Regola la perdita di fosfati nei reni	Iperproduzione indebolisce osso a causa di eccessiva perdita di fosfato	Fosfati per recuperare le quantità perse
C-fos	Protoncogene inattivo	Alti livelli di cAMP attivano protoncogene	//

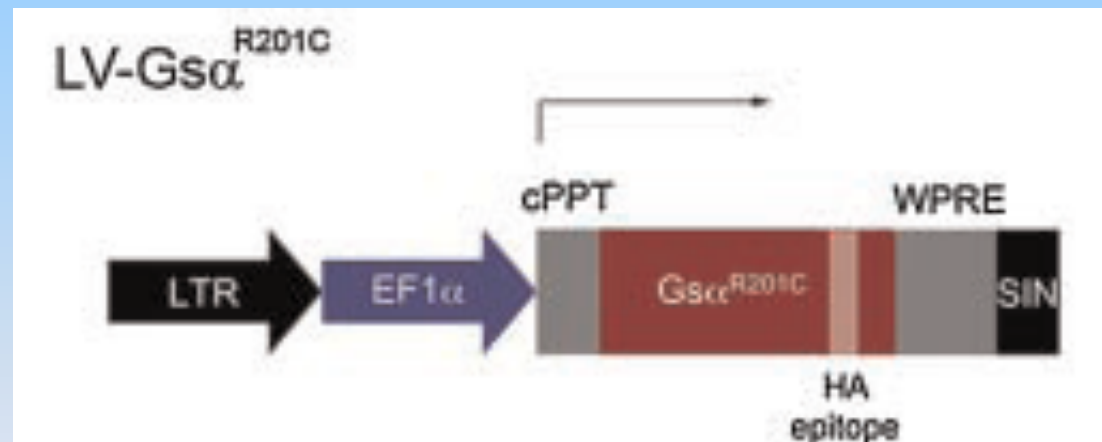
Cellule staminali stromali

Bone marrow stromal stem cells



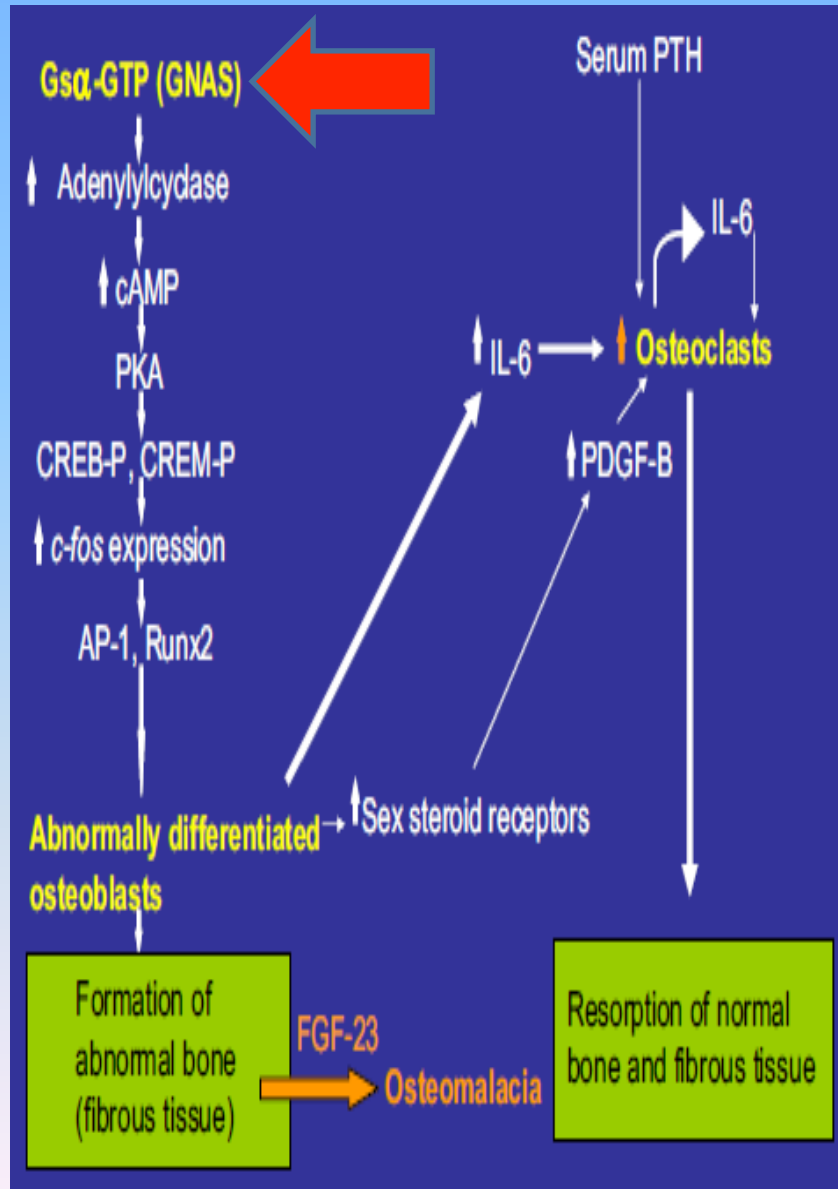
Transfer, Analysis, and Reversion of the Fibrous Dysplasia Cellular Phenotype in Human Skeletal Progenitors

Stefania Piersanti,^{1,3} Cristina Remoli,^{1,2} Isabella Saggio,^{1,3,4} Alessia Funari,^{1,2} Stefano Michienzi,^{1,2} Benedetto Sacchetti,^{1,2} Pamela Gehron Robey,⁵ Mara Riminucci,^{1,2} and Paolo Bianco^{1,2}

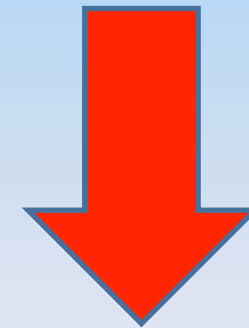


Provided by L.Naldini

TERAPIA

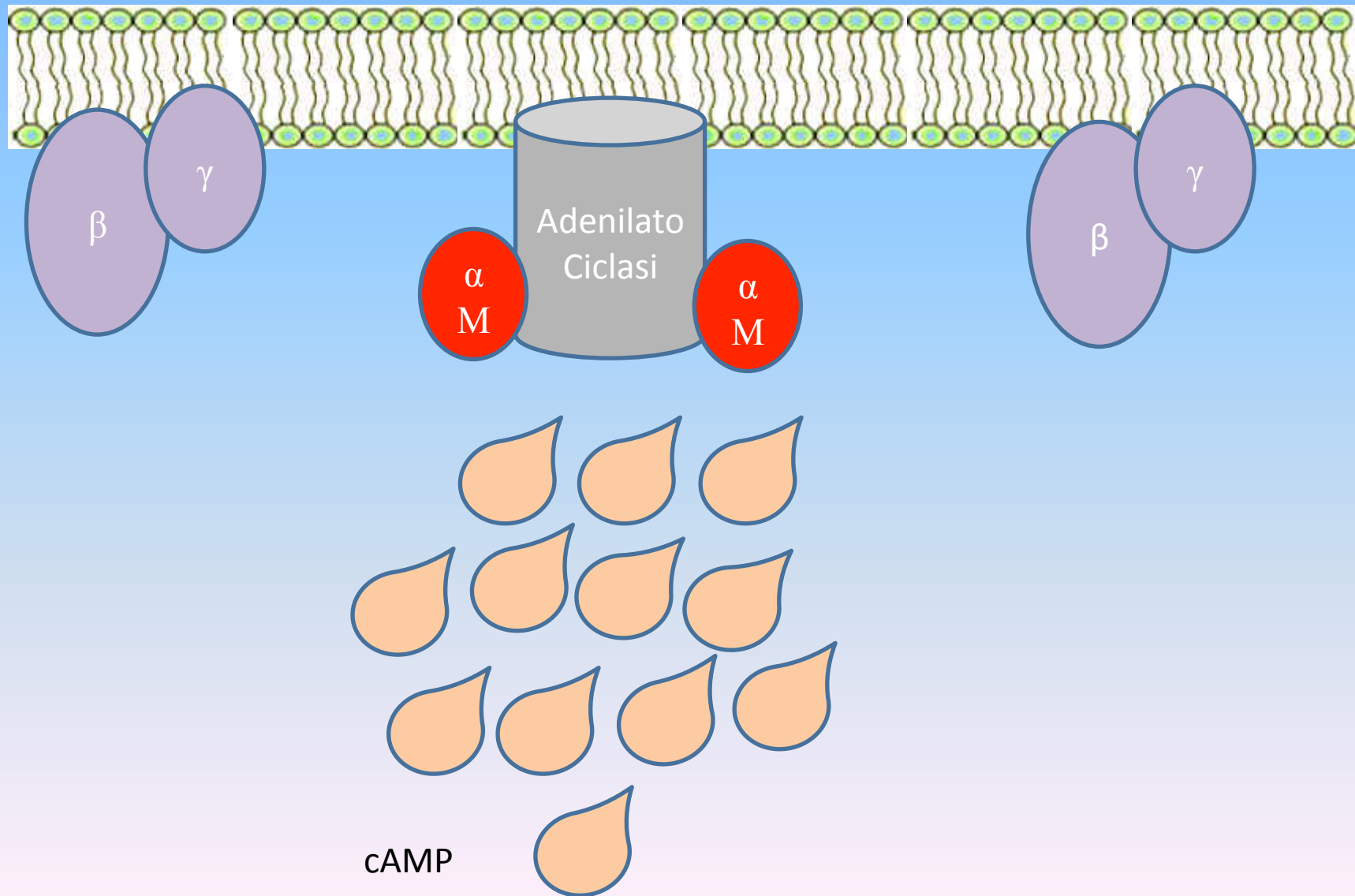


1. E' impossibile procedere con cure convenzionali vista l'enorme quantità di processi che vengono deregolati.
2. E' impossibile curare una ad una le singole manifestazioni della malattia.
3. E' necessaria una cura adatta ad ogni tipo di paziente vista l'eterogeneità di insorgenza della malattia



BISOGNA AGIRE A MONTE DIRETTAMENTE
SULLA SUBUNITA' G α mutata

DIFETTO



MIM ID *139310

GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN, ALPHA-INHIBITING ACTIVITY POLYPEPTIDE 1; GNAI1

Alternative titles; symbols

G PROTEIN, ALPHA-INHIBITING 1; Gi

INHIBITORY G PROTEIN

ADENYLATE CYCLASE INHIBITORY PROTEIN

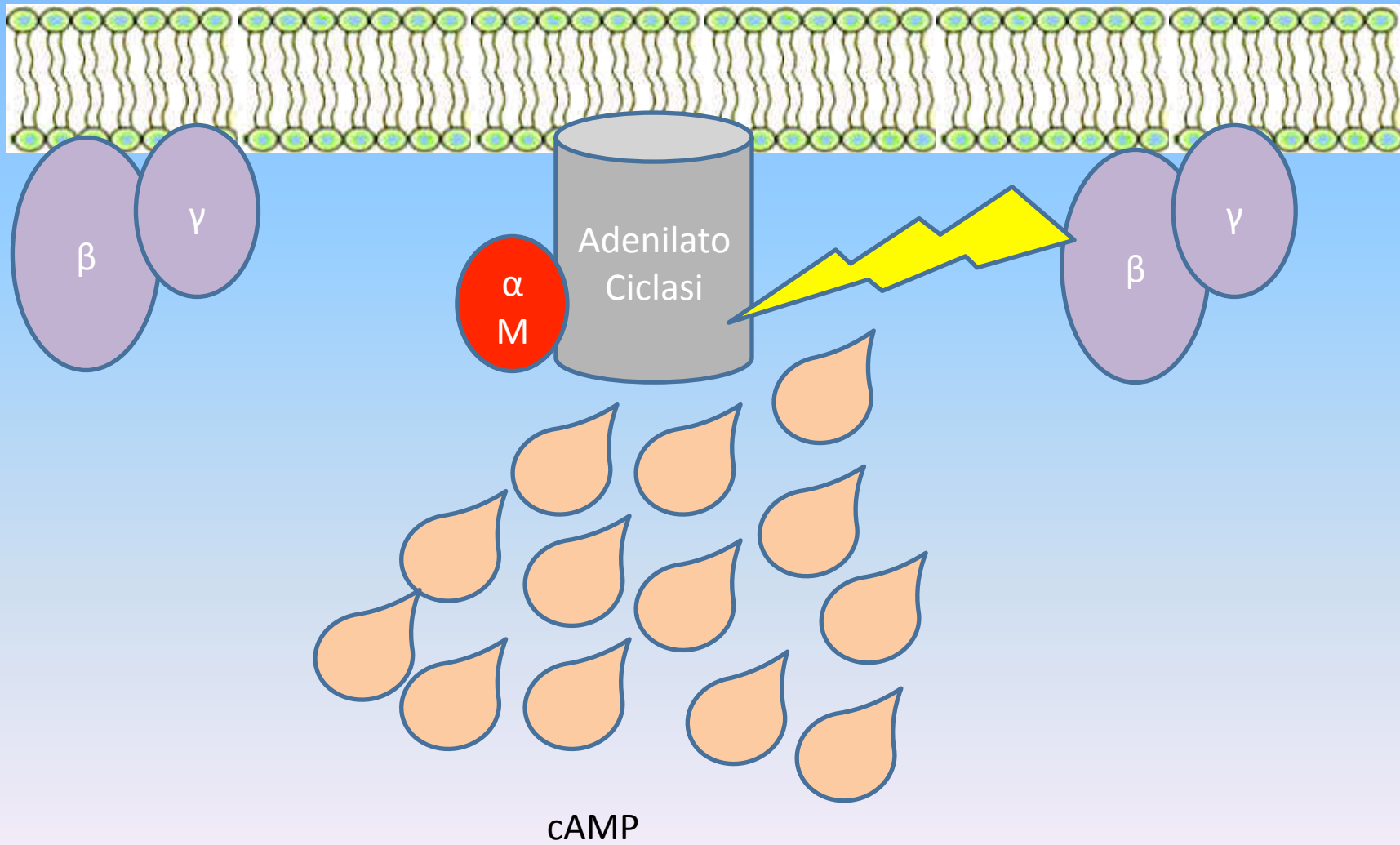
Gene map locus: 7q21

Gα (i)

- Espressa costitutivamente in tutti i tessuti
- Espressa a bassi livelli nelle ossa
- Riduce i livelli di cAMP stimolando la produzione dell' enzima PDE

PROPOSTA DI CURA

$G\alpha(i)$



Pur non toccando i livelli di espressione della

VANTAGGI DELLA PROPOSTA

- $G\alpha$ (i) è endogenamente espressa all'interno di tutte le cellule
- Ridotte dimensioni
394 a.a e 40.37 kDa
(facilmente inseribile in un vettore)
- Le sequenze a.a. di $G\alpha$ (s) e $G\alpha$ (i) sono molto simili

BLAST

Sequence Manipulation Suite:

Protein Molecular Weight

Protein Molecular Weight accepts one or more protein sequences and calculates molecular weight. You can append copies of commonly used epitopes and fusion proteins using the supplied list. Use Protein Molecular Weight when you wish to predict the location of a protein of interest on a gel in relation to a set of protein standards.

Paste the raw sequence or one or more FASTA sequences into the text area below. Input limit is 200000 characters.

```
WIHCFEGVTAIIFCVALS DYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFD SICNNKWFDTDSIILFLNKK  
DLFEKIKK  
SPLTICYPEYAGSNTYEEAAAYIQCCQFEDLNKRKDTKEIYTHFTCATDTRKNVQFVFDVAVTD  
VVIKNNLKD  
CGLF
```

Protein Molecular Weight results

Results for 354 residue sequence "gij52000964|sp|P63096.2|GNAI1_HUMAN RecName: Full=Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1; AltName: Full=Adenylate cyclase-inhibiting G alpha protein" starting "MGCTLSAEDK"
40.37 kDa

- Non sono note malattie legate all' overespressione di $G\alpha$ (i)

PROBLEMI DA RISOLVERE

- $G\alpha$ (i) risponde ad attivatori diversi rispetto a $G\alpha$ (s)



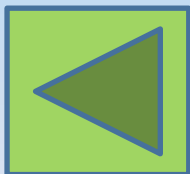
BLAST!

Query : Gs
Subject : Gi

```
>lcl|18067 gi|52000964|sp|P63096.2|GNAI1_HUMAN RecName: Full=Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1; AltName: Full=Adenylate cyclase-inhibiting G alpha protein Length=354
```

```
Score = 258 bits (659), Expect = 2e-73, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 155/394 (39%), Positives = 223/394 (57%), Gaps = 40/394 (10%)
```

```
Query 1 MGCLGNSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGAGESGKSTIVKQM 60  
MGC ++ E+KA E +K I++ L++D + +LLLLGAGESGKSTIVKQM  
Sbjct 1 MGCTLSA-----EDKAAVERSKMIDRNLREDGEKAAREVKLLLLGAGESGKSTIVKQM 53  
  
Query 61 RILHVNGFNGEGGEEDPQAARSNSDGEKATKVQDIKNNLKEAIETIVAAMSNLVPPVELA 120  
+I+H G++ E ++ SN+ ++I I+ AM L +  
Sbjct 54 KIIHEAGYSEEECKQYKAVVYSNT-----IQSIIAIRAMGRLKIDFGDS 98  
  
Query 121 NPENQFRVDYILSVMMVPDFDFPPEFYEHAKALWEDEGVRACYERSNEYQLIDCAQYFLD 180  
+ R ++L+ F E K LW+D GV+AC+ RS EYQL D A Y+L+  
Sbjct 99 ARADDARQLFVLGAAEEGF-MTAELAGVIKRLWKDSGVQACFNRSREYQLNDSAAYYLN 157  
  
Query 181 KIDVIKQADYVPSDQDLLRCRVLTSGIFETKFQVDKVNFMFDVGGQORDERRKWIQCFND 240  
+D I Q +Y+P+ QD+LR RV T+GI ET F ++F MFDVGGQR ER+KWI CF  
Sbjct 158 DLDRIAQPNIPTQQDVLRTVRVKTGTGIVETHFTFKDLHFKMFVGGQRSERKKWIHC FEG 217  
  
Query 241 VTAIIFVVAASSYMMVIREDNQTMRLQEALNLFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLLAEK 300  
VTAIIF VA S Y++V+ ED + NR+ E++ LF SI NN+W S+ILFLNK+DL EK  
Sbjct 218 VTAIIFCVALSDYDLVLAEDEEMMRMHE SMKLFDSICNNKWFTDTSIILFLNKKDLFEK 277  
  
Query 301 VLAGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEF LRISTASGDGRHYCY 360  
+ KS + +PE+A T E+A +I+ +F ++ D + Y  
Sbjct 278 I--KKSPLTICYPEYAGSNTYEEAAA-----YIQCQFEDLNKRK-DTKEI-Y 320  
  
Query 361 PHFTCAVDTENIRRVFNDCRDIIQRMHLRQYELL 394  
HFTCA DT+N++ VF+ D+I + +L+ L  
Sbjct 321 THFTCATDTKNVQVFVDAVTDVVIKNNLKDCGLF 354
```



I SOLUZIONE:

“Via semplice”

L'attività della subunità $G\alpha$ (i) viene regolata da una serie di proteine definite RGS, che legandosi alla stessa subunità ne favoriscono il passaggio dalla forma attiva a quella inattiva.

jbc THE JOURNAL OF
BIOLOGICAL CHEMISTRY

**A Point Mutation in $G\alpha_o$ and $G\alpha_{i1}$ Blocks
Interaction with Regulator of G Protein
Signaling Proteins***

Keng-Li Lan[‡], Noune A. Sarvazyan[‡], Ronald Taussig[§],
Robert G. Mackenzie[¶], Paul R. DiBello^{||}, Henrik G. Dohlman^{||} and
Richard R. Neubig^{‡**‡}

In this report, we identify a G → S point mutation in the conformationally flexible “switch I” region of α_o and α_{i1} that completely eliminates the interaction of these α subunit with RGS proteins.

Possiamo utilizzare una subunità $G\alpha$ (i) che porta una mutazione già nota che la rende insensibile ai regolatori RGS, con il risultato di una iperattivazione dell'attività di degradazione del cAMP

II SOLUZIONE:

“Via complessa”

La mutazione che rende sempre attiva la subunità $G\alpha$ (s) è nota sia nella forma che nella localizzazione.

Facciamo una serie di mutazioni puntiformi nella subunità $G\alpha$ (i) fino a trovare una mutazione iperattivante .

Notare come la sequenza amminoacidica della subunità $G\alpha$ (i) sia molto simile a quella della proteina $G\alpha$ (s) nella regione che mutando rende sempre attiva tale subunità. Pertanto quella può essere la prima regione da sottoporre a mutazioni indirizzate.

```
Query 181 KIDVIKQADYVPSDQDLLRCRVLTSGIFETKFRQVDKVMFHMFDVGGQRDERRKWIQCFND 240
          +D I Q +Y+P+ QD+LR RV T+GI ET F ++F MFDVGGQR ER+KWI CF
Sbjct 158 DLDRIAQPNYIPTQQDVLRTRVKTTGIVETHFTFKDLHFKMFDVGGQRSERKKWIHCFEG 217
```

Le subunità $G\alpha(s)$ M e la subunità $G\alpha(i)$ hanno stessa affinità per il complesso $\beta\gamma$

```
Site          order(182,184,186,197,199,203..205,207,210..211,213..216)
              /gene="GNAI1"
              /site_type="other"
              /note="beta - gamma complex interaction site"
              /db_xref="CDD:133249"
```

```
>lcl|18067 gi|52000964|sp|P63096.2|GNAI1_HUMAN RecName: Full=Guanine nucleotide-binding
protein G(i) subunit alpha-1; AltName: Full=Adenylate
cyclase-inhibiting G alpha protein
Length=354
```

```
Score = 258 bits (659), Expect = 2e-73, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 155/394 (39%), Positives = 223/394 (57%), Gaps = 40/394 (10%)
```

```
Query 1  MGCLGNSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGAGESGKSTIVKQM 60
MGC ++      E+KA E +K I++ L++D +      +LLLLGAGESGKSTIVKQM
Sbjct 1  MGCTLSA-----EDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAAREVKLLLLGAGESGKSTIVKQM 53

Query 61  RILHVNGFNGEGGEDPQAARSNSDGEKATKVQDIKNNLKEAIIETIVAAMS NLVPPVELA 120
+I+H G++ E ++      SN+      ++I I+ AM L      +
Sbjct 54  KIIHEAGYSEEECKQYKAVVYSNT-----IQSIIAIRAMGRLKIDFGDS 98

Query 121  NPENQFRVDYILSVMNVPDFDFPPEFYEHAKALWEDEGVRACYERSNEYQLIDCAQYFLD 180
+ R ++L+      F      E      K LW+D GV+AC+ RS EYQL D A Y+L+
Sbjct 99  ARADDARQLFVLAGAAEEGF-MTAE LAGVIKRLWKDSGVQACFNRSREYQLNDSAAYYLN 157

Query 181  KIDVIKQADYVPSDQDLLRCRVLTSGIFETKFQVDKVNFMFVGGQDERRKWIQCFND 240
+D I Q +Y+P+ QD+LR RV T+GI ET F      ++F MFDVGGQR ER+KWI CF
Sbjct 158  DLDRIAQPNYIPTQQDVLRTVRKVTGIVETHFTFKDLHFKMFVGGQRSEKRWIHC FEG 217

Query 241  VTAIIFVVASSSYMMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNMRWLRTISVILFNKQDLLAEK 300
VTAIIF VA S Y++V+ ED + NR+ E++ LF SI NN+W      S+ILFNK+DL EK
Sbjct 218  VTAIIFCVALS DYDLVLAEDEEMMRMHESMKL FDSICNMKWFTDTSIILFNK KDLFEEK 277

Query 301  VLAGSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEF LRISTASGDGRHYCY 360
+ KS +      +PE+A T E+A      +I+ +F ++      D + Y
Sbjct 278  I--KKSPLTICYPEYAGSNTYEEAAA-----YIQCQFEDLNKRK-DTKEI-Y 320

Query 361  PHFTCAVDTEMIRRVFND CRDIIQRMHLRQYELL 394
HFTCA DT+N++ VF+      D+I + +L+      L
Sbjct 321  THFTCATDTKNVQFVFD AVTDVIIKNNLKD CGLF 354
```

La regione di legame al complesso $\beta\gamma$ mostra una forte omologia di sequenza in entrambe le due subunità α

Confronto tra subunità G α (i) umana e murina

```
>lcl|61943 gi|1730229|sp|P08752.4|GNAI2 MOUSE RecName: Full=Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2; AltName: Full=Adenylate cyclase-inhibiting G alpha protein Length=355
```

```
Score = 655 bits (1689), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 312/355 (88%), Positives = 333/355 (94%), Gaps = 1/355 (0%)
```

```
Query 1 MGCTLSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAREVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIHEAG 60  
MGCT+SAEDKAA ERSKMID+NLREDGEKAAREVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIHE G  
Sbjct 1 MGCTVSAEDKAAAERSKMIDKNLRDGEKAAREVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIHEHG 60  
  
Query 61 YSEEECKQYKAVVYSNTIQSIIAIIRAMGRLLKIDFGDSARADDARQLFVLGAAEE-GFM 119  
YSEEEC+QY+AVVYSNTIQSI+AI++AMG L+IDF D RADDARQLF L+ AAEE G +  
Sbjct 61 YSEEECRQYRAVVYSNTIQSILAIVKAMGNLQIDFADPQRADDARQLFALSCAAEEQGML 120  
  
Query 120 TAELAGVIKRLWKDSGVQACFNRSREYQLNDSAAYYLNDLDRIAQPNYIPTQQDVLRLTRV 179  
+L+GVI+RLW D GVQACF RSREYQLNDSAAYYLNDL+RIAQ +YIPTQQDVLRLTRV  
Sbjct 121 PEDLSGVIRRLWADHGQVQACFGRSREYQLNDSAAYYLNDLERIAQSDYIPTQQDVLRLTRV 180  
  
Query 180 KTTGIVETHFTFKDLHFKMFDVGGQRSEKRWIHC FEGVTAIIFCVALS DYDLVLAEDDEE 239  
KTTGIVETHFTFKDLHFKMFDVGGQRSEKRWIHC FEGVTAIIFCVALS YDLVLAEDDEE  
Sbjct 181 KTTGIVETHFTFKDLHFKMFDVGGQRSEKRWIHC FEGVTAIIFCVALSAYDLVLAEDDEE 240  
  
Query 240 MMRMHESMKLFDSICNNKWFDTDSIILFLNKKDLFEEKIKKSPLTICYPEYAGSNTYEEA 299  
MMRMHESMKLFDSICNNKWFDTDSIILFLNKKDLFEEKI +S LTIC+PEY G+N Y+EA  
Sbjct 241 MMRMHESMKLFDSICNNKWFDTDSIILFLNKKDLFEEKITQSSLTICFPEYTGANKYDEA 300  
  
Query 300 AAYIQCFQFEDLNKRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDVAVTDVVIKNNLKDCGLF 354  
A+YIQ +FEDLNKRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDVAVTDVVIKNNLKDCGLF  
Sbjct 301 ASYIQSKFEDLNKRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDVAVTDVVIKNNLKDCGLF 355
```

La sequenza della subunità è talmente conservata che non dovrebbero sorgere problemi nell'utilizzo di subunità G α (i) umane in cellule o tessuti murini

Piano sperimentale

Costrutto



Vettore Virale

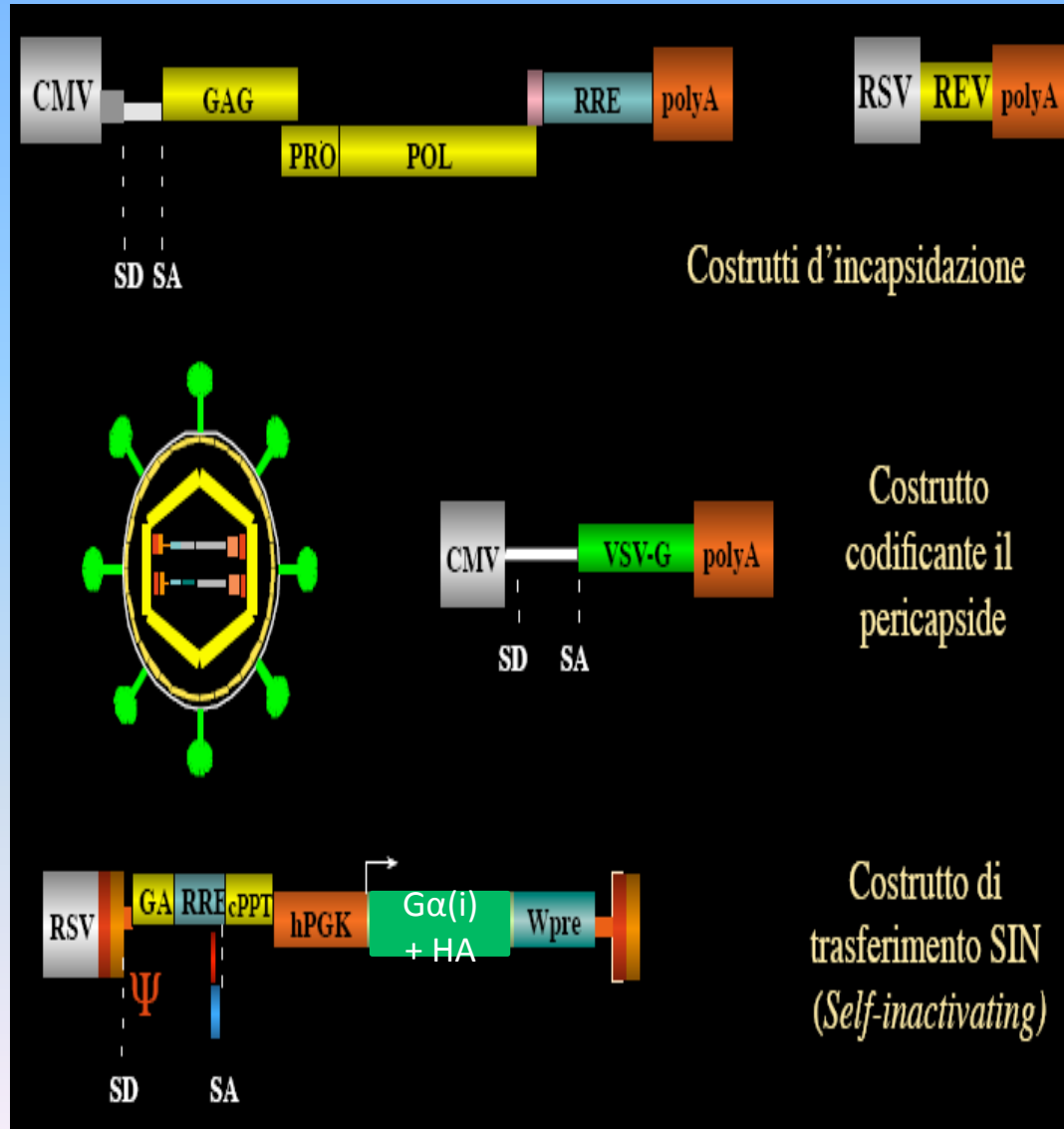


Scelta delle cellule da
utilizzare



Verifica sperimentale della
funzionalità del costrutto

Costrutto e Vettore



PERCHE' LENTIVIRUS?

III GEN

- Non hanno tropismo per specifiche cellule
- Modifica delle LTR riduce la loro funzione di enhancer
- Presenza di cPPT e Wpre
- Esistenza di Kit per la produzione in vitro

Sistema cellulare

Cellule staminali stromali umane prelevate dal midollo osseo (hBMSC) con
consenso informato

Soggetti sani



Soggetti malati



**COLTURE DI CELLULE
STAMINALI STROMALI**

Verifica sperimentale

Selezione delle
cellule

Trasduzione

Controllo inserzione
costrutto

Verifica dei livelli espressione
tramite WB e ELISA di $G\alpha(i)$ post
trattamento

Verifica dei livelli di cAMP

Verifica dei livelli di PDE

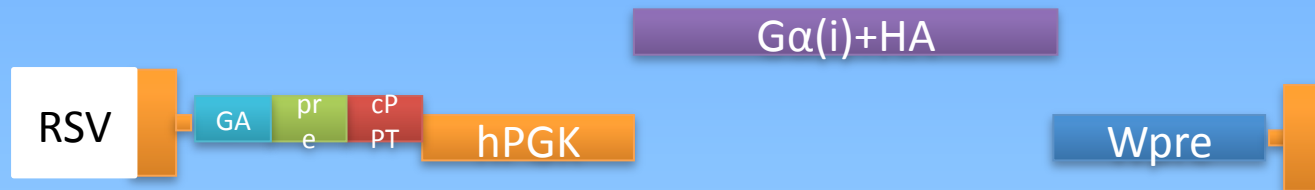
Verifica che i trascritti up-regolati
nelle cellule malate risultino a livelli
normali nelle cellule trattate



Passaggio in vivo : topo

Inizio eventuale trial clinico

PRODUZIONE DEL VETTORE

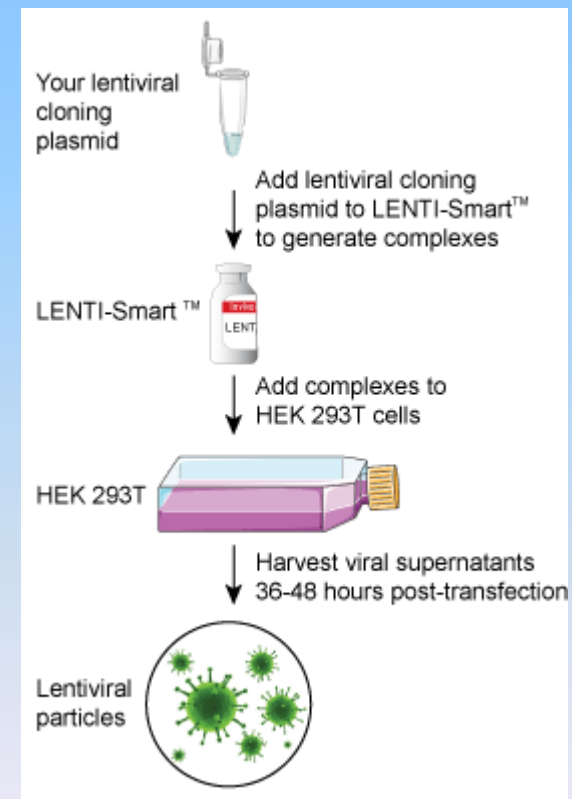


LENTI-Smart™ : Lentiviral Vector Production Kits

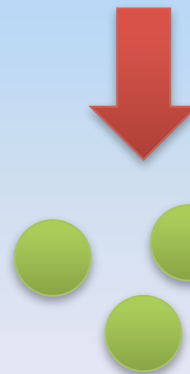
Currently, production of high titers of lentiviral vectors is a time consuming, multi-step procedure with low reproducibility.

LENTI-Smart™ has been designed to solve these problems, by creating a lyophilizate of optimized packaging plasmids combined with a DNA transfection reagent. Upon rehydration, this lyophilizate serves as a "carrier" for your favorite lentiviral cloning plasmid (not provided).

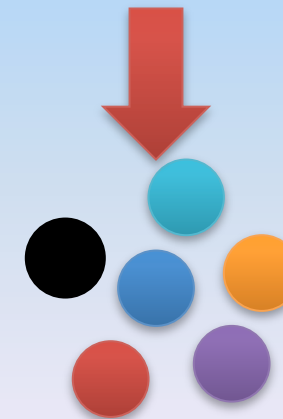
Depending on your preference, LENTI-Smart™ kits are available for the production of either **integrating** or **non-integrating** lentiviral (NIL) vectors.



Estrazione cellule malate e sane tramite biopsia di pazienti affetti e sani.

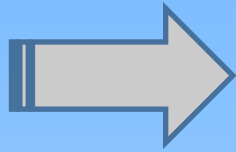
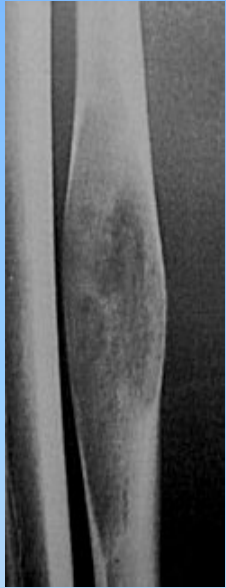


CELLULE STAMINALI STROMALI

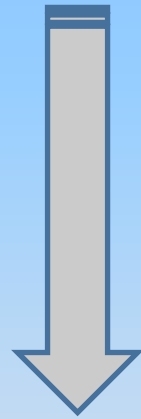


ALTRE CELLULE

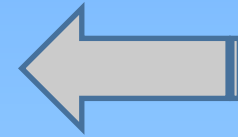
ALTERNATIVA alla FACS



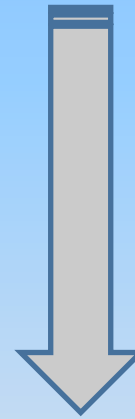
Coltura di
cellule
prelevate



Quelle in grado di
formare colonie sono le
staminali stromali ossee

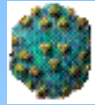
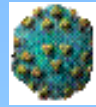
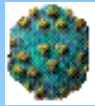
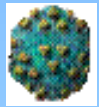


Coltura di
cellule
prelevate



Quelle in grado di
formare colonie sono le
staminali stromali ossee

Trasduzione con LENTIVIRUS delle cellule BMSC



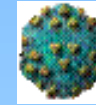
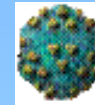
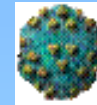
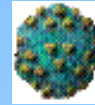
BMSC

BMSC

BMSC

BMSC

Cellule HeLA



BMSC

BMSC

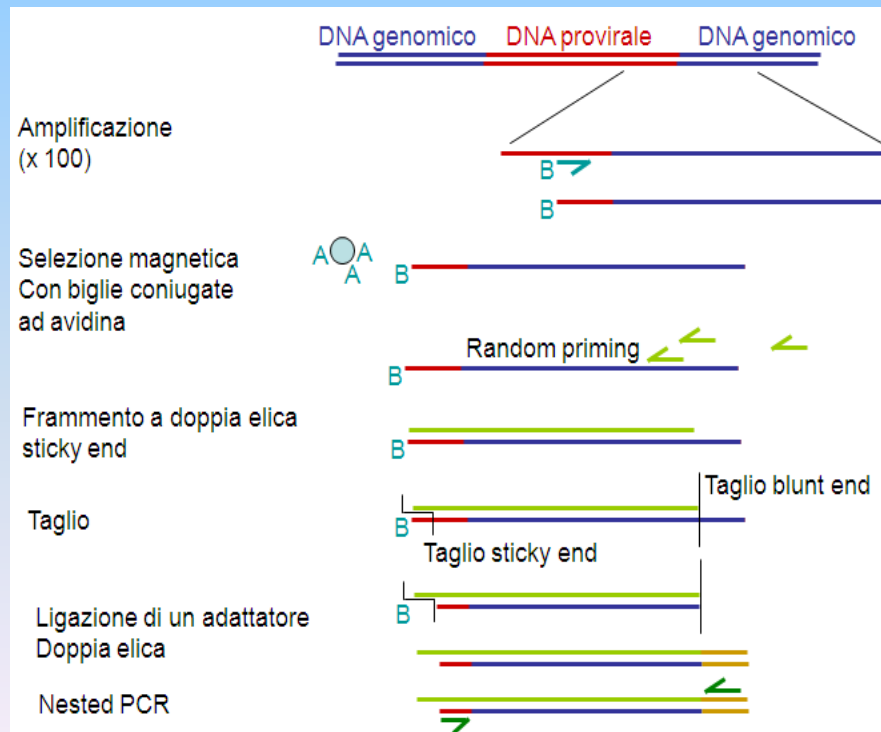
BMSC

BMSC

Cellule HeLA

CONTROLLO: E SE PER MUTAGENESI INSERZIONALE AVESSIMO STIMOLATO UN TUMORE?

1. Dobbiamo mantenere le cellule in coltura
2. Selezione delle cellule che iper-prolificano
3. Utilizzo della LAM-PCR per vedere dove il DNA virale si è integrato



4. Qualora si scoprissero degli hot spots si potrebbe pensare ad un modo per “mascherare” queste zone di ricombinazione.

IN OGNI CASO LA RICERCA SUBIREBBE UN RALLENTAMENTO ED UN AUMENTO DEI COSTI

REPLICAZIONE EPISOMALE DEI LENTIVIRUS

Poco convincente:

- ha bassa efficienza
- dipende dalla replicazione cellulare
- subisce diluizione durante la replicazione



LENTI-Smart™ NIL

Generation of Non-Integrating Lentiviruses

Integration of a transgene into the host genome poses **safety concerns** due to the potential risk of insertional mutagenesis. To overcome this problem, non-integrating lentiviral vectors have been designed that combine the advantageous features of lentiviral vectors with episomal replication alleviating the risk of insertional mutagenesis.

InvivoGen provides **LENTI-Smart™ NIL**, the first kit designed for the **generation of non-integrating lentiviral vectors**.

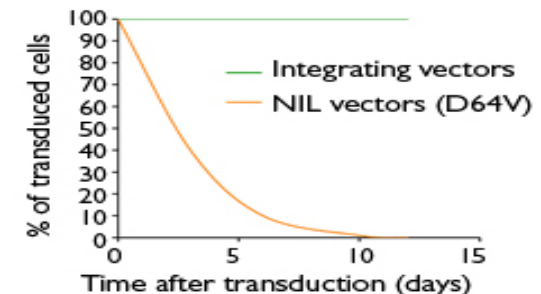
LENTI-Smart™ NIL combines a mix of **optimized packaging plasmids** together with a **transfection reagent, LyoVec™**, selected for its high transfection efficiency and low cell toxicity. Just add to LENTI-Smart™ your favorite lentiviral cloning plasmid (not included) containing your gene of interest.

Non-integrating lentiviral vectors allow transient transgene expression in dividing cells and long-term expression in non-dividing cells, such as neurons.

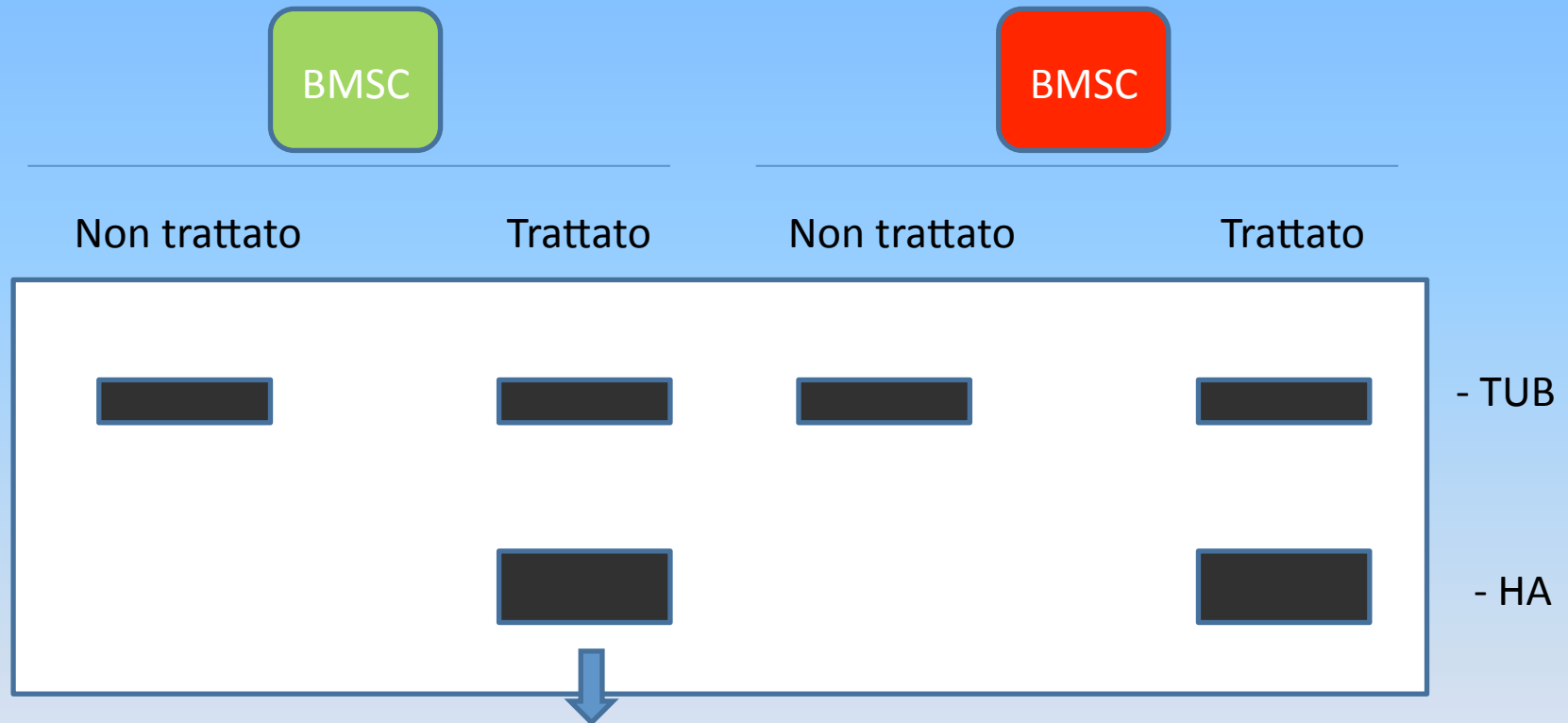
LENTI-Smart™ NIL is provided with the control lentiviral plasmid, pLV-Green, that expresses a GFP gene.

Two LENTI-Smart™ kits are available:

- **LENTI-Smart™ NIL** for the generation of **non-integrating** lentiviral vectors
- **LENTI-Smart™ Starter Kit** for the generation of integrating and non-integrating lentiviral vectors.

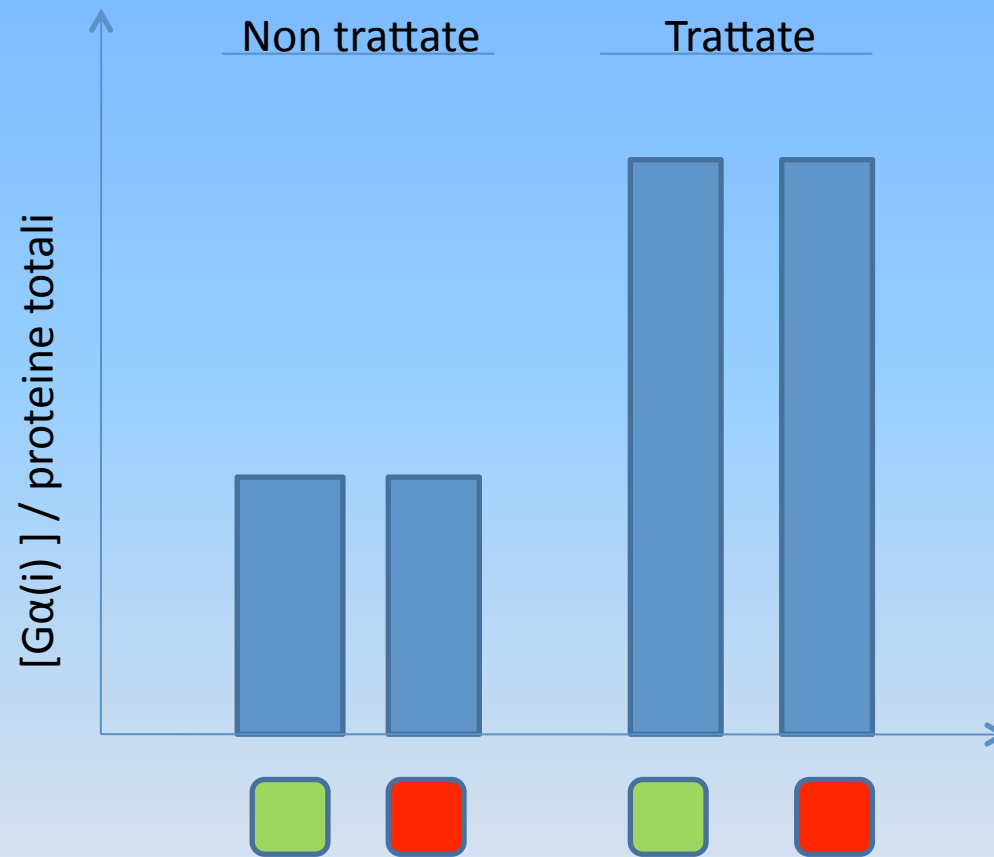


Verifica dell'espressione di $G\alpha(i)$ tramite Western Blot



È possibile che in un individuo sano l'overespressione di $G\alpha(i)$ porti a morte cellulare

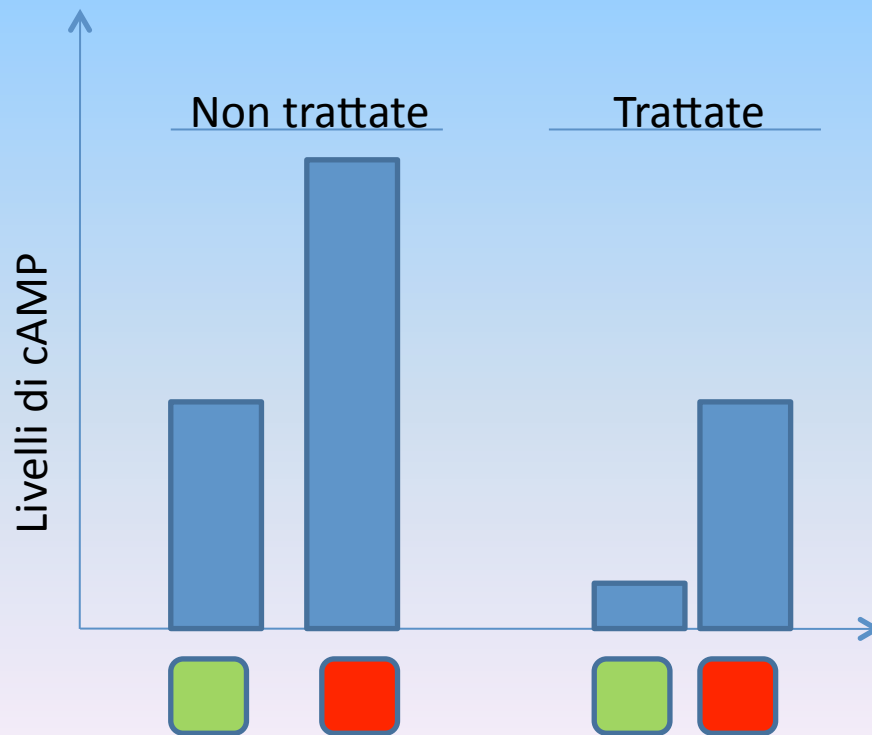
Verifica dei livelli di espressione di $G\alpha(i)$ tramite ELISA



$G\alpha(i)$ è maggiormente espressa nelle cellule trattate.

Verifica che i livelli di cAMP prodotto dalle cellule esprimenti il costrutto sia minore dei livelli di cAMP delle cellule non trasdotte

- Lisi delle cellule
- Verifica dei livelli di cAMP tramite “cAMP assay”



SIGMA-ALDRICH[®]

cAMP Assays



Sigma[®] has prepared product lists for commonly used protocols from *Cold Spring Harbor Protocols*.

View the entire protocol on BioSupplyNet.com.

Selected Protocol from "Protein-Protein Interactions", 2nd Edition, E. Golemis, P. Adam.

cAMP Assays

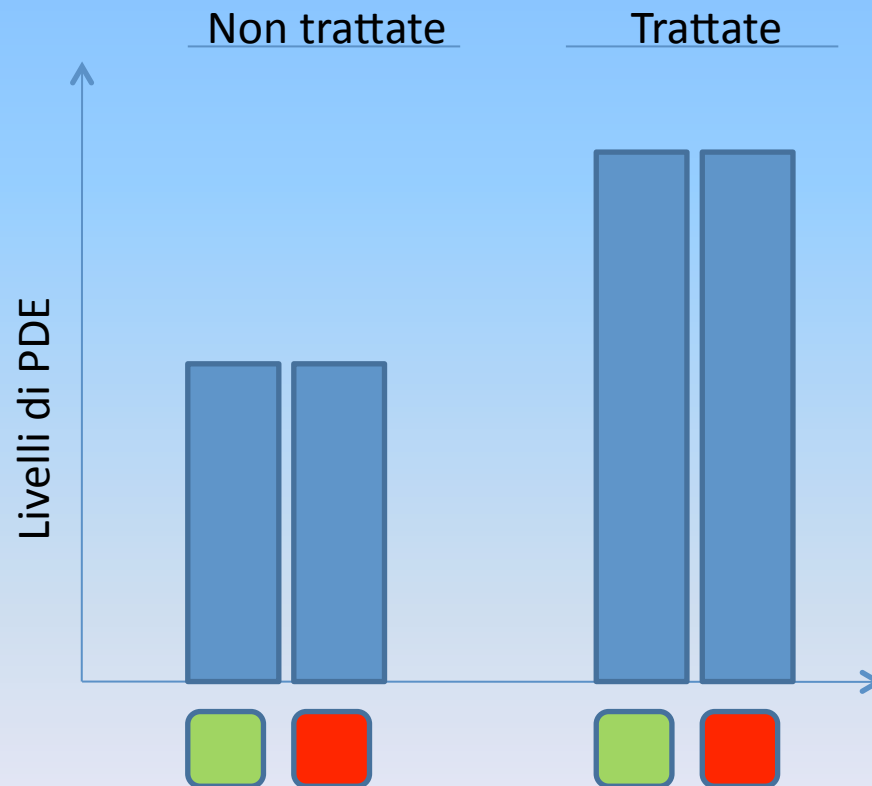
Gouzel Karimova and Daniel Ladant

Unite Postulante de Biochimie des Interactions Macromoleculaires, Departement de Biologie Structurale et Chimie, CNRS URA 2185, Institut Pasteur, Paris, France

ABSTRACT

cAMP measurements are obtained using an ELISA assay (Harlow and Lane 1988). Commercial radio-immunoassays, or ELISA kits, to assay cAMP can be purchased from various manufacturers. In our laboratory we use the homemade, less-expensive ELISA that is described below. In outline, this assay is based on the ability of soluble cAMP in bacterial extracts to compete with binding of an alkaline phosphatase (AP)-conjugated anti-cAMP antibody to immobilized cAMP. The surface-bound, immobilized anti-cAMP-AP is inversely correlated to the concentration of cAMP in the extract. Known concentrations of soluble cAMP are used to calibrate the assay.

Verifica che i livelli di PDE prodotto dalle cellule trasdotte sia maggiore dei livelli di PDE delle cellule non trasdotte



Promega

PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay Technical Bulletin

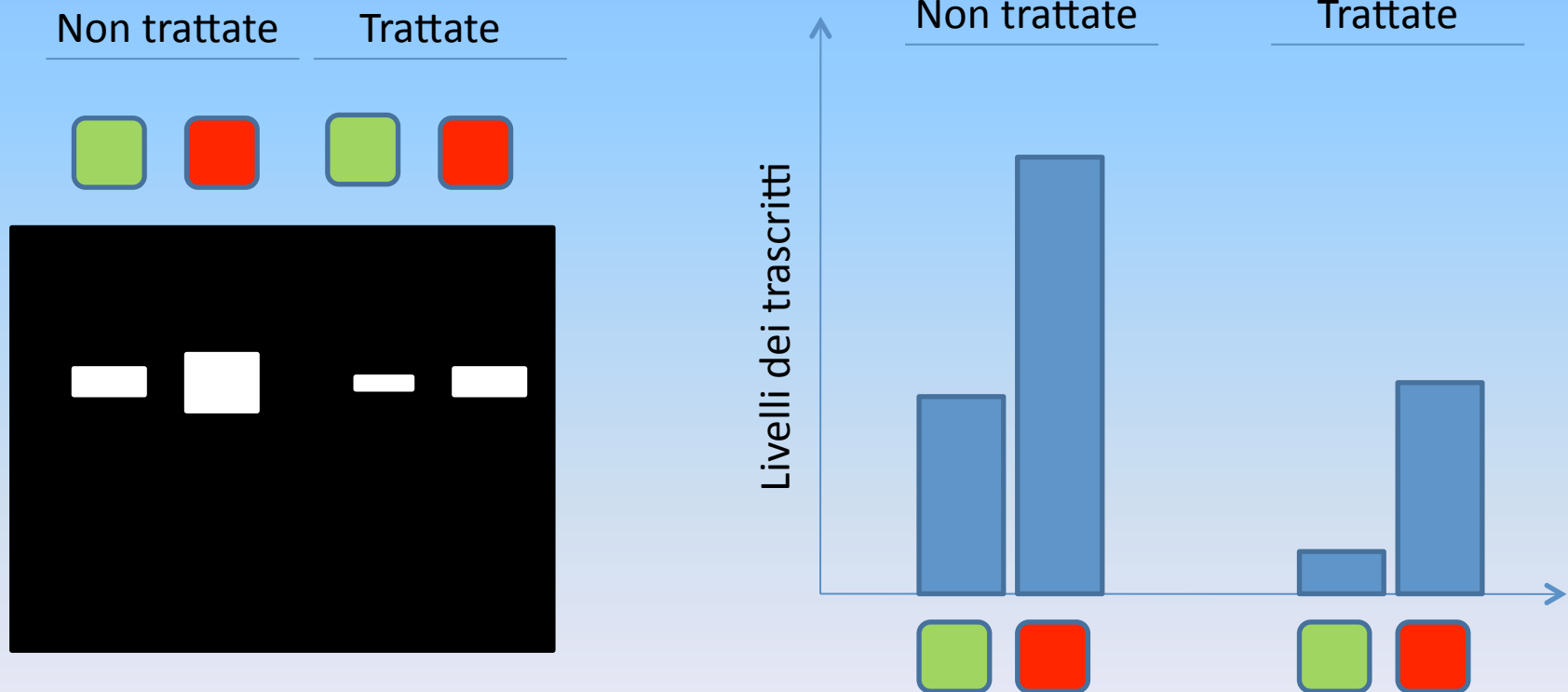
Instructions for Use of Product(s) V1361, V1362

Literature # TB353

The PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay is a luminescent, high-throughput screening method for measuring cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) activity from purified sources. PDEs have been implicated in a variety of diseases such as erectile dysfunction, asthma, chronic obstructive pulmonary disease, learning disorders, depression and memory functions, neurodegenerative diseases, autoimmune disorders, heart failure and myocardial infarction. The availability of selective inhibitors for PDEs has facilitated their use as tools to study cyclic nucleotide signaling and paved the way to investigate the role of PDEs in cellular and tissue pathologies. The PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay allows lead candidates for PDE inhibitors to be identified.

Verifica che i trascritti up-regolati nelle cellule malate risultino a livelli normali nelle cellule trattate

1. Estrazione RNA da cellule SANE, MALATE, NON TRATTATE e TRATTATE
2. Produzione dei cDNA corrispondenti
3. Utilizzo di primer specifici per amplificare i trascritti



Quantificazione tramite qRT-PCR

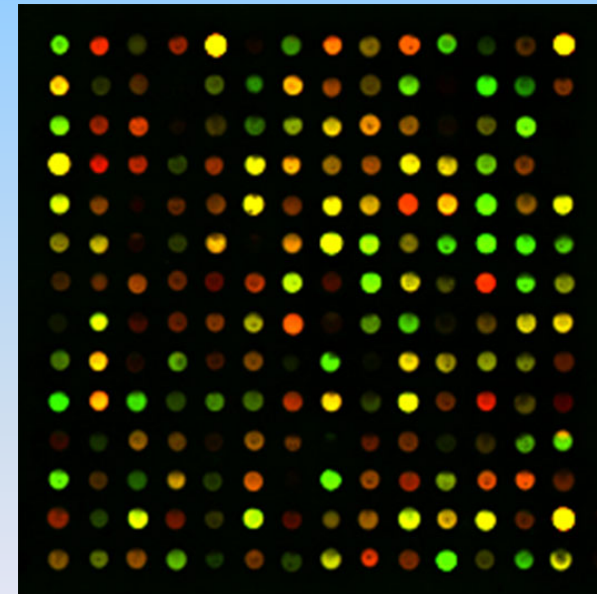
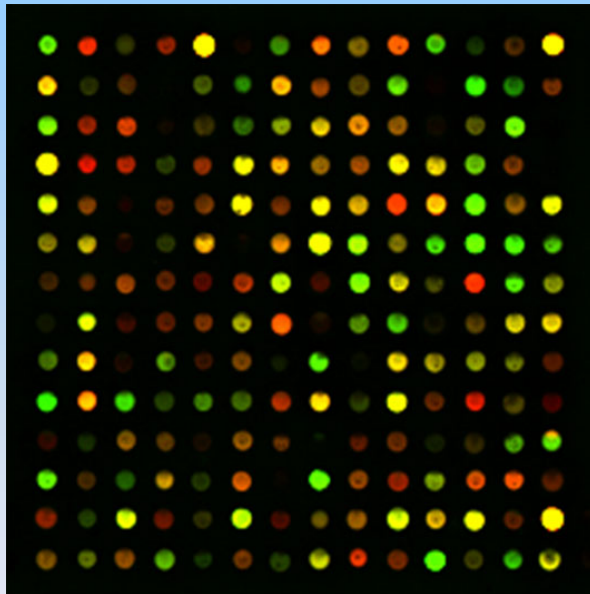
Controllo dell'espressione a livello genomico per verificare che l'over-espressione della proteina $G\alpha(i)$ non abbia deregolato pathway cellulari



NON trattata



Trattata



PASSAGGIO IN VIVO: TOPO

1. Espianto dei progenitori ossei da soggetto malato.
2. Trasduzione delle cellule tramite lentivirus.
3. Trapianto subcutaneo dei progenitori ossei trattati .

- Verifica dell'**EFFICIENZA** del costrutto tramite ripetizione di tutti i test effettuati in vitro
- Verifica della **PERSISTENZA** del nostro costrutto nel tessuto.

→ **Una persistenza di qualche giorno renderebbe inutile la terapia**
(vista anche la difficoltà e l'invasività dei trapianti dei precursori ossei trattati e la giovane età di molti pazienti)

PROBABILE INIZIO DI UN TRIAL CLINICO



Costi della ricerca

- Lentiviral Vector Production Kit necessario contattare il fornitore
- Kit cAMP assay circa 500 euro
- Kit PDE assay circa 500 euro
- Kit ELISA circa 350 euro
- Kit Microarray circa 400 euro
- Anticorpi anti TUB circa 350 euro
- Anticorpi anti HA circa 350 euro



- MACCHINARI e STABULARI diverse migliaia di euro
- Stipendi dei ricercatori pochissime centinaia di euro

- Aiuti o richieste di materiale ad altri laboratori contribuirebbero ad abbassare i costi

LE IDEE SCARTATE

1. Inserimento nelle cellule malate di un trascritto anti $G\alpha(s)$ M per bloccarne la traduzione

ORIGINAL ARTICLE

JBMR

Transfer, Analysis, and Reversion of the Fibrous Dysplasia Cellular Phenotype in Human Skeletal Progenitors

Stefania Piersanti,^{1,3} Cristina Remoli,^{1,2} Isabella Saggio,^{1,3,4} Alessia Funari,^{1,2} Stefano Michienzi,^{1,2} Benedetto Sacchetti,^{1,2} Pamela Gehron Robey,⁵ Mara Riminucci,^{1,2} and Paolo Bianco^{1,2}

APPROCCIO GIA'
TENTATO

2. Sostituzione dell'esone mutato con esone normale tramite ricombinazione omologa

TROPPO INEFFICIENTE

3. Silenziamento totale dell'esone mutato tramite un antisenso, e fornitura della subunità normale dall'esterno

PERICOLOSO &
INEFFICIENTE

4. Fornire esogenamente la subunità $G\alpha(s)$ normale, che per competizione avrebbe fatto produrre meno Proteine G mutate

INEFFICIENTE

“Negative results are still results”

Raj Koothrapal
(The big bang theory)

GRAZIE PER L'ATTENZIONE