

Introducerea tehnologiei CRISPR/Cas9 în terapia distrofiei musculare Duchenne

Distrofia musculară Duchenne, cu o incidență de 1:3500 bărbați, reprezintă o patologie genetică X-linkată recesivă. Femeile sunt purtătoare ale genei și sunt adesea asimptomatice. Clinic, debutează în jurul vârstei de 2-5 ani prin atrofie musculară și paralizie care debutează în centuri, extinzându-se ulterior în distalitatea membrelor. Astfel, pacienții prezintă tulburări severe de mers, ajungând paraparetici în jurul vârstei de 12-13 ani. Afectarea se extinde atât la musculatura intercostală, cât și la nivelul cordului, iar pacienții vor suferi de cardiomiopatie dilatativă (o cauză frecventă de deces), de aritmii cardiace, dar și de insuficiență respiratorie. Decesul este iminent și apare în decada a treia de viață.

Gena distrofinei reprezintă cea mai mare genă din genomul uman, fiind codată de 79 de exoni. Prin procesele de transcripție și ulterior translație a acesteia se formează distrofina, proteină care conferă stabilitate membranei musculare. (1) Astfel, orice mutație la nivelul genei distrofinei va duce la producerea unei proteine ineficiente cu răsunet major asupra funcționalității musculare. Având în vedere dimensiunea genei, putem înțelege de ce mutațiile la nivelul acesteia apar cu o frecvență atât de înaltă. Majoritatea pacienților prezintă deleții la nivelul genei distrofinei (60%), restul prezentând duplicații sau mutații punctiforme. (2) Cele mai comune deleții apar la nivelul exonilor 6-7 și 43-53. (3) Prin urmare, în urma acestor mutații, în distrofia musculară Duchenne, funcția distrofinei va fi absentă, spre deosebire de distrofia musculară Becker, în care există doar o reducere a dimensiunii și cantității distrofinei, patologie cu un prognostic mult mai bun. Luând în considerare aceste aspecte, putem trage concluzia că orice modificare în sensul corectării genei distrofinei, chiar și într-o mică măsură, poate reprezenta un impact major în terapia pacienților cu DMD.

Cu toate că boala poate fi depistată precoce – prin determinarea enzimelor musculare sau prin biopsie musculară, dar preponderent prin testare genetică – tratamentul nu este unul etiologic, ci unul substitutiv. Acesta se bazează pe corticoterapie, kinetoterapie, tratamentul cardiomiopatiei, suport ventilator nocturn și tratament ortopedic.

În funcție de mutația existentă, sunt disponibile patru tipuri de tratamente : Eteplirsen (exon-skipping 51), Golodirsen și Vitolarsen (exon-skipping 53) și Casimersen (exon-skipping 45). (4) Eficacitatea lor este limitată de costul crescut, de efectul de scurtă durată, dar preponderent de limitarea acțiunii în funcție de mutația specifică. Astfel, noi terapii care duc la corecția permanentă a genei distrofinei sunt necesare.

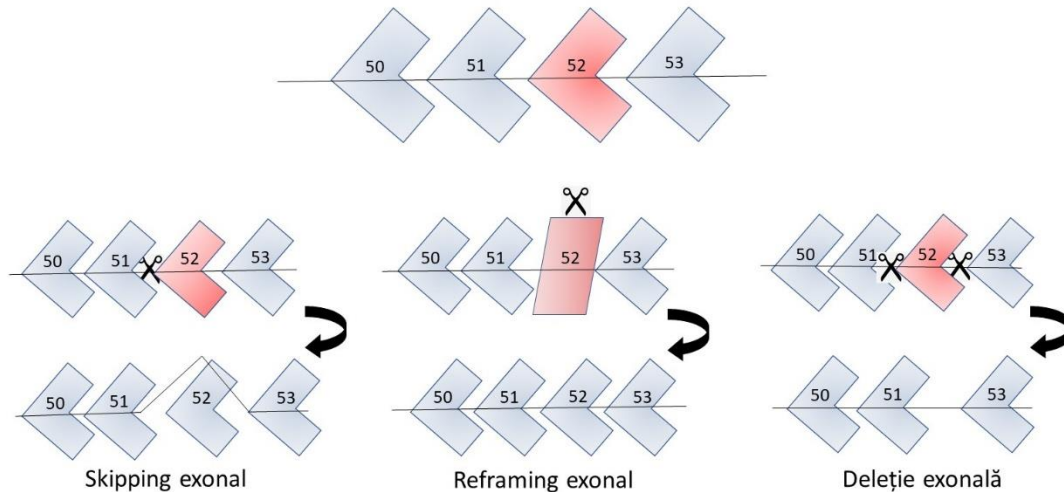
CRISPR/Cas9, o tehnologie promițătoare în multiple patologii, este alcătuită din două elemente principale: ARN-ul ghid, care recunoaște ADN-ul și se atașează de acesta, și Cas9 - o endonuclează care "taie" catena de ADN recunoscută anterior. (3)

În cadrul distrofiei musculare Duchenne, prin tehnologia CRISPR/Cas9 se poate corecta mutația genei distrofinei prin tehnicile de **deleție exonală**, **skipping exonal** și **reframing exonal**, fiecare având propriile avantaje și dezavantaje. (5)

Deleția axonală are nevoie de două ARN-uri ghid pentru a exciza mutația ADN, în prezența caspazei. Trebuie folosită cu precauție, mai ales când mutația se află în domenii esențiale precum cele care interacționează cu distroglicanul sau cu actina. În urma folosirii a două ARN-uri ghid, delețiile exonilor pot genera multiple mutații imprevizibile ale ADN-ului. De asemenea, eficacitatea este mai redusă decât în cadrul exon-skippingului, deoarece tăierea ADN-ului trebuie să se realizeze simultan pentru ca ștergerea exonului să aibă loc.

În cadrul **exon-skippingului** este nevoie de o singură tăietură (single-cut) în ADN, și astfel de un singur ARN ghid. La acest nivel are loc îmbinarea exonului precedent cu cel următor celui afectat. Peste 70% dintre pacienții cu DMD prezintă mutații care pot beneficia de o astfel de terapie. (4) Un avantaj pe care îl prezintă în comparație cu tehnica de deleție axonală este reprezentat de faptul că probabilitatea mutațiilor ulterioare în ADN e mult mai mică când se realizează o singură tăietură în ADN față de două astfel de tăieturi.

O altă tehnică de single-cut, **reframingul exonal**, se folosește cel mai frecvent în DMD cauzată de deleția unui singur exon. Astfel, prin această tehnică, cu ajutorul caspazei se va remodela exonul afectat cu scopul reîmbinării ulterioare a lanțului exon al aferent. Această tehnică reprezintă un potențial terapeutic datorită rezultatelor promițătoare existente în literatura de specialitate. Un exemplu în acest caz îl reprezintă studiul lui Amosii L et al. (2017) în care având ca model șoareci cu deleția exonului 50 s-a restaurat 90% din expresia distrofinei cu un impact clinic pozitiv, atât asupra musculaturii scheletice cât și asupra celei cardiace (6).



52 -> mutație pe exonul 52

Având toate aceste aspecte în vedere, suntem tot mai aproape de a găsi un tratament eficient și definitiv în distrofia musculară Duchenne. Pentru acest fapt sunt necesare multiple cercetări in vivo și trialuri clinice pentru a descoperi cel mai sigur mod de a introduce această nouă tehnologie revoluționară.

Bibliografie

1. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* [Internet]. 2020 Feb 13 [cited 2022 Feb 28];578(7794):229–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32051598/>
2. Olson EN. Toward the correction of muscular dystrophy by gene editing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jun 1;118(22).
3. Lim KRQ, Yoon C, Yokota T. Applications of CRISPR/Cas9 for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *J Pers Med* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2022 Feb 28];8(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30477208/>
4. Erkut E, Yokota T. CRISPR Therapeutics for Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Feb 6 [cited 2022 Feb 28];23(3):1832. Available from: </pmc/articles/PMC8836469/>
5. Chemello F, Bassel-Duby R, Olson EN. Correction of muscular dystrophies by CRISPR gene editing. *J Clin Invest*. 2020 Jun 1;130(6):2766–76.
6. Amoasii L, Long C, Li H, Mireault AA, Shelton JM, Sanchez-Ortiz E, et al. Single-cut genome editing restores dystrophin expression in a new mouse model of muscular dystrophy. *Sci Transl Med* [Internet]. 2017 Nov 29 [cited 2022 Mar 7];9(418). Available from: </pmc/articles/PMC5749406/>