



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea triennale in Scienze Biologiche

L'INGEGNERIA GENETICA PER IL TRATTAMENTO DEI TUMORI

GENETIC ENGINEERING FOR THE TREATMENT OF CANCER

**Tesi di Laurea di:
Ardian Halimi**

**Docente Referente
Chiar.mo Prof
Giorgia Gioacchini**

Sessione autunnale dicembre 2023

Anno Accademico 2022/2023

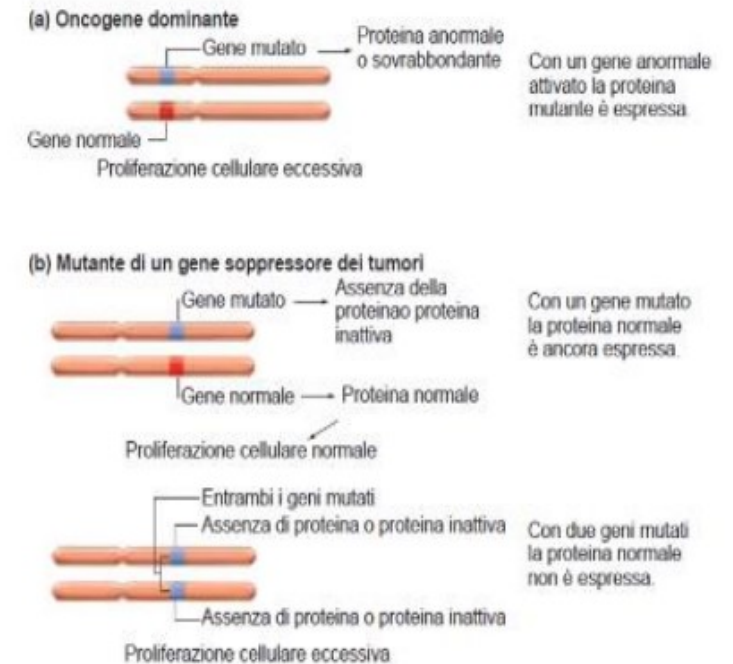
SCOPO DELLA TESI:

- Spiegazione dei principi di base dell'ingegneria genetica e le sue applicazioni in campo medico
- Introduzione al DNA, alle terapie geniche e i loro approcci
- Introduzione alle tecnologie di editing del genoma
- Considerazioni etiche e sicurezza nell'editing genico per il trattamento dei tumori

Le cellule tumorali

Il processo per il qual una cellula perde la capacità di limitare le proprie attività proliferative è definito **trasformazione neoplastica**. Le alterazioni che possono portare alla formazione di cellule tumorali possono essere dovute a:

- **Mutazioni genetiche**
- **Instabilità genomica**
- **Angiogenesi**
- **Evasione del sistema immunitario**
- **Metastasi**
- **Infiammazione**
- **Disregolazione dell'apoptosi**

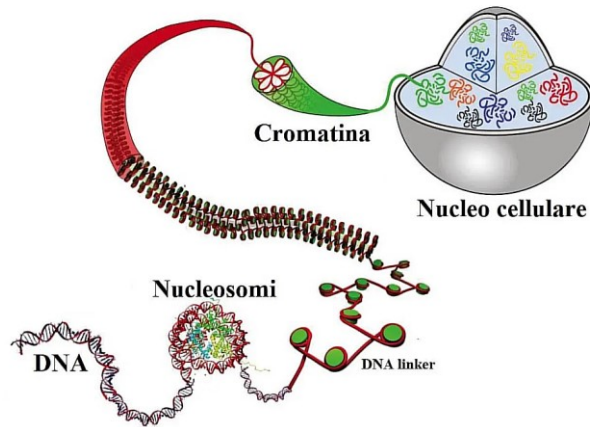


Le mutazioni vengono favorite da agenti mutageni. Possiamo suddividere in due categorie i geni delle mutazioni:

- **Oncogeni:** sono geni la cui azione normale promuove la proliferazione cellulare. Nelle cellule tumorali, le loro mutazioni con acquisizione di funzione determinano una proliferazione eccessiva o impropria.
- **Oncorepressori:** i loro prodotti inibiscono la proliferazione cellulare tumorale.

IL DNA

Il DNA o acido desossiribonucleico o deossiribonucleico è un acido nucleico che contiene le informazioni geniche, necessarie alla formazione e omeostasi degli esseri viventi attraverso la biosintesi di RNA e proteine.

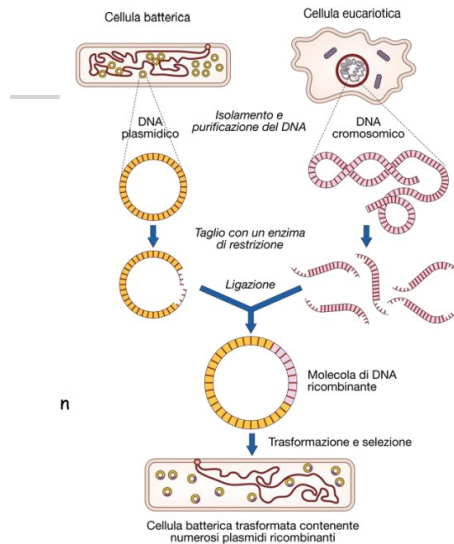


All'interno della cellula il DNA si trova in forma condensata e associata a proteine e RNA che nel complesso formano la cromatina. Essa è organizzata in nucleosomi e le proteine che la compongono sono H2A, H2B, H3, H4.

La struttura della cromatina è dinamica, il DNA attraversa diversi livelli di compattazione e questa dinamicità è regolata da specifiche modificazioni di AA nella coda N-terminale degli istoni:

- **Fosforilazioni**
- **Acetilazioni**
- **Metilazioni**

L'ingegneria genetica sfrutta questa dinamicità per isolare, clonare, modificare e trasferire geni da un organismo a un altro.

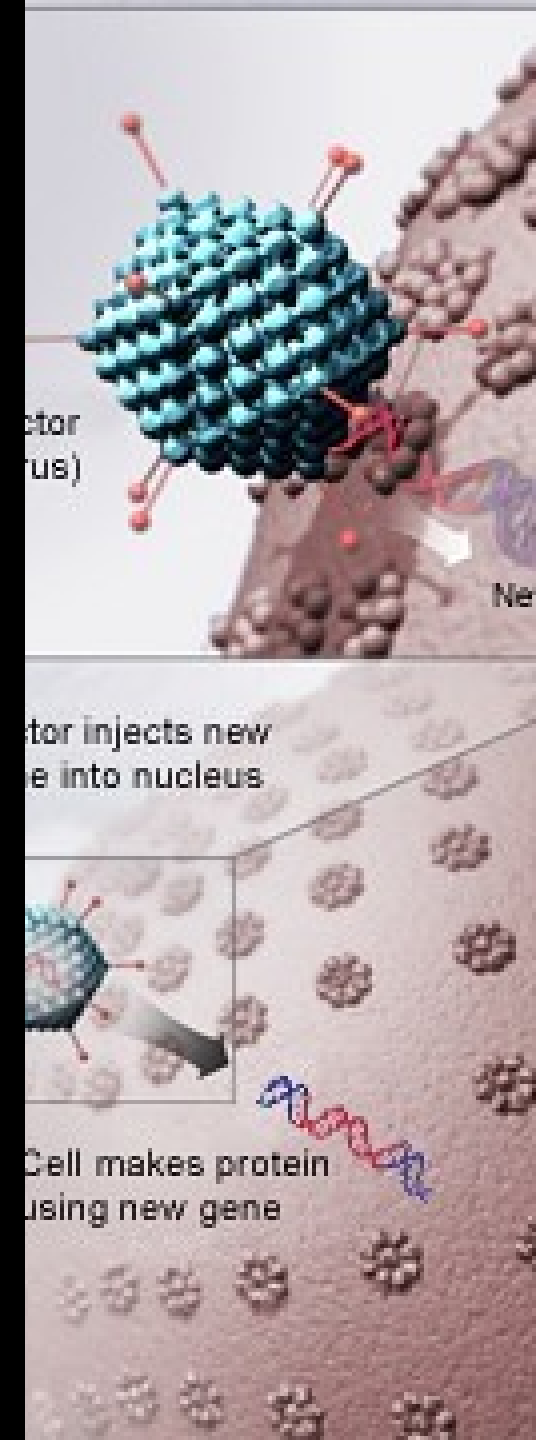


L'INGEGNERIA GENETICA PER IL TRATTAMENTO DEI TUMORI

Le terapie geniche sono un insieme di strategie terapeutiche che mirano a modificare il materiale genetico (DNA) all'interno delle cellule al fine di poter curare delle patologie, in particolare quelle di origine genetica.

Lo sviluppo di qualsiasi approccio di terapia genica richiede un'accurata valutazione di una serie di parametri:

- Scelta del gene terapeutico
- Modalità di somministrazione dei geni terapeutici
- Sistemi di trasferimento genico
- Targeting cellulare
- Persistenza del gene terapeutico
- Espressione del gene terapeutico
- Risposta immunitaria alla terapia genica



L'INGEGNERIA GENETICA PER IL TRATTAMENTO DEI TUMORI

- La modifica genetica delle cellule tumorali per la soppressione tumorale mira a modificare il materiale genetico delle cellule tumorali per bloccare la loro crescita incontrollata, indurre la morte cellulare programmata (apoptosi) o rendere le cellule tumorali più suscettibili alle terapie convenzionali come la chemioterapia.

Ci sono diverse strategie utilizzate nella modifica genetica delle cellule tumorali:

- **Introduzione di geni tumorali soppressori**
- **Inibizione di geni oncogeni**
- **Induzione di apoptosi**
- **Soppressione dell'angiogenesi**
- **Modifica delle risposte immunitarie**
- **Utilizzo di virus modificati** (per veicolare geni terapeutici nelle cellule tumorali, distruggendole o rallentandone la crescita)
- **CRISPR-Cas9 e tecniche di editing del gene**

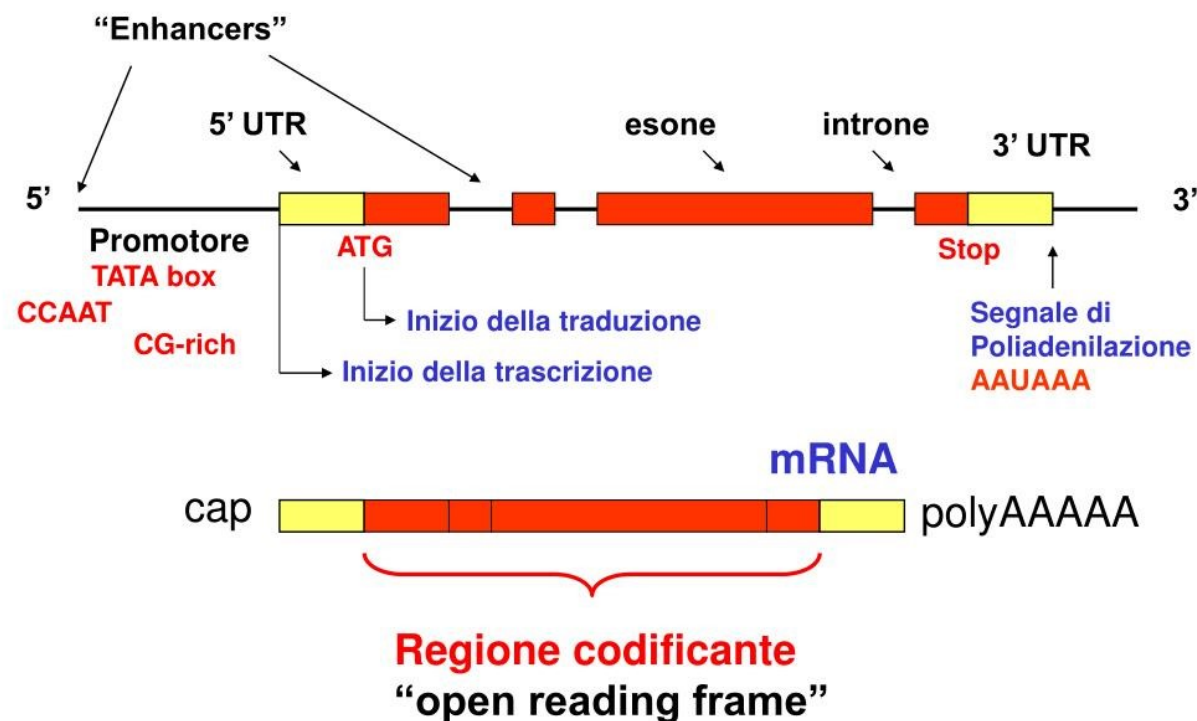


Alcuni geni noti come "geni soppressori" sono naturali inibitori della crescita cellulare e della formazione di tumori. Il ripristino o il potenziamento di queste funzioni può rallentare o arrestare la crescita delle cellule tumorali.

Alcune delle strategie utilizzate includono:

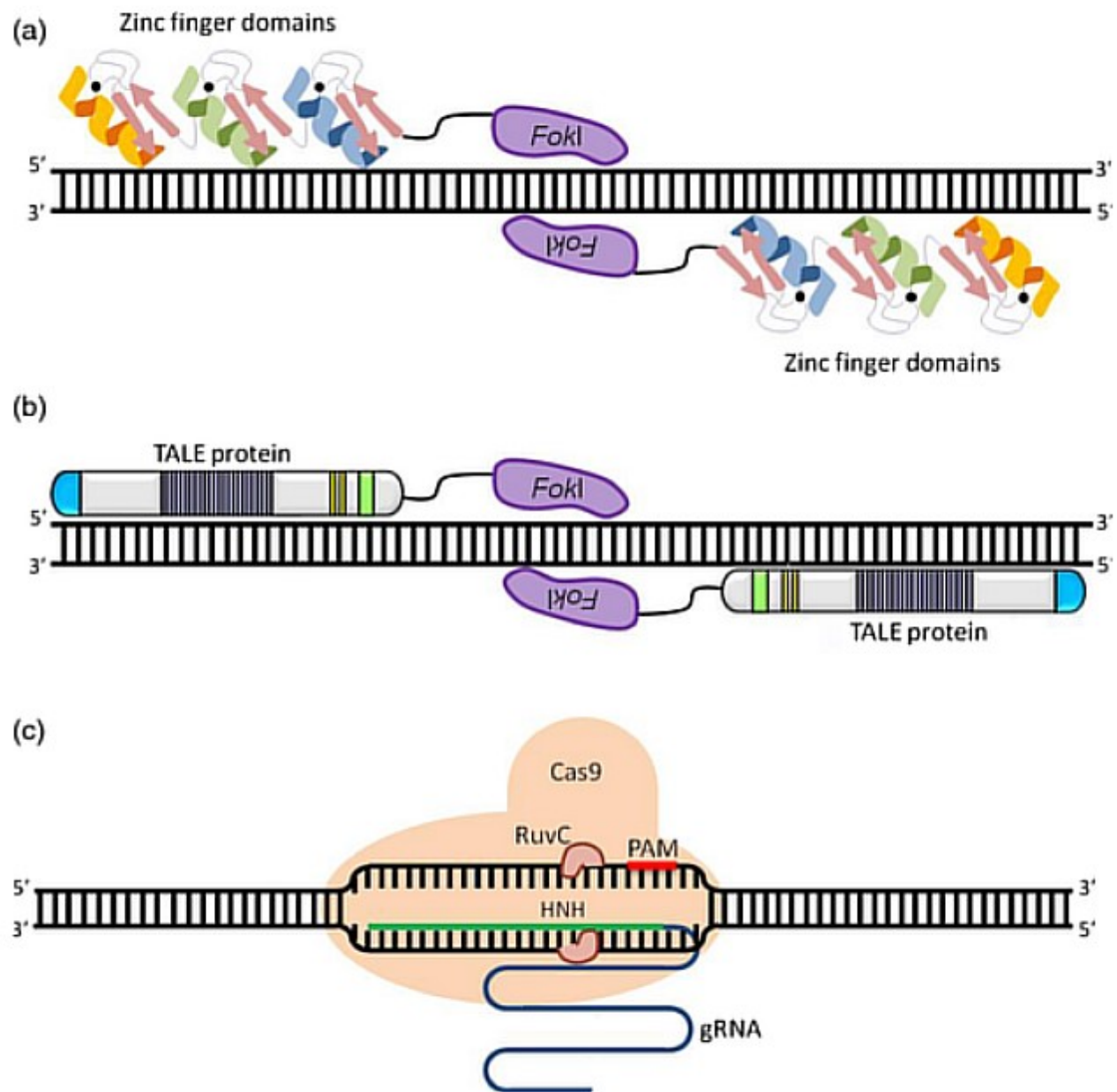
- **Introduzione di copie funzionanti dei geni soppressori tumorali**
- **Up-regulation dell'espressione genica**
- **Utilizzo di promotori potenti**
- **Inibizione di pathway di segnalazione**
- **Terapie mirate** (Alcuni farmaci sono stati sviluppati per mirare specificamente ai geni soppressori tumorali o alle vie di segnalazione ad essi associate)
- **Editing del gene**

Struttura dei geni degli eucarioti



Introduzione alle tecnologie di editing del genoma

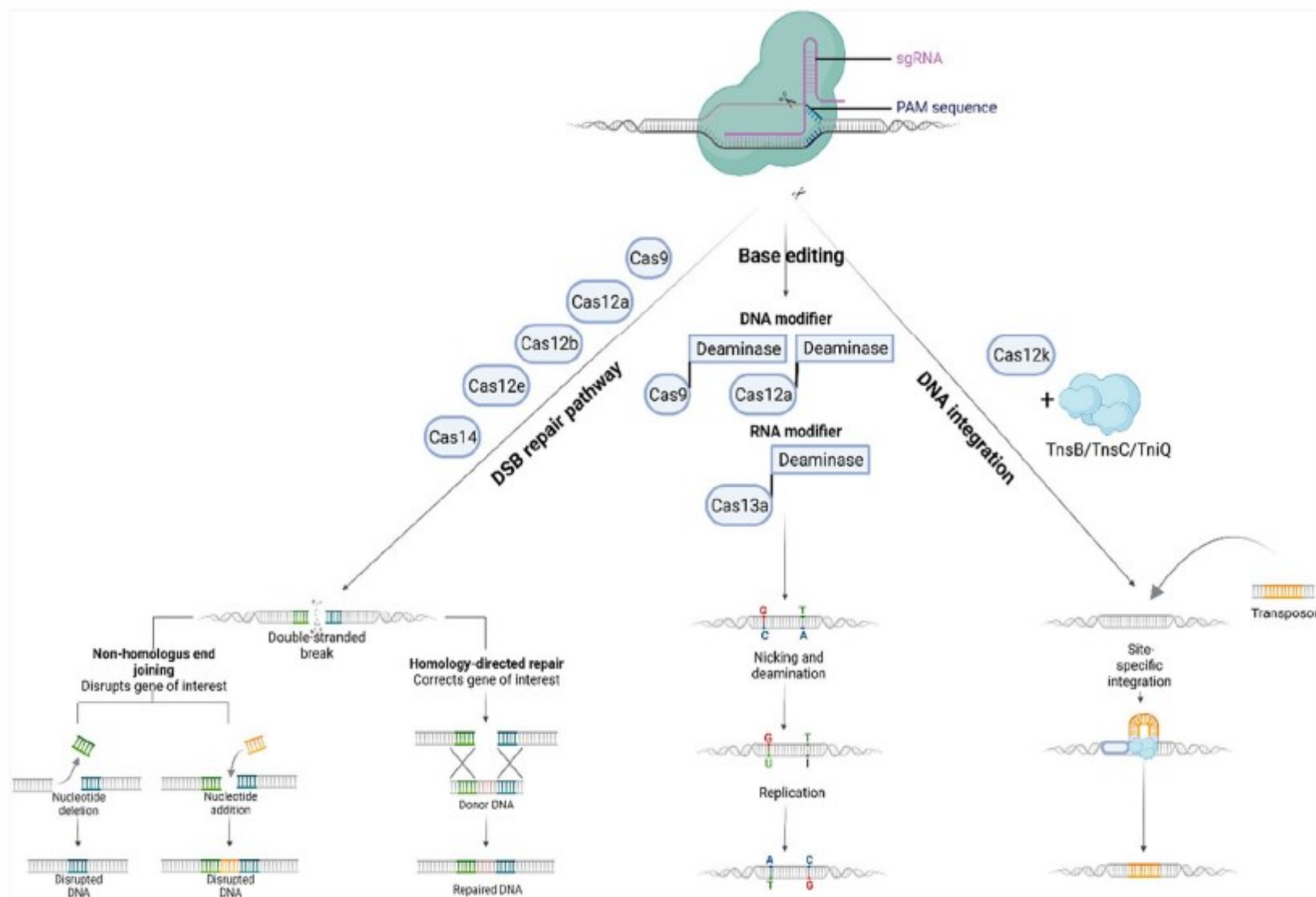
L'editing del genoma è una tecnologia che permette di modificare il DNA degli organismi viventi con precisione e specificità. Esistono diverse tecniche di editing del genoma, tra cui le più recenti sono le nucleasi ingegnerizzate, come **TALEN**, **ZFN** e **CRISPR/Cas9**. Queste tecniche usano delle proteine che funzionano come “forbici molecolari” per tagliare il DNA in un punto desiderato e poi ripararlo con o senza l’inserimento di una nuova sequenza.



Il sistema CRISPR-CAS

L'attuale sistema di classificazione CRISPR-Cas si divide sostanzialmente in due classi in base all'architettura dei complessi effettori.

- I sistemi CRISPR-Cas di classe 1 sono caratterizzati da complessi effettori composti da nucleasi Cas multi-subunità assemblate attorno a uno scheletro centrale di crRNA.
- I sistemi CRISPR di Classe 2 sono costituiti da un crRNA e una singola nucleasi Cas multi-dominio come Cas9, Cas12 e Cas13, rendendoli più adatti per applicazioni di ingegneria del genoma e del trascrittoma.

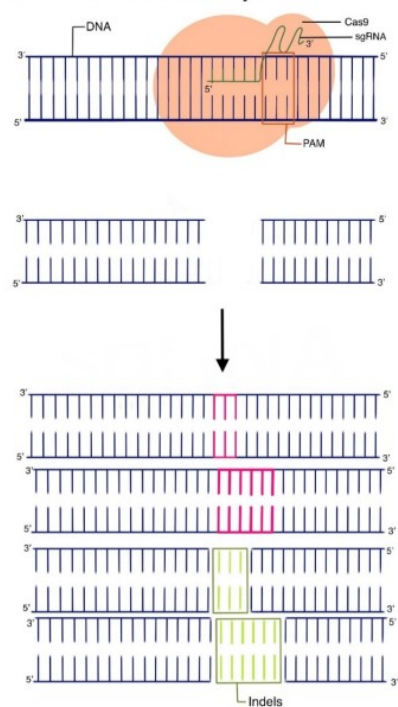


Utilizzo di CRISPR-Cas nel trattamento dei tumori

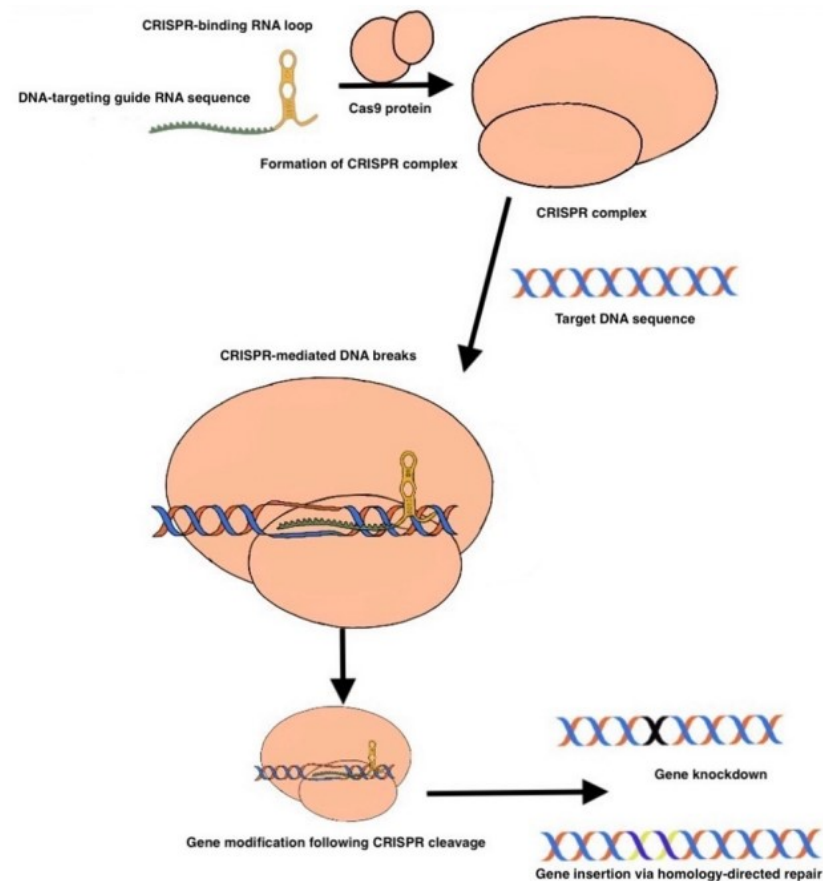
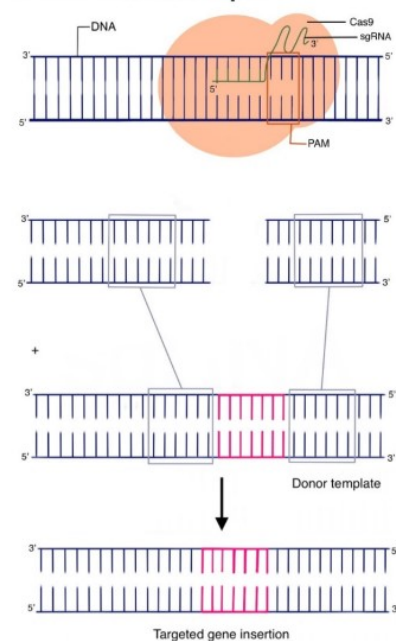
La tecnica del Crispr-cas può essere utilizzata per la diagnosi, terapia e ricerca del cancro. Essa infatti è stata applicata in ambito preclinico per studiarne il potenziale nella riparazione delle mutazioni, nell'editing genetico, nell'eliminazione degli oncogeni e nell'immunoterapia con cellule T ingegnerizzate. Questo sistema è composto da 2 componenti fondamentali:

- Rna guida (è l'anello di congiunzione tra la sequenza di DNA bersaglio e l'endonucleasi Cas9)
- Complesso proteico Cas

a. NHEJ-mediated repair



b. HDR-mediated repair



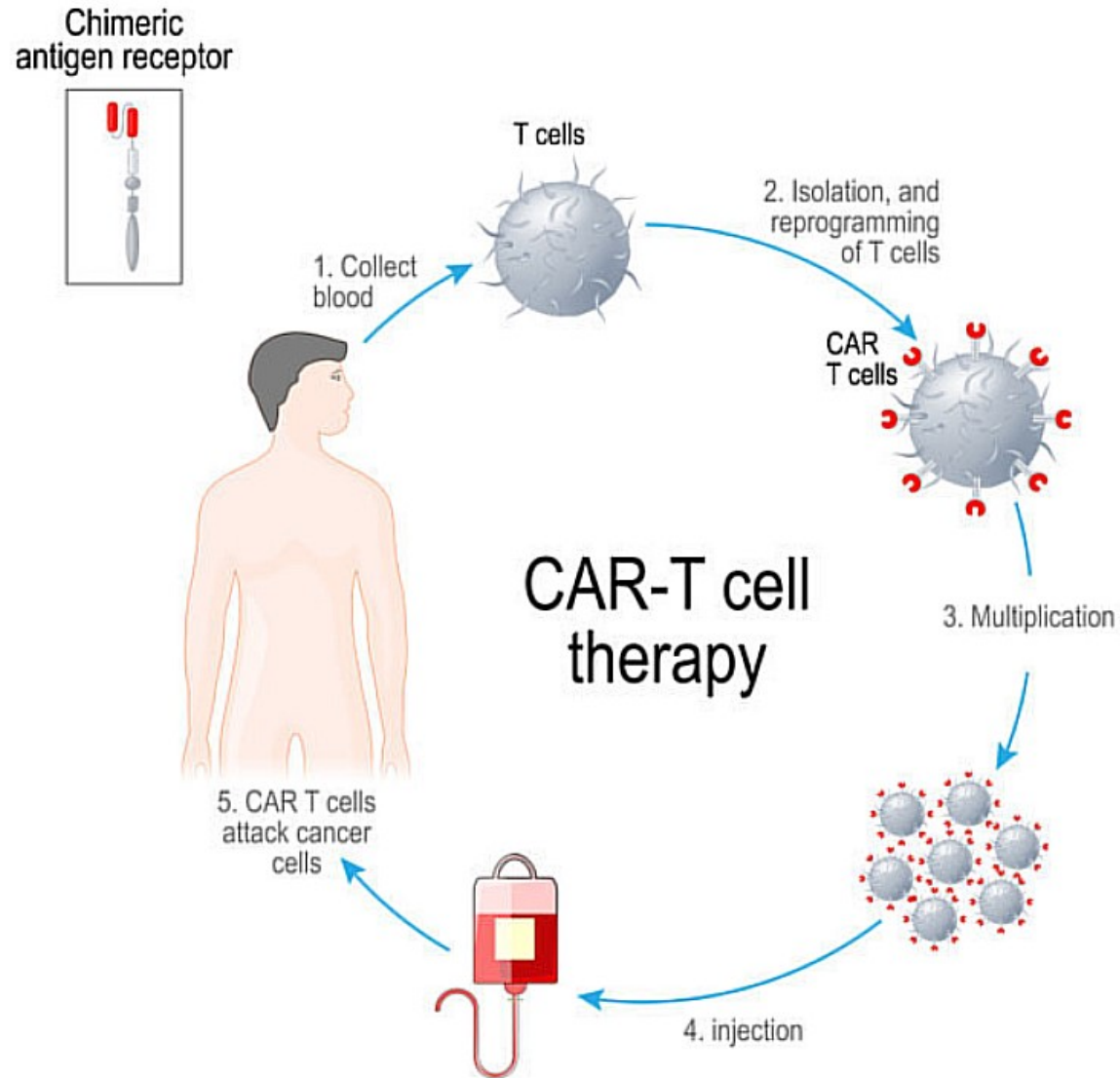
Tuttavia, il processo di editing genomico non si conclude con la scissione del DNA. Infatti le cellule sono dotate di 2 meccanismi di difesa primari contro il danno del doppio filamento di DNA.

- Non-homologous end joining (NHEJ)
- Homology-directed repair (HDR)

L'INGEGNERIA GENETICA PER IL TRATTAMENTO DEI TUMORI

Target Genes	Cancer Type	Related CRISPR Method
TERT	Glioblastoma	sgRNA and Cas9-fused adenine base editor
TP53	Prostate cancer	sgRNA and Cas9-fused adenine base editor
PKC	Colon cancer	sgRNA and Cas9-fused adenine base editor
Genes on non-metastatic cancer cell line	Lung metastases	Evaluate gene phenotypes via knockdown
Colorectal cancer driver genes	Intestinal tumors	Evaluate gene phenotypes via knockdown
Novel gene involved in PD-1 resistance	Melanoma	Evaluate gene phenotypes via knockdown
CTLA-4	Bladder cancer	Evaluate gene phenotypes via knockdown
EGFR	NSCLC	Blocked the tumor PTEN gene
KRAS, BRAF	Colorectal	Genome screening of novel pathways
RPL15	Breast cancer metastasis	Genome screening of novel pathways
FASN	Breast cancer	Knockdown
PARP1	Breast cancer	Genome screening of novel pathways
ER β	Prostate cancer	Genome screening of novel pathways

Immunoterapia e ingegnerizzazione delle cellule T



CRISPR-Cas può essere usato per potenziare le cellule del sistema immunitario, come i linfociti T, e renderle in grado di riconoscere e distruggere le cellule tumorali. Alcuni studi clinici hanno dimostrato la fattibilità e la sicurezza di questo approccio, che combina CRISPR-Cas con le terapie CAR-T, basate sull'inserimento di un recettore sintetico nelle cellule T1. Questa strategia prevede il prelievo delle cellule T dal paziente, la loro modifica genetica in laboratorio con CRISPR-Cas e il loro reinserimento nell'organismo. CRISPR-Cas viene usato per eliminare alcuni geni che limitano l'attività delle cellule T o che le rendono vulnerabili ai meccanismi di resistenza del tumore. Inoltre, CRISPR-Cas viene usato per inserire un gene che codifica per un recettore specifico per una molecola espressa dalle cellule tumorali, in modo da indirizzare le cellule T verso il bersaglio.

Conclusione e considerazioni sulla sicurezza e sull'etica

La terapia genica nonostante sia un potente arma da utilizzare contro malattie altrettanto difficili da trattare presenta delle sfide e dei limiti che bisogna affrontare. Tra questi ci sono:

- **La specificità:** Queste terapie possono causare delle modifiche non volute in altre parti del genoma, che possono avere effetti negativi sulle cellule o sugli organismi. Questo problema è noto come off-target.
- **La sicurezza:** Ci può essere l'introduzione di mutazioni indesiderate o pericolose nel genoma, che possono avere conseguenze a breve e lungo termine o trasmissibili alle generazioni future. Questo problema è noto come mosaicismo e richiede una maggiore valutazione e monitoraggio degli effetti collaterali.
- **L'etica:** Si possono sollevare delle questioni etiche e sociali, soprattutto se applicato al genoma umano o di altre specie. Questo problema riguarda i limiti e le responsabilità dell'editing genomico, che possono avere implicazioni sulla biodiversità, sulla salute, sui diritti e sulle normative.

In conclusione l'ingegneria genetica rappresenta una tecnologia capace di offrire nuove speranze e soluzioni per i pazienti affetti da tumori. Tuttavia, si tratta anche di una scienza complessa e delicata, che richiede una rigorosa sperimentazione, regolamentazione etica e una comunicazione efficace. Essa coinvolge scienziati, medici, pazienti e società. Solo con collaborazione e un responsabile utilizzo di essa si potranno sfruttare al meglio le opportunità e affrontare le criticità di questa rivoluzione biotecnologica.

Bibliografia

«The Potential Revolution of Cancer Treatment with CRISPR Technology»

Dimitrios Stefanoudakis, Nikhita Kathuria-Prakash , Alexander W. Sun, Melissa Abel, Claire E. Drolen, Camille Ashbaugh, Shiliang Zhang, Gavin Hui, Yeganeh A. Tabatabaei, Yuliya Zektser, Lidia P. Lopez, Allan Pantuck and Alexandra Drakaki.

Cancers 2023, 15, 1813.

<https://doi.org/10.3390/cancers15061813>

«An Update on the Application of CRISPR Technology in Clinical Practice»

Firouzeh Morshedzadeh, Mahmoud Ghanei, Malihe Lotf, Morteza Ghasemi, Mohsen Ahmadi, Parisa Najari-Hanjani Samaneh Sharif, Sina Mozafari-Jovin, Maryam Peymani, Mohammad Reza Abbaszadegan

Molecular Biotechnology

<https://doi.org/10.1007/s12033-023-00724-z>

« TERAPIA GENICA»

MAURO GIACCA

Centro Internazionale di Ingegneria Genetica e Biotecnologia (ICGEB) Trieste

ISBN 978-88-470-1988-1 e-ISBN 978-88-470-1989-8 DOI 10.1007/978-88-470-1989-8

© Springer-Verlag Italia 2011

RINGRANZIAMENTI

A te, che hai visto in me, il tuo sogno.

- Papà, mamma, vorrei ringraziarvi di cuore per essere sempre stati al mio fianco durante questo percorso di studi. Il vostro amore, il vostro sostegno e la vostra pazienza sono stati la spinta che mi ha portato a raggiungere questo traguardo. Grazie per aver creduto in me e per avermi incoraggiato nei momenti difficili. Il vostro costante supporto è stato fondamentale. Oggi, la mia laurea è anche merito vostro. Siete la mia fonte di ispirazione più grande. Vi amo tanto e apprezzo tutto quello che avete fatto per me.
- Ora mi rivolgo a te Resul. Tutti ci considerano fratelli, ma per me sei anche un amico e un compagno nel percorso che ha segnato la mia vita. Sei la persona più buona e solare che io conosca. Non cambiare mai perché il mondo ha bisogno della tua luce.
- Benny, non basterebbero 100 diapositive per esprimere la gratitudine, l'amore e la felicità che mi doni ogni giorno. Grazie anche a te per esserci stata sempre. Siamo cresciuti insieme e sono sicuro che invecchieremo insieme.
- Vorrei ringraziare anche Dina, Silvia e Alessandro. Tanti anni fa voi mi avete accolto nella vostra famiglia come un figlio/fratello. Spero un giorno di poter ricambiare tutto l'affetto che mi avete donato. P.S Tra poco ci sarà il pranzo di Natale, qualcuno ci aiuti.
- Rocco, Rey. Nonostante ci sono stati periodi in cui non ci siamo sentiti per anni, quando ci rincontriamo sembra che non sia passato nemmeno un giorno. Siete i fratelli acquisiti che la vita mi ha donato e gli amici che tutti vorrebbero.
- Infine vorrei ringraziare tutti voi. Se siete qui è perché avete segnato un percorso della mia vita. Avete reso questo giorno indimenticabile. La vostra presenza è speciale.

Grazie anche alla prof Gioacchini, che con pazienza, gentilezza e disponibilità ha reso possibile la stesura di questa tesi.