



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE**

**TRAPIANTO ED ELIMINAZIONE DI CROMOSOMI UMANI E
POSSIBILI APPLICAZIONI**

**TRANSPLANTATION AND ELIMINATION OF HUMAN
CHROMOSOMES AND POSSIBLE APPLICATIONS**

Tesi di Laurea di:
di:

Riccardo Carbini

Docente Referente
Chiar.mo Prof.

M. Assunta Biscotti

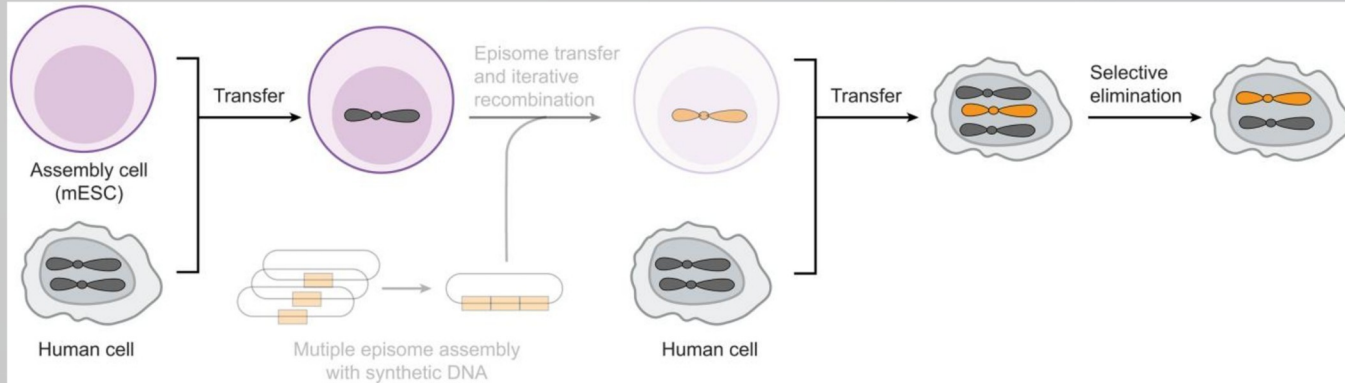
Sessione estiva

Anno Accademico 2025/26



TRAPIANTO ED ELIMINAZIONE DI CROMOSOMI UMANI E POSSIBILI APPLICAZIONI

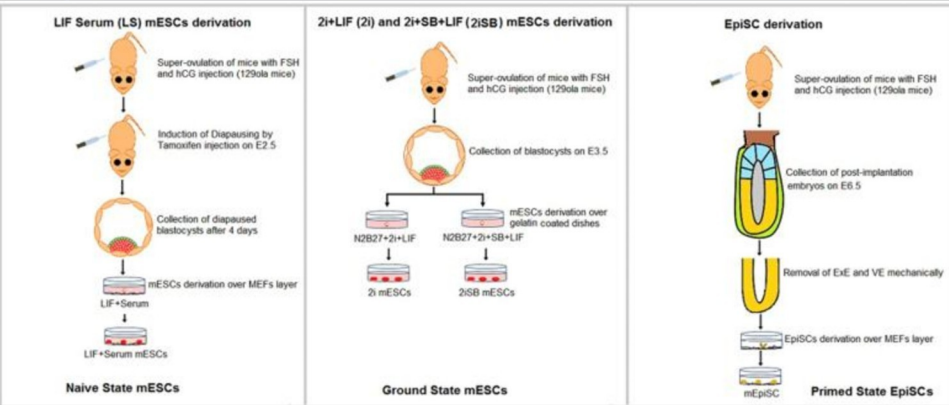
Introduzione



Cellule protagoniste

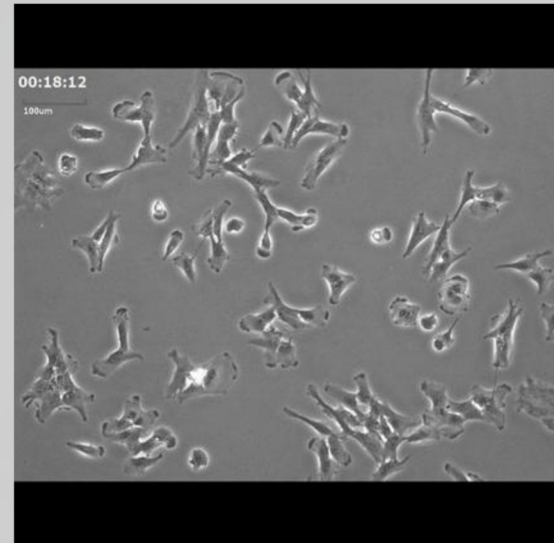
Cellule mESCS

Cellule staminali embrionali di topo utilizzate come accettore e come cellule per l'assemblaggio di cromosomi.



Cellule rpe1

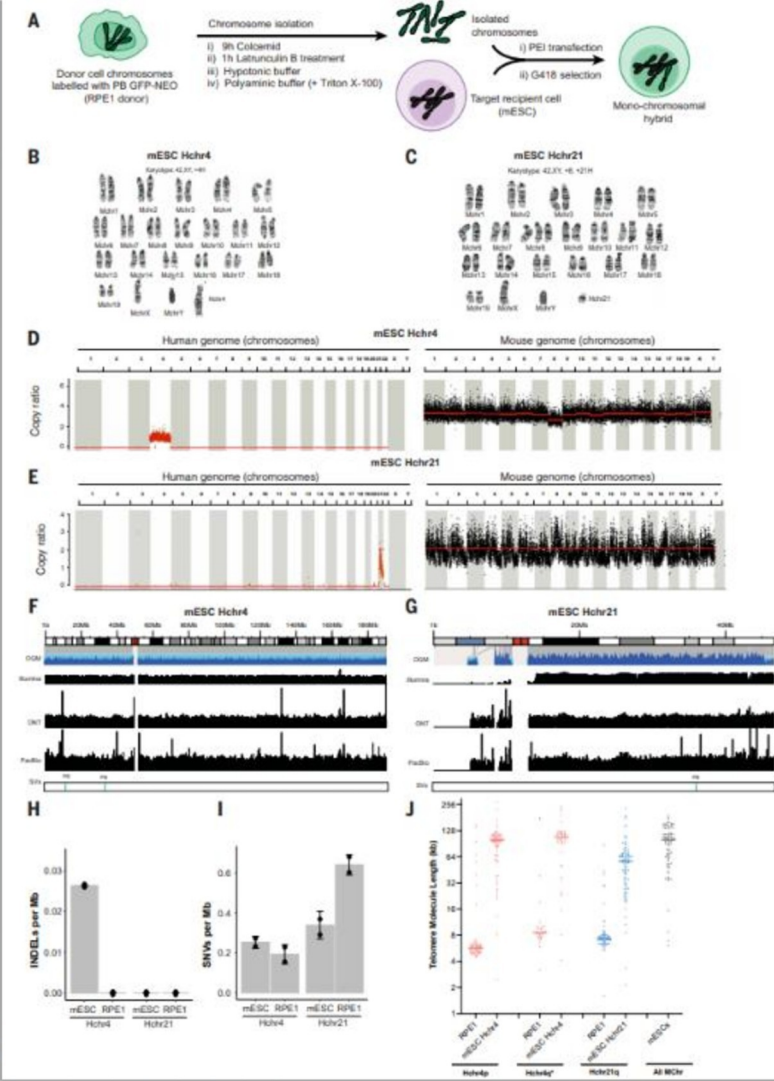
Cellule dell'epitelio retinico utilizzate come donatrici di cromosomi.



Yumi Uetake, Greenfield Sluder (2011) CIL:35201, Homo sapiens, retinal pigment epithelium. CIL. Dataset. (RRID:SCR_003510). <https://doi.org/doi:10.7295/W9CIL352>

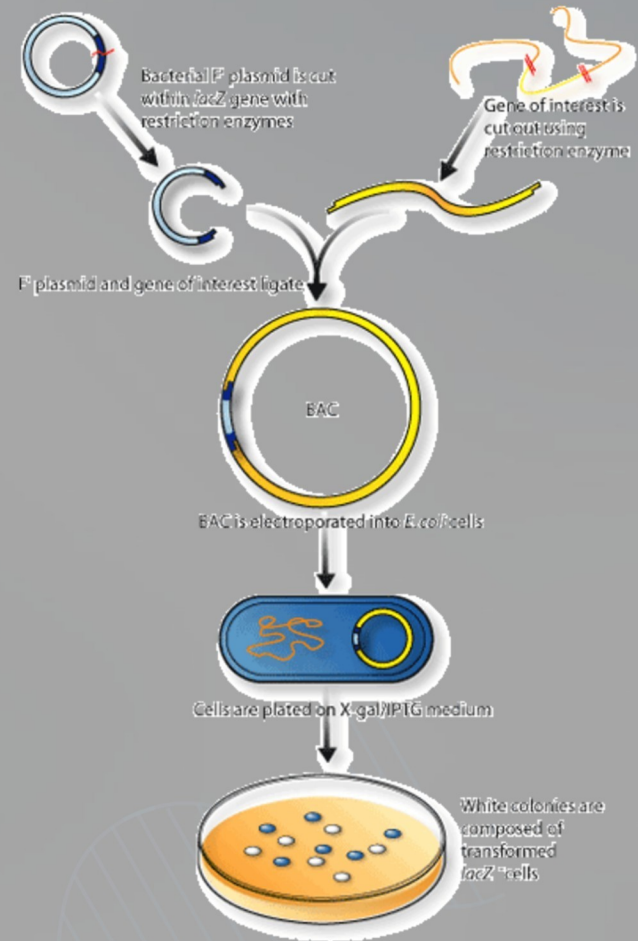
Trasferimento di cromosoma dalle cellule rpe1 alle mESCs

- Transfezione del cromosoma nelle mESCs in polietilammina con efficienza di $\sim 10^{-6}$.
- Stabilità nel mantenimento del cromosoma umano con basso tasso di mutazione.
- Allungamento dei telomeri umani fino a raggiungere quelli delle cellule di assemblaggio.



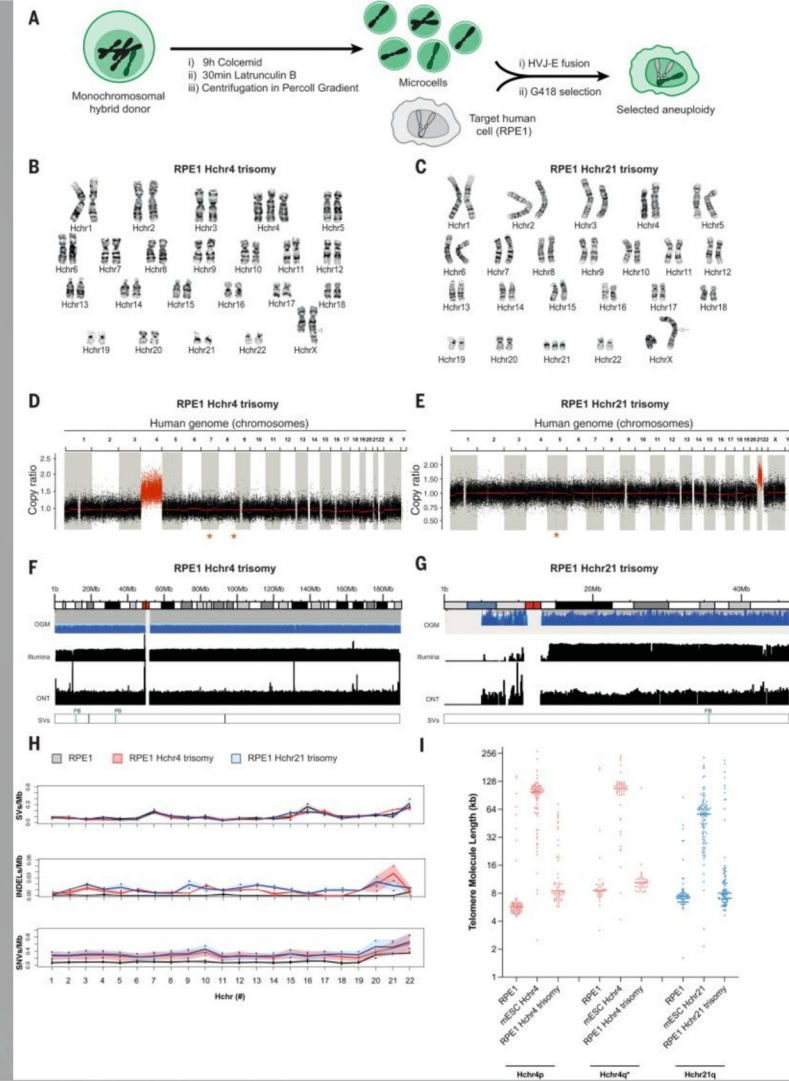
Manipolazione cromosomica in mESCs

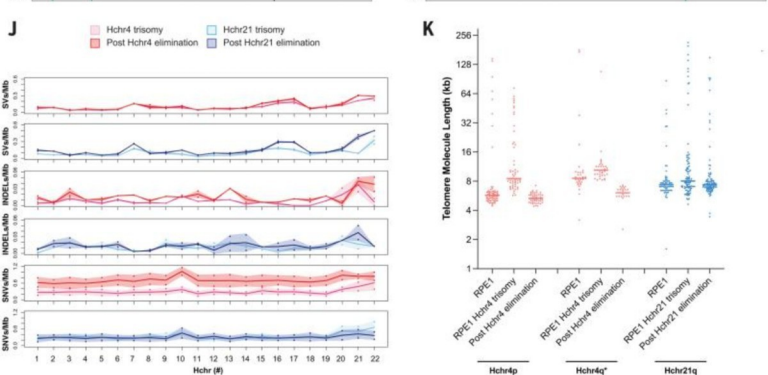
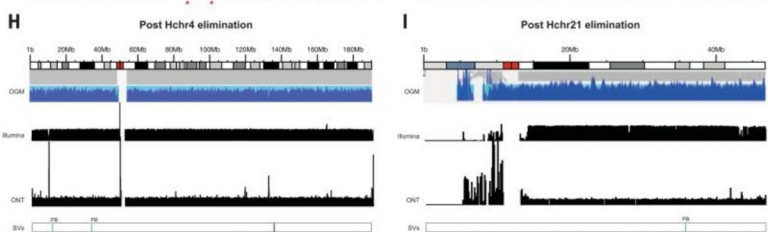
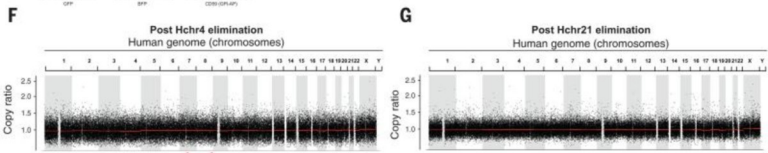
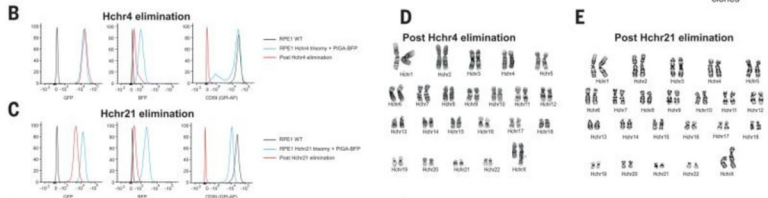
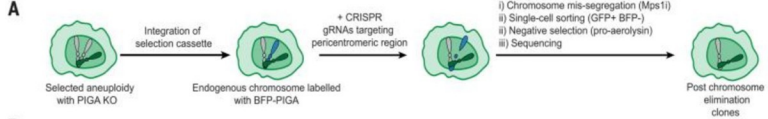
- Integrazione punto di ancoraggio con proteina fluorescente blu (BFP) e HygR (gene resistente alla rigomicina).
- Sostituzione regione di Hchr20 di 23 codoni wild type con sinonimi di DNA sintetico.
- Elettroporazione di BAC contenente marcatori silenti e una cassetta di selezione codificante mCherry e PuroR, seguito da taglio con cas9.
- Integrazione del DNA sintetico confermata da genotipizzazione provata ulteriormente da citometria a flusso e ONT.



Trasferimento dalle mESCs alle cellule umane

- R-MMCT usando microcellule fuse con particelle del virus Sendai.
- Aneuploidia intatta e stabile.
- Lunghezza telomeri pari al wild type di rpe1 con alcune eccezioni.
- Efficienza di trasferimento di $\sim 10^{-6}$.

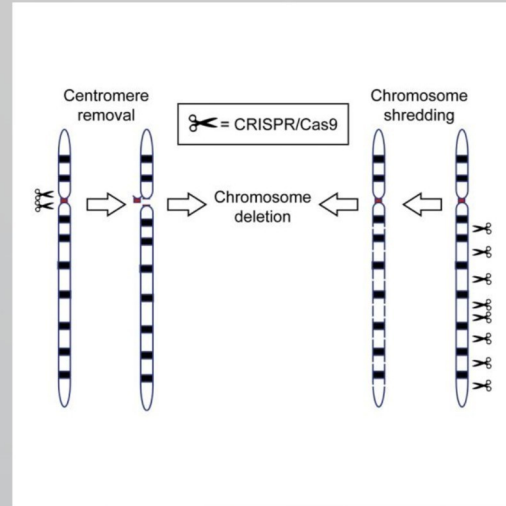




Delezione del cromosoma

Crispr cas-9

- Si prende di mira la sequenza pericentromerica del cromosoma aneuploide.
- La delezione del cromosoma difettivo viene effettuata con la tecnica Crispr cas-9.
- Eliminare le aneuploidie precedentemente generate.



Conclusioni

Possibili applicazioni

- Possibilità di curare malattie che necessitano la rimozione di grandi regioni regolatorie.
- Riduzione del rischio di causare danni al DNA sostituendo l'intero cromosoma.

Bibliografia

- Gianluca Petri et al. High-fidelity human chromosome transfer and elimination. *Science*. 390(6638):1038-1043(2025). DOI:10.1126/science.adv9797
- Adikusuma F, Williams N, Grutzner F, Hughes J, Thomas P. Targeted Deletion of an Entire Chromosome Using CRISPR/Cas9. *Mol Ther*. 2017 Aug 2;25(8):1736-1738. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.05.021. Epub 2017 Jun 17. PMID: 28633863; PMCID: PMC5542798.
- Fronk AH, Vargis E. Methods for culturing retinal pigment epithelial cells: a review of current protocols and future recommendations. *J Tissue Eng*. 2016 Jul 12;7:2041731416650838. doi: 10.1177/2041731416650838. PMID: 27493715; PMCID: PMC4959307.
- Chen CY, Cheng YY, Yen CY, Hsieh PC. Mechanisms of pluripotency maintenance in mouse embryonic stem cells. *Cell Mol Life Sci*. 2017 May;74(10):1805-1817. doi: 10.1007/s00018-016-2438-0. Epub 2016 Dec 20. PMID: 27999898; PMCID: PMC11107721.
- Ghimire, Sabitri & Van der Jeught, Margot & Neupane, Jitesh & Roost, Matthias & Anckaert, Jasper & Popovic, Mina & Nieuwerburgh, Filip & Mestdagh, Pieter & Vandesompele, Jo & Deforce, Dieter & Menten, Bjorn & Lopes, Susana & De Sutter, Petra & Heindryckx, Björn. (2018). Comparative analysis of naive, primed and ground state pluripotency in mouse embryonic stem cells originating from the same genetic background. *Scientific Reports*. 8. 10.1038/s41598-018-24051-5.
- Lupatov AY, Yarygin KN. Telomeres and Telomerase in the Control of Stem Cells. *Biomedicines*. 2022 Sep 20;10(10):2335. doi: 10.3390/biomedicines10102335. PMID: 36289597; PMCID: PMC9598777.
- Ghimire, S., Van der Jeught, M., Neupane, J. et al. Comparative analysis of naive, primed and ground state pluripotency in mouse embryonic stem cells originating from the same genetic background. *Sci Rep*. 8:5884 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24051-5>
- Xu Y, Li Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020 Sep 8;18:2401-2415. doi: 10.1016/j.csbj.2020.08.031. PMID: 33005303; PMCID: PMC7508700.
- Adikusuma F, Williams N, Grutzner F, Hughes J, Thomas P. Targeted Deletion of an Entire Chromosome Using CRISPR/Cas9. *Mol Ther*. 2017 Aug 2;25(8):1736-1738. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.05.021. Epub 2017 Jun 17. PMID: 28633863; PMCID: PMC5542798.

Riassunto

In questa ricerca viene spiegato il procedimento per effettuare il trapianto di cromosomi, utile per effettuare terapia genica al fine di curare malattie su cui ancora era impossibile agire. Si parte dalle cellule donatrici rpe1, il cui cromosoma viene trasferito in cellule staminali murine (mESCs). Queste cellule sono denominate cellule di assemblaggio, poiché riescono ad allungare i telomeri e in questo ambiente è possibile manipolare il cromosoma con Crispr-cas9. Il cromosoma ingegnerizzato viene poi trasferito a cellule umane attraverso la tecnica R-MMCT, per poi andare a rimuovere il cromosoma endogeno malato, effettuando la delezione grazie a CRISPR-cas9. In questo modo si possono andare a rimuovere grandi regioni regolatrici, superando i limiti dell'editing genetico.