

**CTF Indirizzo farmacologico
2024**

FARMACI BIOLOGICI

Prof. Patrizia Romualdi

INGEGNERIA GENETICA E DNA RICOMBINANTE
Cenni sulle metodiche impiegate

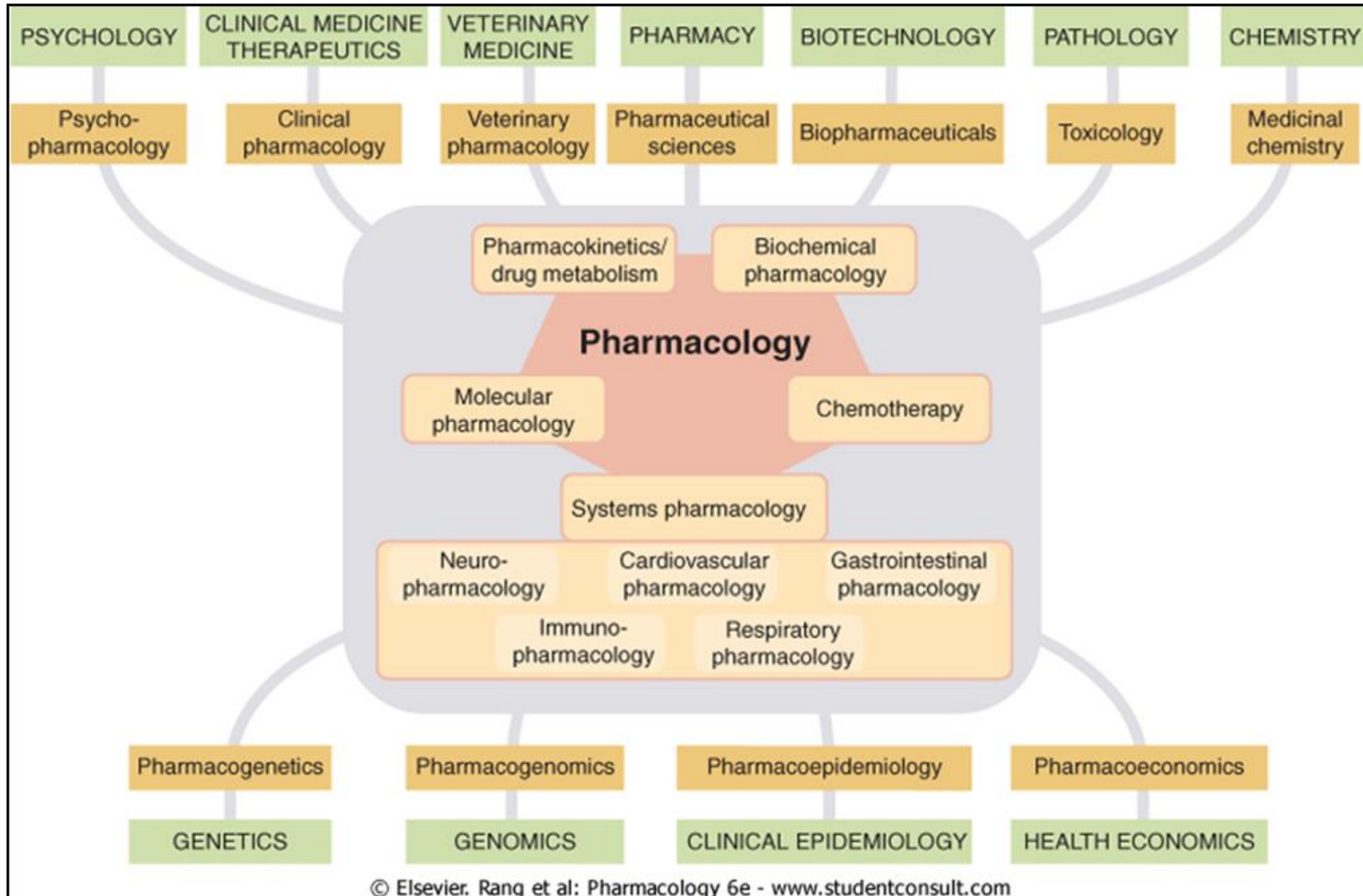
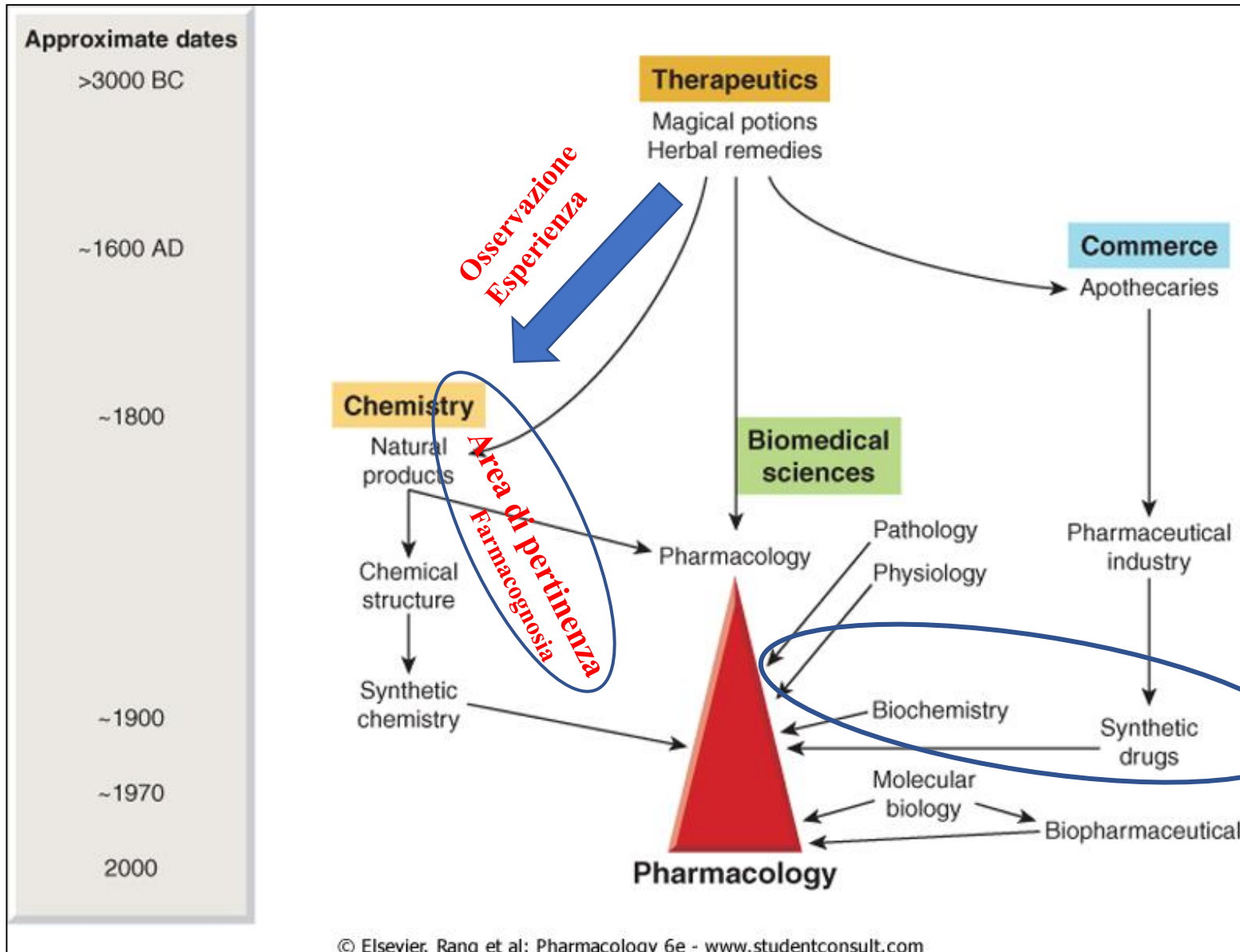
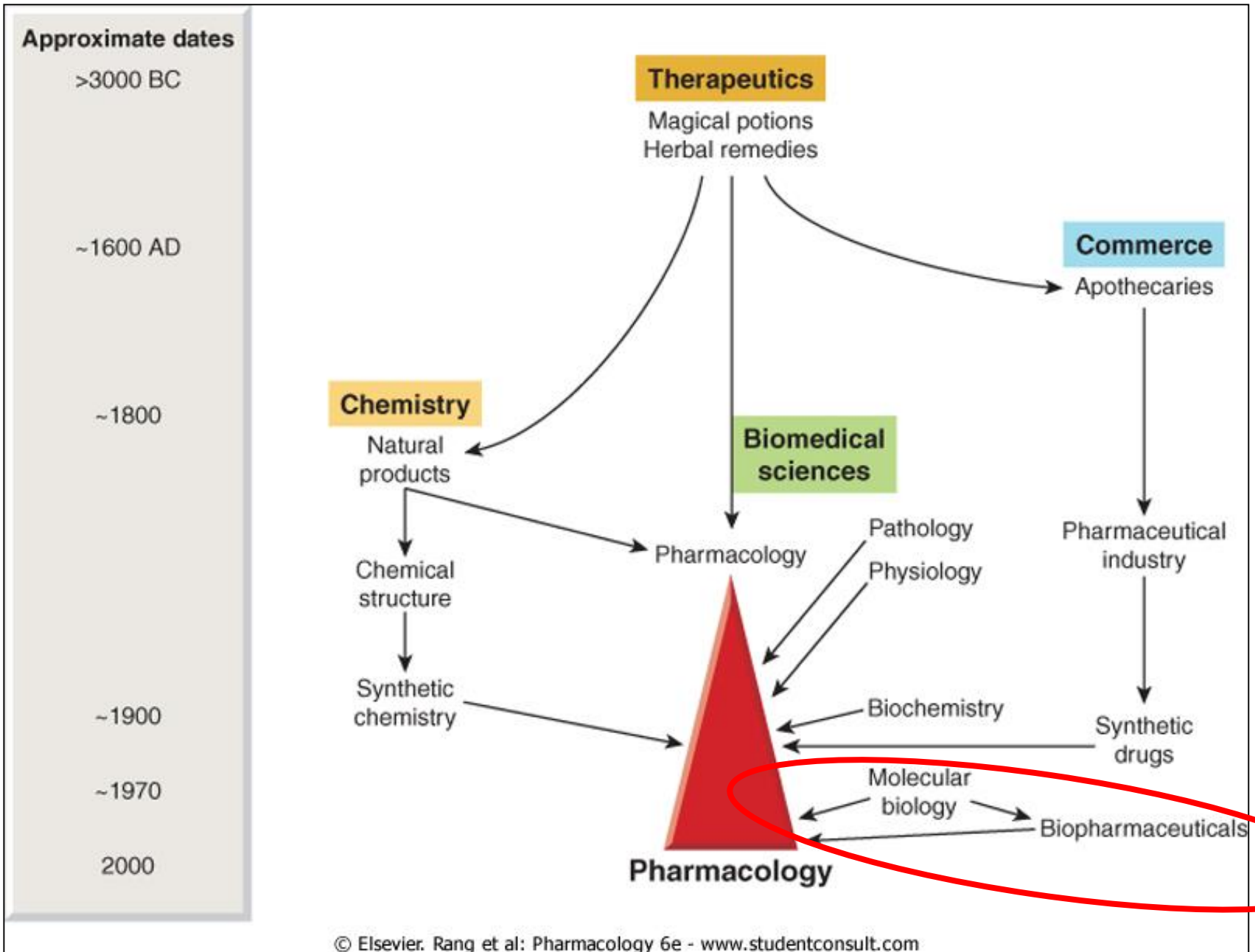


Figure 1-2 Pharmacology today with its various subdivisions. Interface disciplines (brown boxes) link pharmacology to other mainstream biomedical disciplines (green boxes).



... dai rimedi naturali ... alla farmacognosia ... ai farmaci moderni (sintesi chimica classica) ... poi

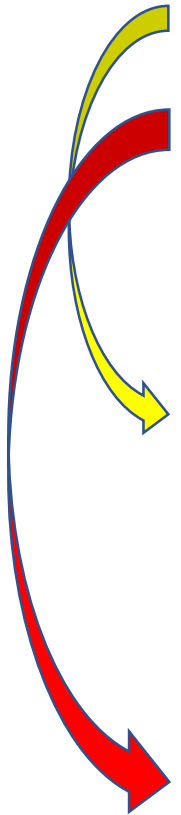


Farmaci biotecnologici

Figure 1-1 The development of pharmacology.

Il termine “farmaci biologici” fa generalmente riferimento a due categorie di composti:

- i farmaci biologici veri e propri: molecole naturali derivate dal metabolismo endogeno di sistemi biologici (batteri, piante od organismi animali);
- i farmaci biotecnologici, ossia composti prodotti da sistemi biologici, sia semplici sia complessi, ma geneticamente modificati.



emoderivati, i vaccini tradizionali o i comuni antibiotici
(estrazione, purificazione, sintesi)

Farmacognosia, chimica di sintesi classica, basso p.m. ...

anticorpi monoclonali, proteine ricombinanti, immunotossine e acidi nucleici
(tecniche del DNA ricombinante ...)

L'importanza dell'ingegneria genetica in farmacologia

Tecnologie del DNA ricombinante

La tecnica del DNA ricombinante è alla base delle moderne biotecnologie e della terapia genica

Gli scopi di questa operazione possono essere diversi:

→ **determinare un miglioramento genetico nell'individuo ricevente** (per esempio, una maggiore resistenza agli attacchi dei parassiti),

→ oppure **utilizzare l'organismo ricevente per clonare il gene introdotto e servirsi della cellula ospite come una «fabbrica» per la produzione di molecole utili.**

Si definisce ***tecnologia del DNA ricombinante*** l'insieme delle tecniche di laboratorio che consentono di isolare e tagliare brevi sequenze di DNA per trasferirle e inserirle nel genoma di altre cellule, in modo da modificarne uno o più geni.

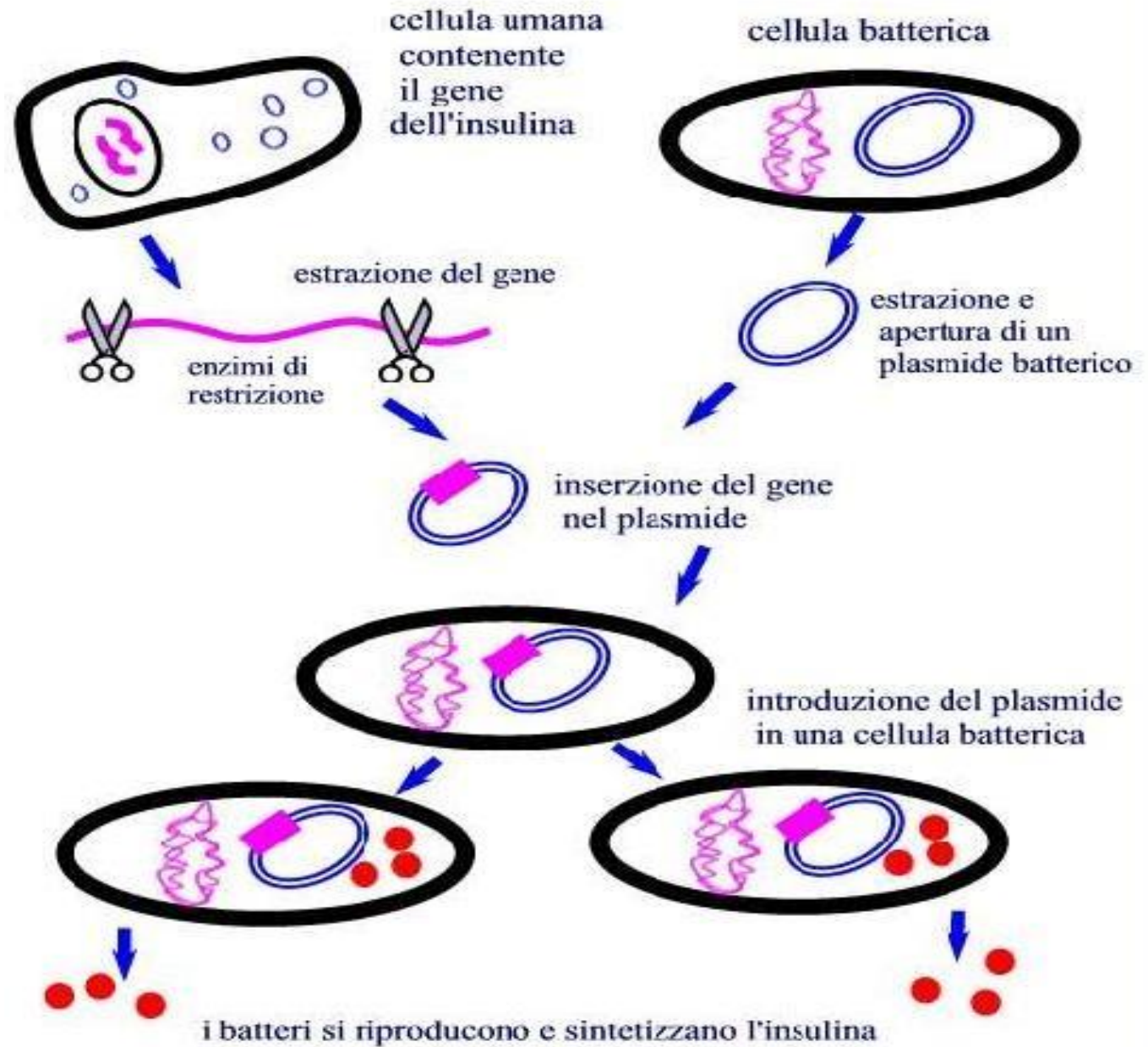
→ Questa tecnologia permette interventi mirati, che **modificano in modo specifico solo i geni dei caratteri su cui si vuole agire.**

→ Inoltre, le metodologie odierne consentono di **trasferire DNA non solo tra individui della stessa specie, ma anche tra specie diverse**, spesso molto differenti l'una dall'altra.

Es. Si possono trasferire geni da un batterio a una pianta o introdurre in un batterio un gene proveniente da una cellula eucariotica.

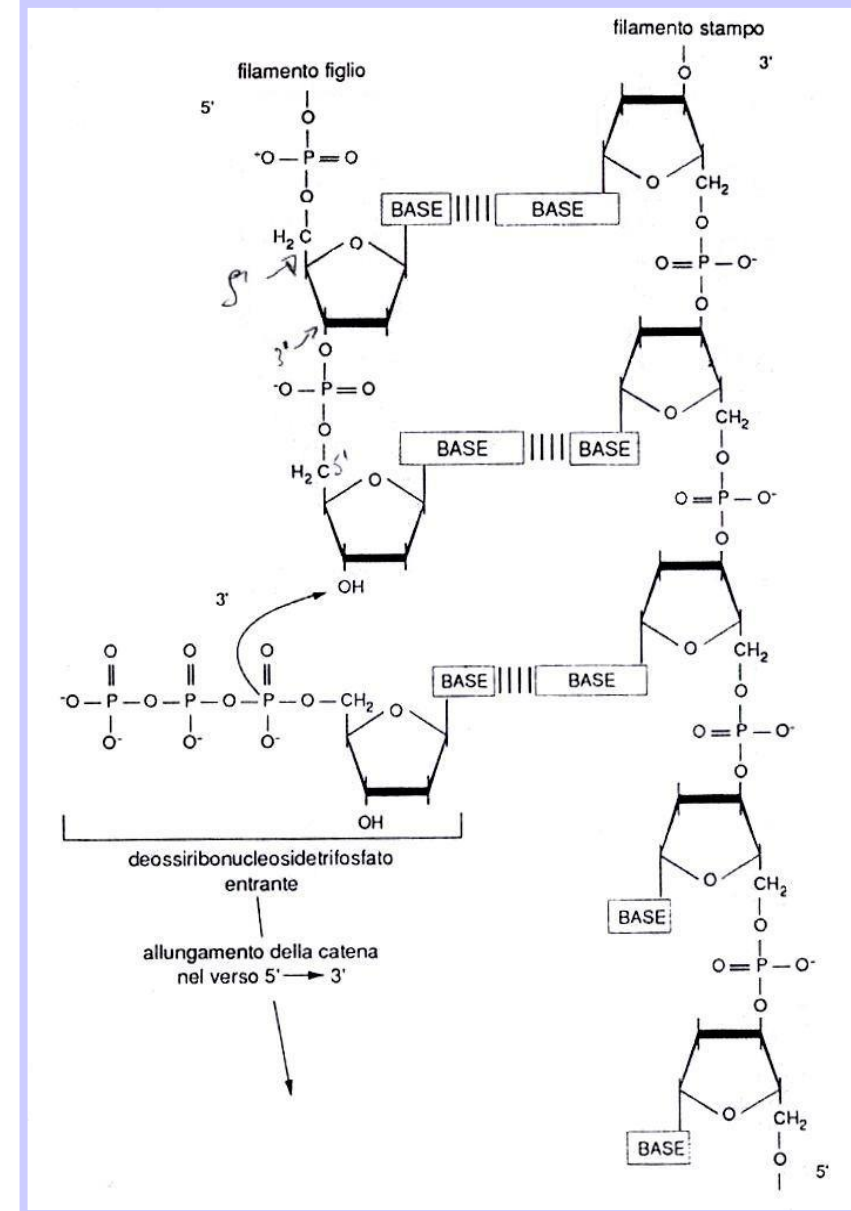
La tecnologia del DNA ricombinante consiste nel:

- **identificare il gene;**
- **tagliarlo e isolarlo** dalla molecola del DNA;
- **unire il gene a un vettore** a sua volta costituito da DNA;
- **trasferirlo all'interno di una cellula ricevente.**



Tecnologia del DNA ricombinante: *insieme di tecniche*

- ✓ (scissione DNA da enzimi di restrizione)
- ✓ (ibridizzazione di ac. nucleici per identif. sequenze DNA o RNA)
- ✓ (clonazione DNA o inserimento framm. in virus o plasmidi per l'amplificazione in batteri o lieviti)
- ✓ (sequenziamento o determ. seq. di un framm. clonato)
- Clonazione
- isolamento di geni
- ibridizzazione di acidi nucleici (su membrana --- NB, SB
proteine --- WB
in situ --- ISH)



Tecniche del DNA ricombinante

Consistono nella creazione di molecole di DNA costituite dalla combinazione di frammenti di origine diversa grazie all'impiego di

enzimi di restrizione (endonucleasi)

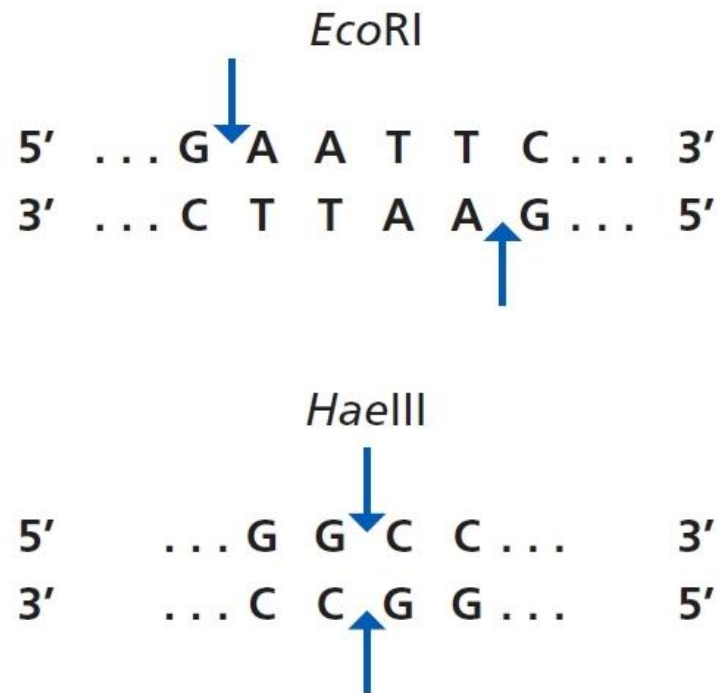


Figura 8.1 Siti di restrizione degli enzimi *EcoRI* e *HaeIII*.

Enzimi batterici in grado di scindere in entrambi i filamenti di DNA il legame fosfodiesterico che lega un nucleotide con il successivo; il taglio non è casuale ma avviene sulla doppia elica del DNA a livello di sequenze di 4-6 nucleotidi con struttura palindromica

Arber, Smith, Nathans
Nobel medicina-fisiologia 1978

Esempi di enzimi di restrizione

Microrganismo	Enzima di restrizione	Sequenza bersaglio
<i>Anabaena variabilis</i>	<i>Ava</i> I	C [▼] PyCGPuG
<i>Bacillus amyloliquefacens</i> H	<i>Bam</i> HI	G [▼] GATCC
<i>Bacillus albinum</i>	<i>Bg</i> /II	A [▼] GATCT
<i>Brevibacterium albinum</i>	<i>Ba</i> /I	TGG [▼] CCA
<i>Escherichia coli</i> RY13	<i>Eco</i> RI	G [▼] AATTC
<i>Escherichia coli</i> R245	<i>Eco</i> RII	▼CCAGG
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>Hae</i> II	PuG [▼] CGC [▼] Py
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>Hae</i> III	G [▼] CC
<i>Haemophilus haemophilus</i>	<i>Hha</i> I	G [▼] CGC
<i>Haemophilus influenzae</i> RD	<i>Hind</i> II	GTP [▼] PyPuAC
<i>Haemophilus influenzae</i> RD	<i>Hind</i> III	A [▼] AGCTT
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Hpa</i> I	GTT [▼] AAC
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Hpa</i> II	C [▼] CGG
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Kpn</i> I	GGTAC [▼] E
<i>Moraxella bovis</i>	<i>Mbo</i> I	▼GATC
<i>Providencia stuartii</i>	<i>Pst</i> I	CTGCAG [▼]
<i>Streptomyces albus</i>	<i>Sa</i> /I	G [▼] TCGAC
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Sma</i> I	CCC [▼] GGG
<i>Xanthomonas malvacearum</i>	<i>Xma</i> I	▼CCGGG

Progetto Genoma
Umano (2003) -
2,7 mld \$

Metodo di Sanger
(+ elettroforesi capillare + PCR)

Sequenziamento
completo del
genoma: 13 anni

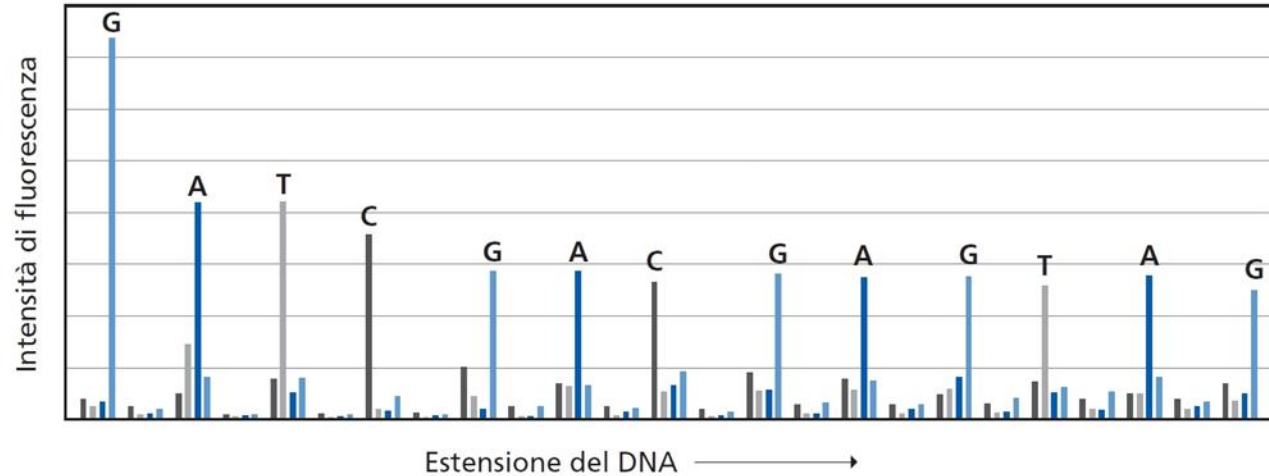
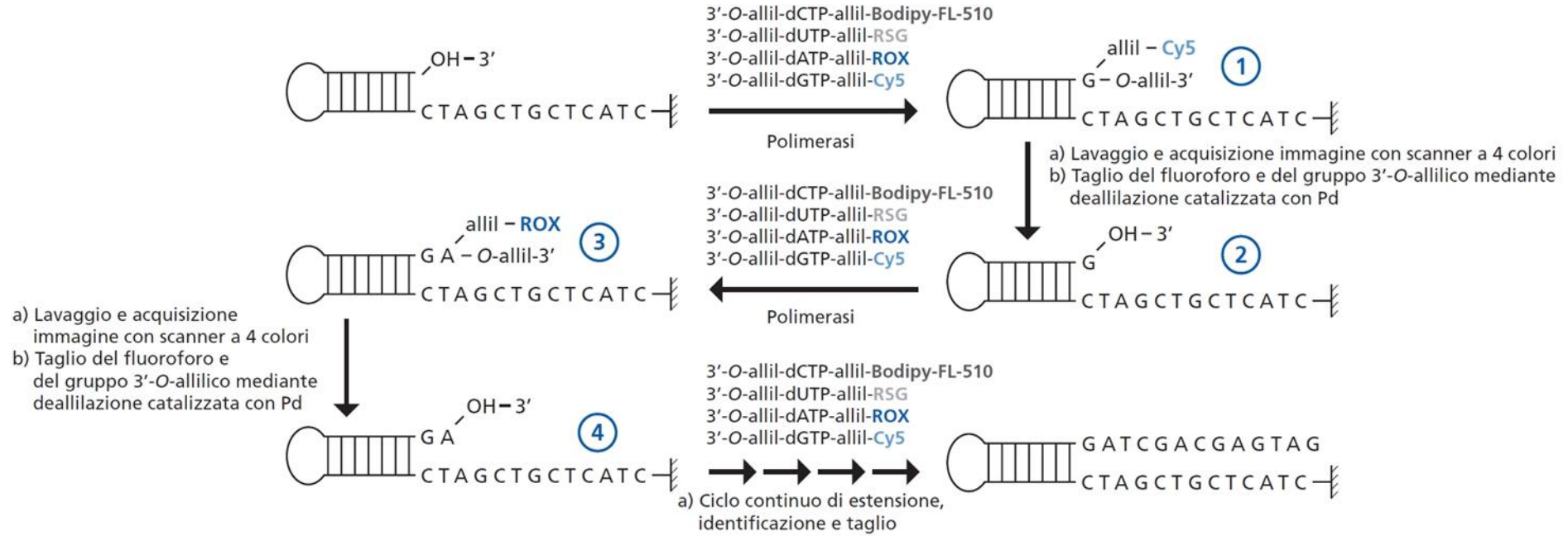


Figura 3.2 Rappresentazione schematica del processo di sequenziamento.

Figura 3.3 Schema delle fasi di preparazione del campione per le analisi tramite NGS.

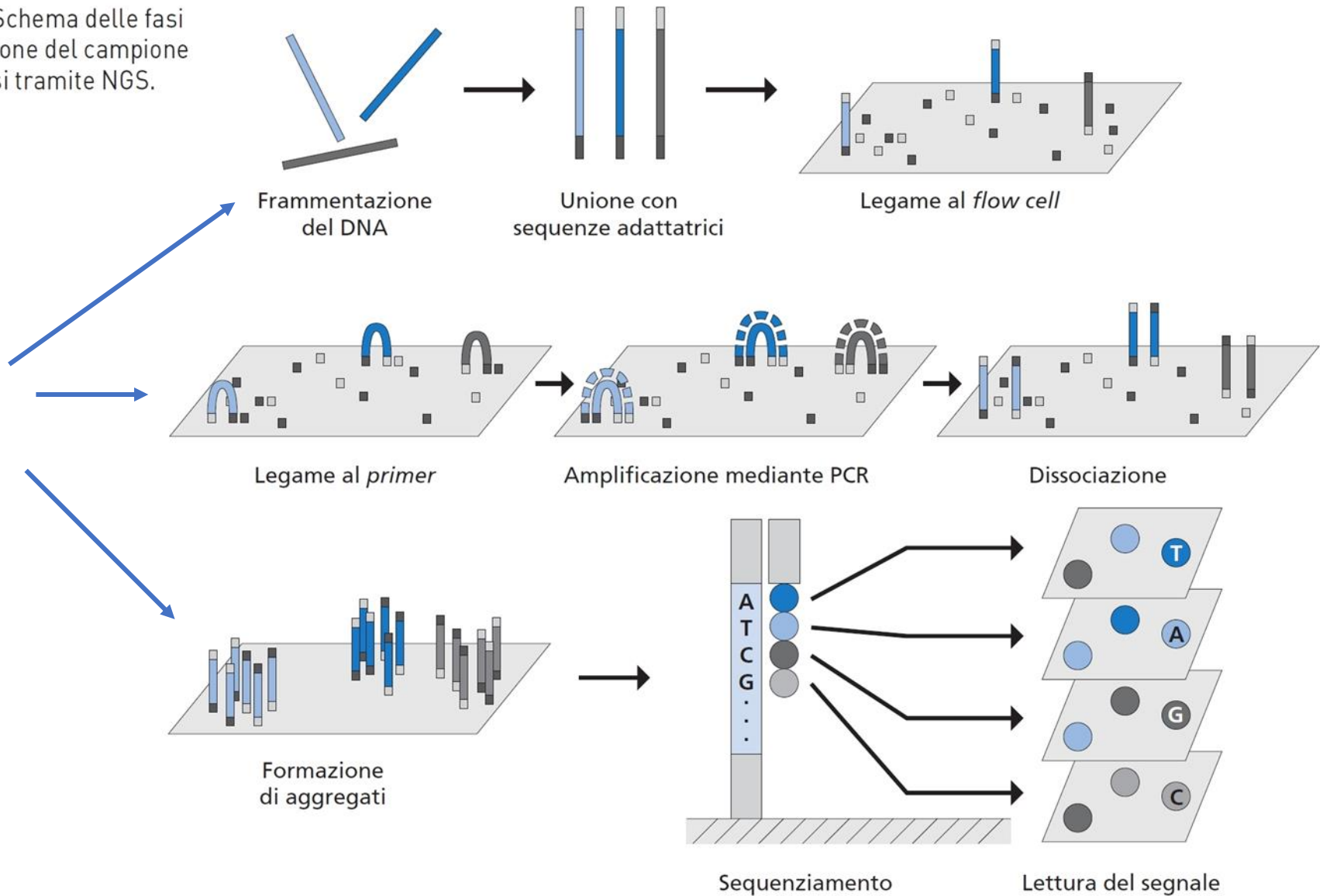
Progetto ENCODE →
(Encyclopedia of DNA Elements)
2005

NGS (Next Generation Sequencing)
Sequenziamento
genoma umano

5 mesi; 1,5 mln \$

Oggi

genoma di una persona:
ca 60 gg e ca 5000 \$



+ analisi bioinformatica

Le tecnologie omiche

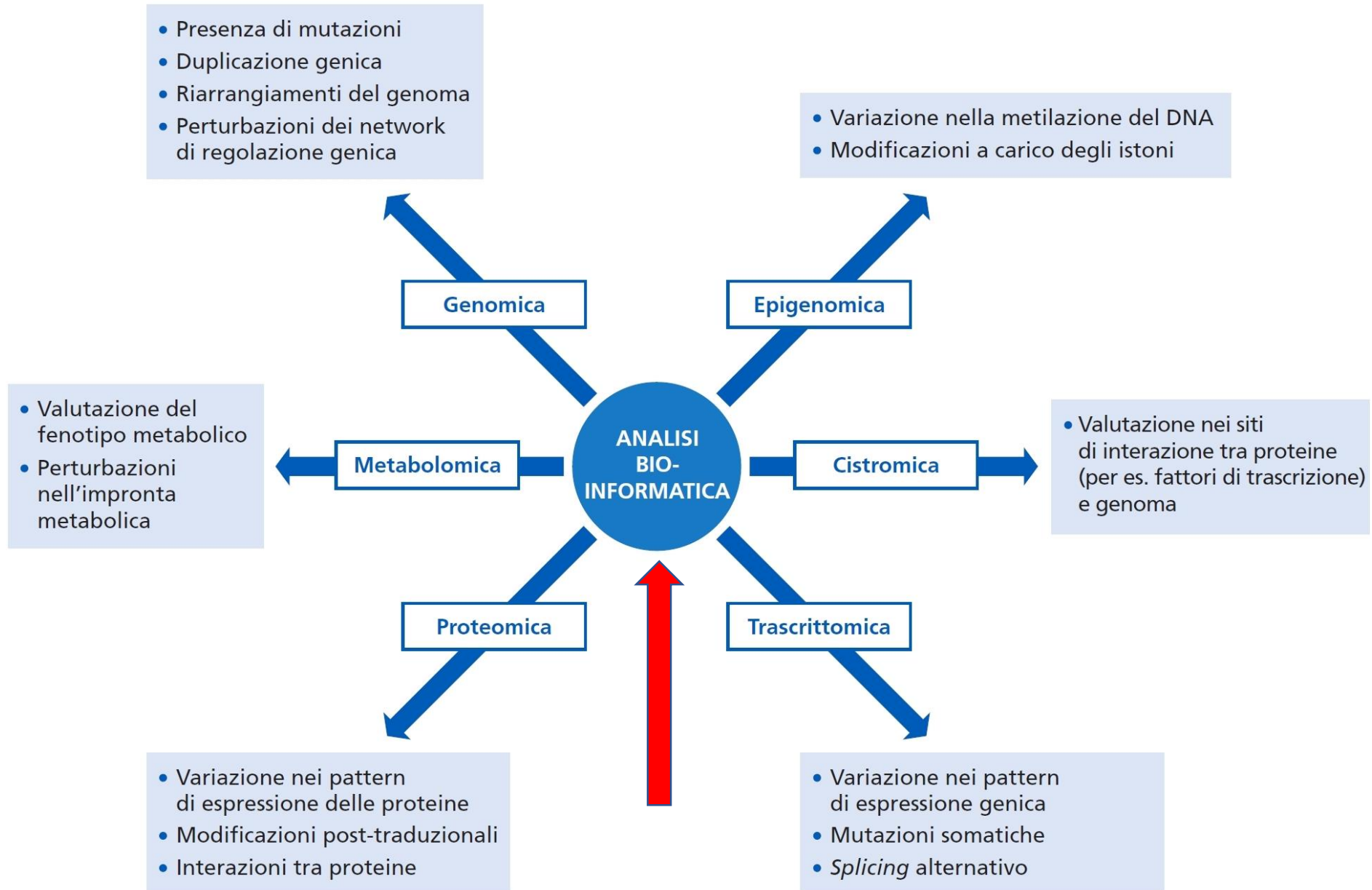
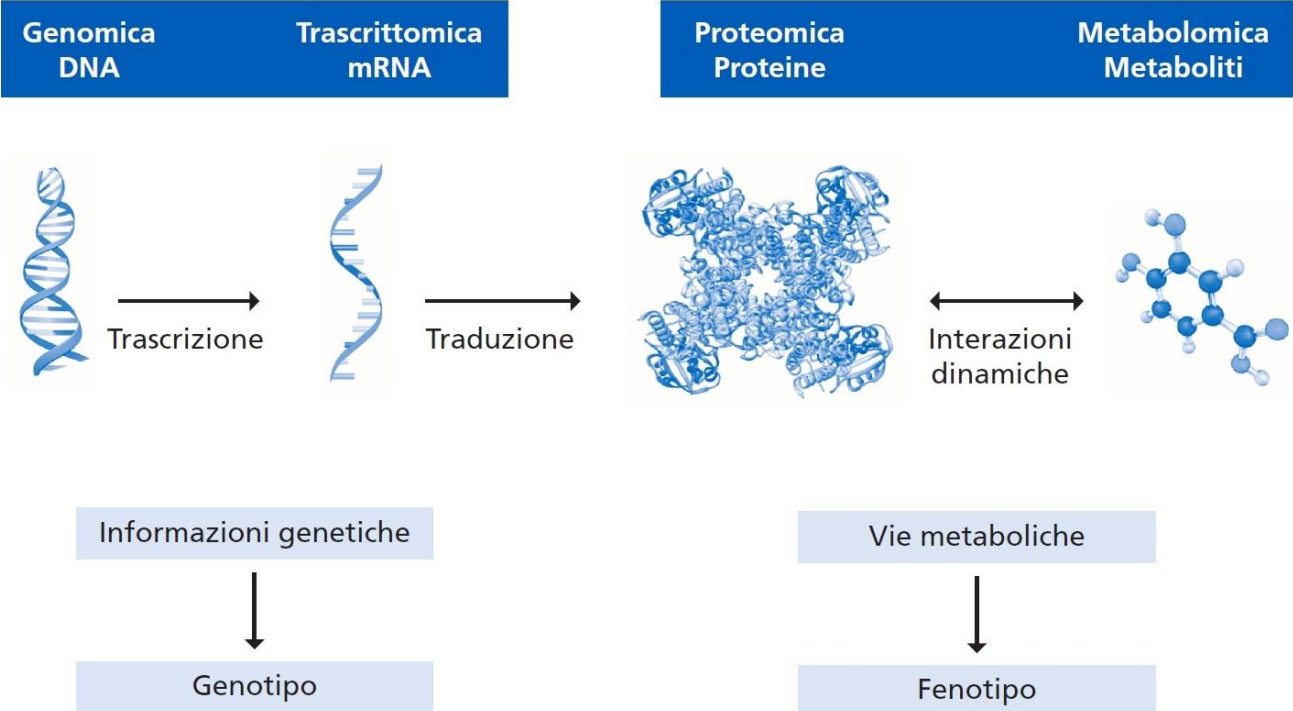


Figura 3.4. Analisi bioinformatica e applicazioni delle tecnologie omiche.

Figura 3.8 L'utilizzo delle diverse metodologie omiche permette di ottenere, a diversi livelli, informazioni fondamentali sulla biologia dei sistemi.



Systems pharmacology is the application of systems biology principles to the field of pharmacology. It seeks to understand how drugs affect the human body as a single complex biological system. Instead of considering the effect of a drug to be the result of one specific drug-protein interaction, systems pharmacology considers the effect of a drug to be the outcome of the network of interactions a drug may have.

Networks of interaction may include chemical-protein, protein-protein, genetic, signalling and physiological (at cellular, tissue, organ and whole body levels).

Systems pharmacology uses bioinformatics and statistics techniques to integrate and interpret these networks.

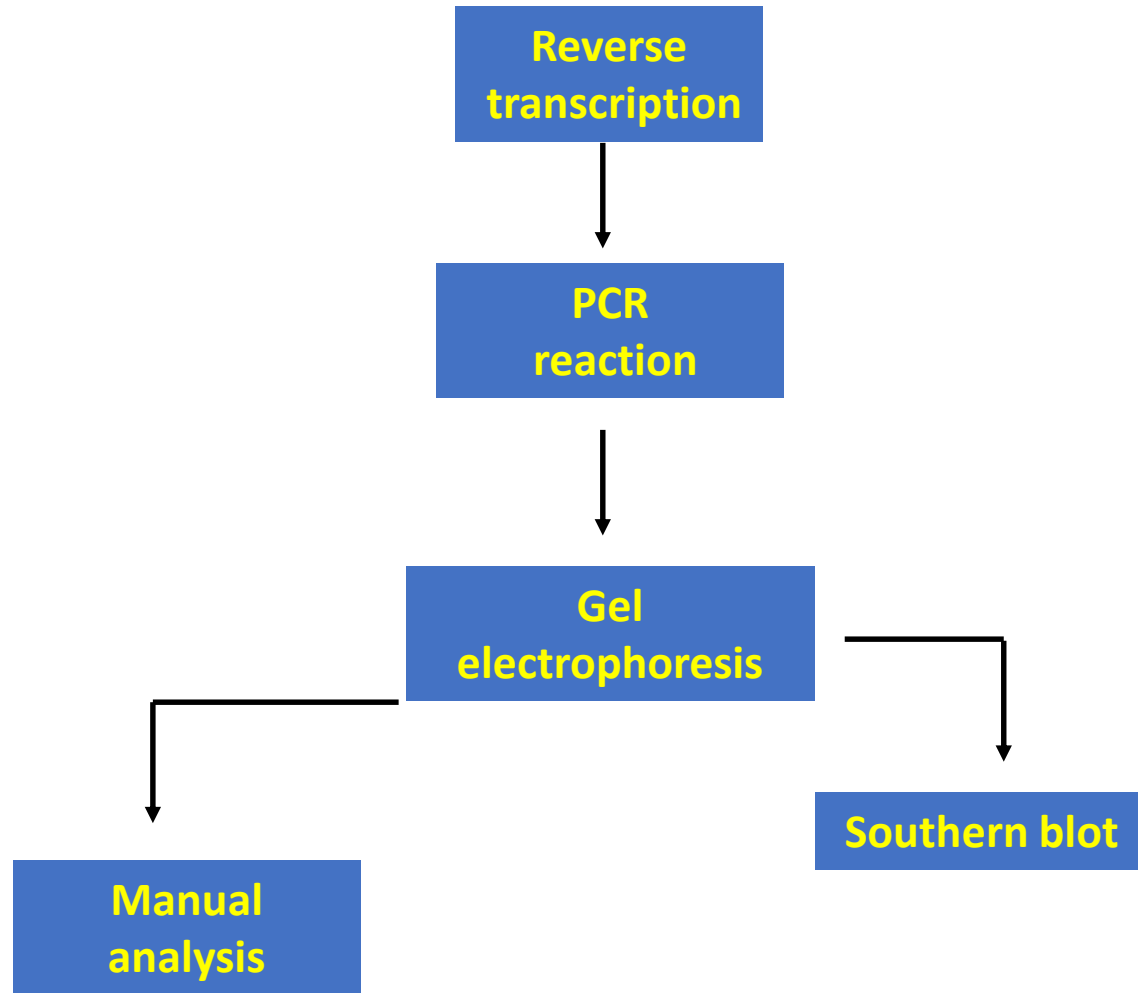
Real Time qPCR

La PCR

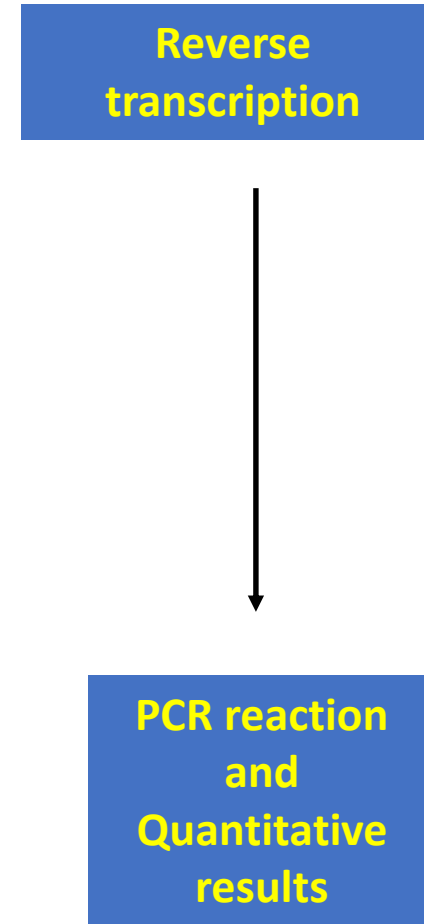
una tecnologia che consente di amplificare una specifica sequenza di DNA milioni di volte in poche ore
quando siano note le estremità 5' e 3' della sequenza del gene di interesse

- 1. Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA**
- 2. Amplificazione del cDNA tramite PCR**
- 3. Quantificazione dei prodotti amplificati**

RT-PCR convenzionale



Real-time RT-PCR



1- RETROTRASCRIZIONE (o reazione di trascrizione inversa)
è una fase comune sia a quella tradizionale che alla Real Time PCR

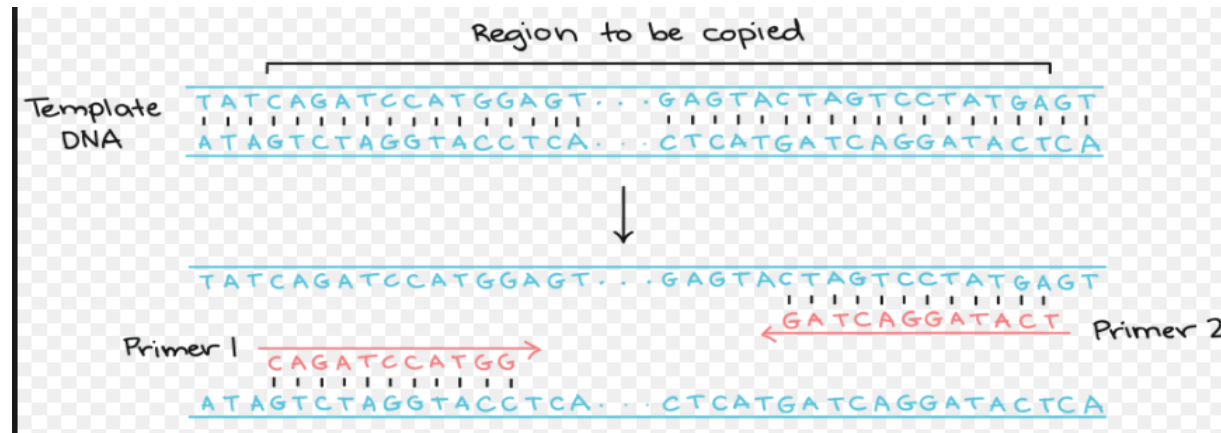
Consente di produrre una molecola di cDNA (**DNA complementare**) partendo da una molecola di RNA, grazie all'utilizzo dell'enzima Trascrittasi Inversa

che viene sfruttata in laboratorio per retrotrascrivere molecole di RNA (essenzialmente mRNA) in DNA complementare.

(RNAse H => degrada gli ibridi DNA-RNA che si formano durante la retrotrascrizione)

2- PCR

1. “Stampo”: una piccola quantità di DNA che si vuole amplificare (**templato**)
2. Il cosiddetto “enzima operaio”, l’enzima **Taq Polimerasi che sintetizza il DNA**
3. **“mattoni”**: riserva di nucleotidi liberi costituiti da Adenina, Timina, Citosina, Guanina (**dNTPs** : Miscela equimolare di dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
4. **Primers (oligonucleotidi)**: sequenze di DNA a singola filamento (20-30 nucleotidi) che hanno la funzione di innescare la reazione di sintesi [un primer **Forward** complementare a un filamento di DNA all’inizio della regione bersaglio; l’altro **Reverse** complementare all’altro filamento, alla fine della regione bersaglio]
5. **Probe fluorescente**



La **DNA Polimerasi** che sintetizza il DNA

è una DNA polimerasi **termostabile** (isolato dal batterio *Thermophilus aquaticus*, **Taq polimerasi**), che resiste alle temperature elevate (80-90°C) rimanendo funzionale anche durante la fase di denaturazione a 94°C. Questa proprietà ha permesso l'automatizzazione dell'intera procedura, e un deciso miglioramento della specificità della reazione.

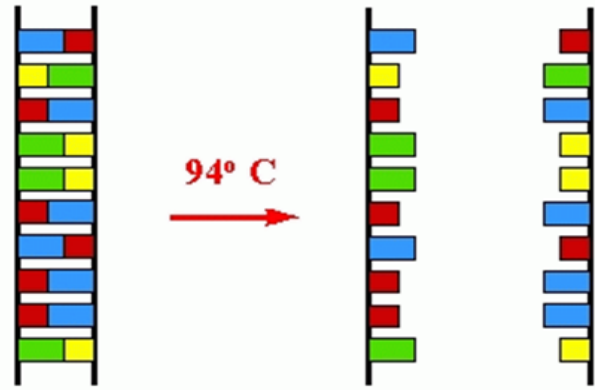
La Polimerasi **catalizza l'inserimento dei dNTP nella catena in formazione;** dispone i dNTP nella corretta sequenza complementare a quella del DNA di interesse.

La PCR avviene in tre fasi successive, ognuna delle quali si svolge ad una temperatura specifica.

- 1. Denaturazione del template:** si svolge a **94-96°C** per consentire ai 2 filamenti di DNA complementari di separarsi
- 2. Appaiamento dei primers - annealing:** il DNA template rimane denaturato perché gli strands si trovano a concentrazioni troppo basse nella miscela di reazione per potersi ri-appaiare durante il breve periodo di incubazione. I primers si appaiano alle sequenze complementari al gene target
- 3. Elongation - sintesi del DNA:** in cui l'enzima DNA polimerasi aggiunge dNTP in direzione 5'->3'

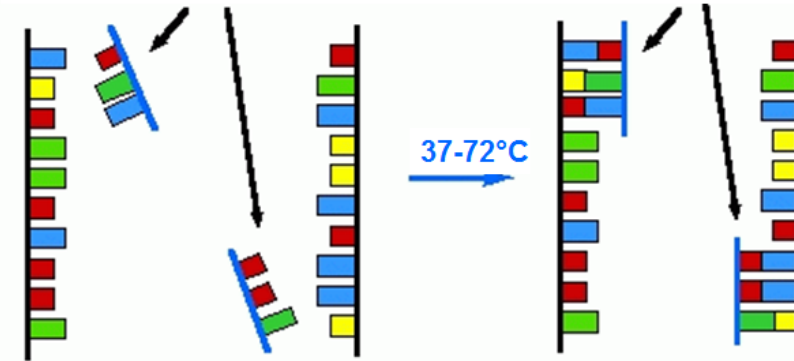
fase 1: DENATURAZIONE

La doppia elica di DNA stampo è aperta al calore



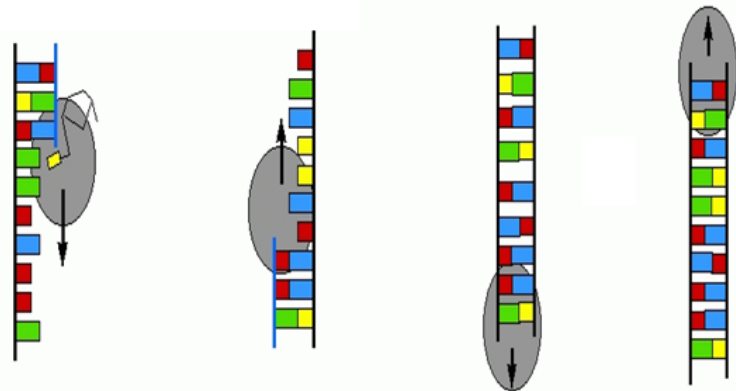
fase 2: ANNEALING

I primers si appaiano alle sequenze complementari sul DNA stampo

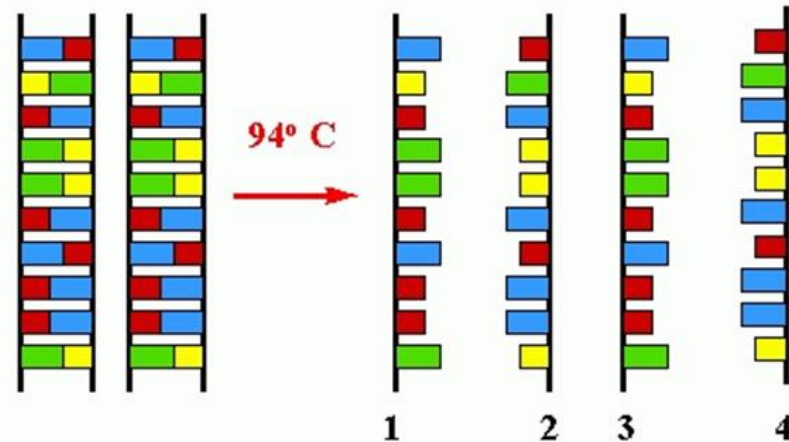


fase 3: ESTENSIONE

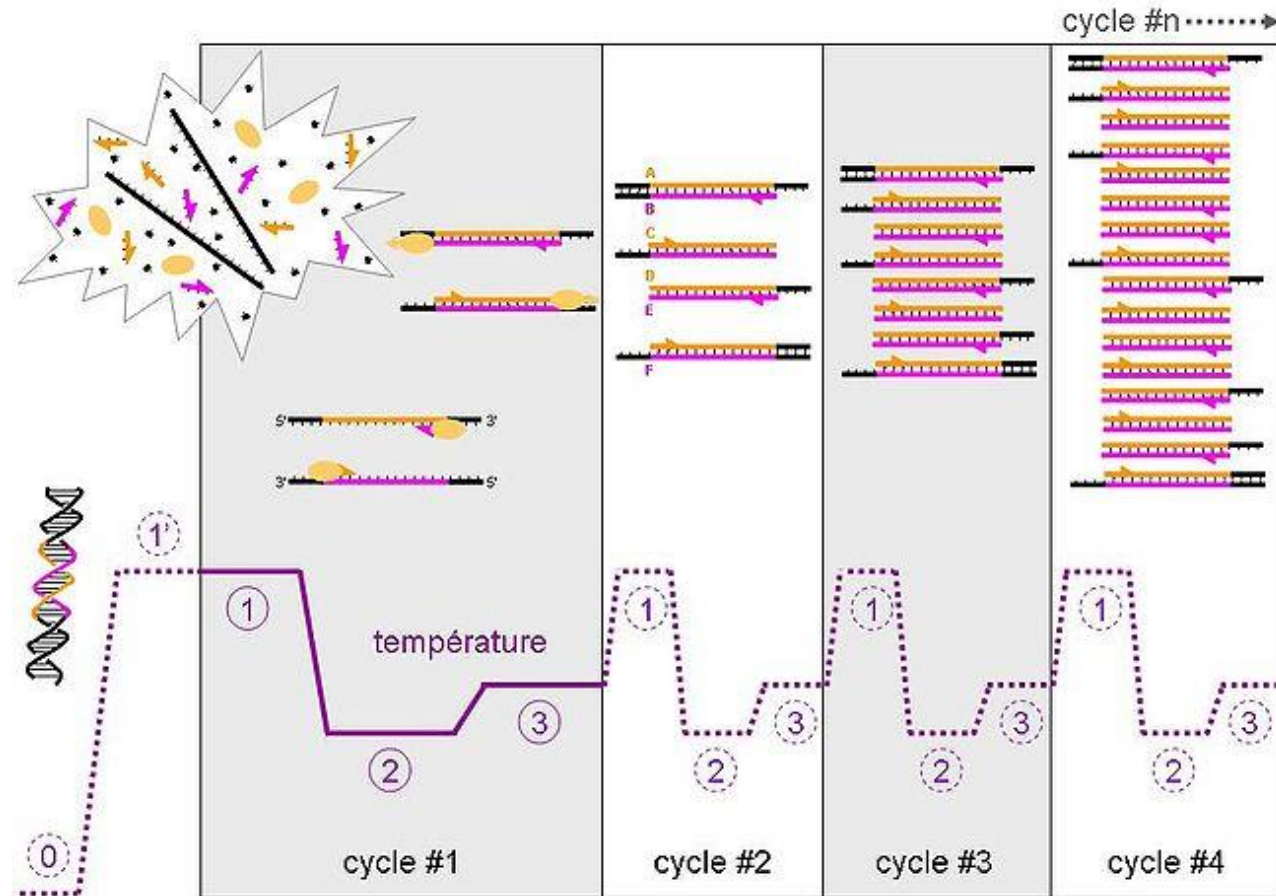
La DNA polimerasi allunga gli inneschi e produce 2 nuove catene di DNA



IL PROCESSO SI RIPETE



AMPLIFICAZIONE ESPONENZIALE



Un ciclo di sintesi risulta in due nuovi strand complementari, che, come le eliche parentali, possono ibridizzare con i primer a seguito di un successivo ciclo di denaturazione e *annealing* e **funzionare quindi a loro volta da template**.

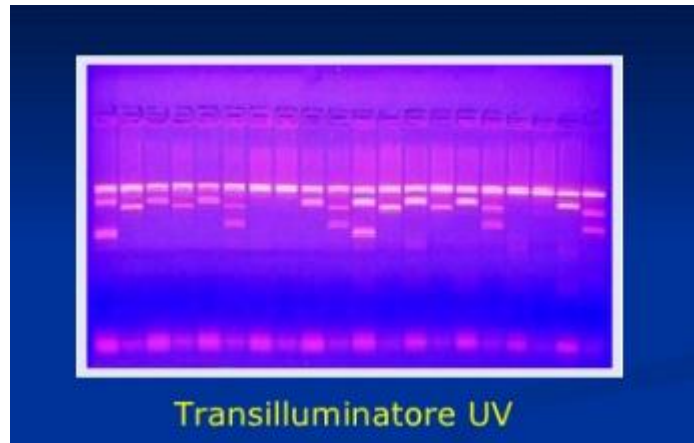
La quantità del template si duplica ad ogni ciclo di denaturazione, annealing ed estensione, accumulandosi **in maniera esponenziale**.

RT-PCR convenzionale

I geni amplificati vengono separati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

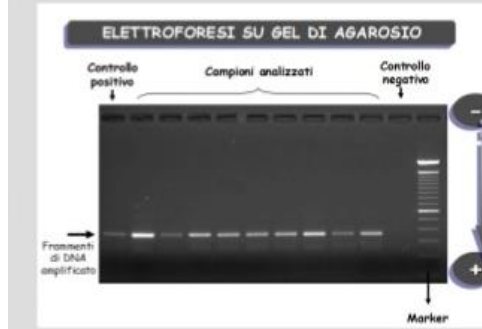
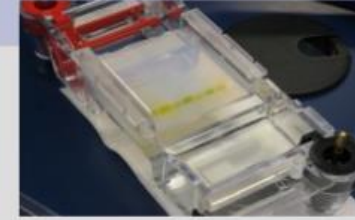
Il risultato dell' elettroforesi viene considerato **positivo** se si rileva il **frammento della lunghezza attesa** e su questo frammento si procede alla quantifica del prodotto di amplificazione (che è appunto il nostro gene d'interesse).

I prodotti di amplificazione vengono visualizzati nel gel mediante trattamento con un colorante fluorescente, come ad es. il bromuro di Etidio (EtBr). **Oggi si usano sostanze più sicure!!**



Elettroforesi su gel d'agarosio:

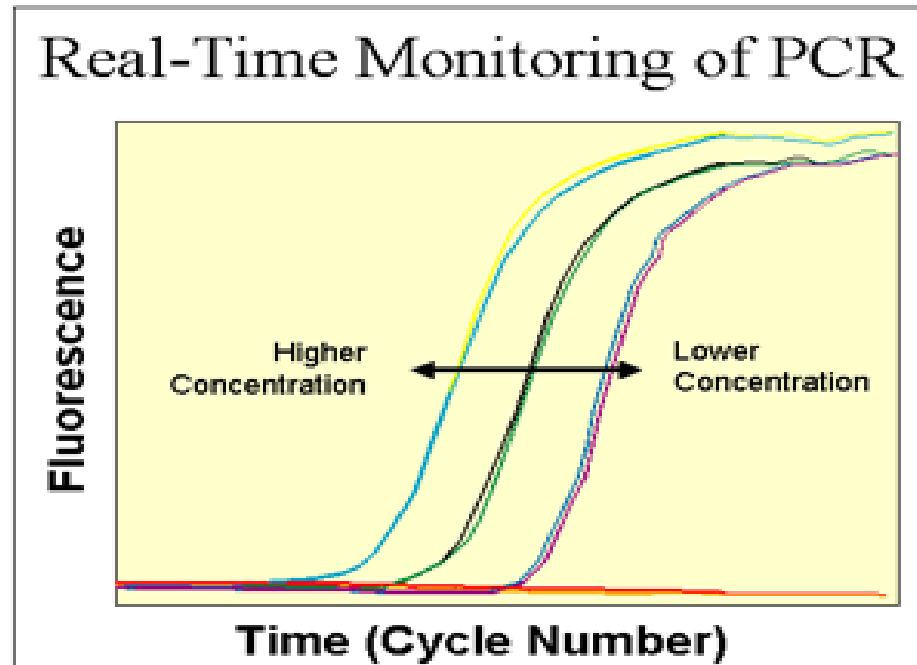
- agarosio 1%
- colorante gel
- loading dye
- marcatore di peso molecolare



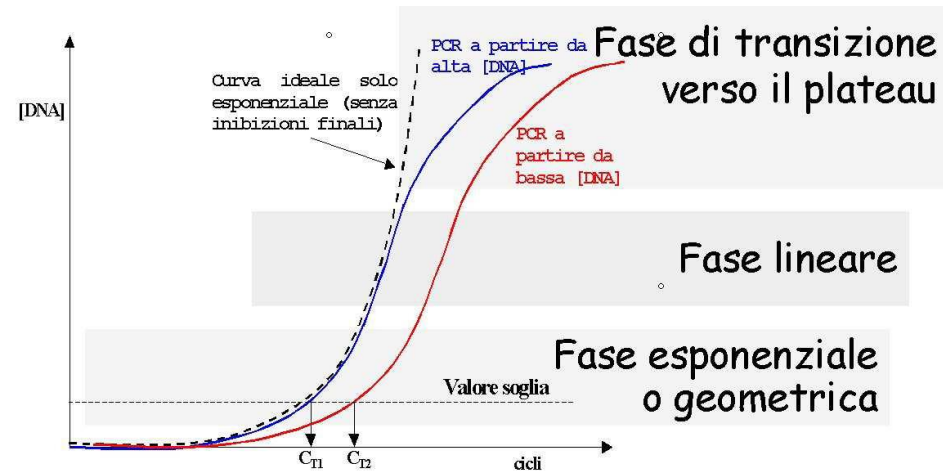
I raggi UV eccitano il bromuro di etidio intercalato tra due molecole di Timina. L'eccitazione UV provoca emissione di fluorescenza

Perché è chiamata real time PCR?

Misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale.



Fase esponenziale: i reagenti sono in eccesso, templato e prodotto sono a concentrazioni talmente basse che la rinaturazione del prodotto non compete con il legame dei primers. L'amplificazione procede ad una velocità **esponenziale** costante. L'efficienza è assimilabile al 100%.



Lineare: l'efficienza della reazione di amplificazione diminuisce. Il DNA si amplifica più lentamente, i reagenti iniziano ad essere consumati. Il momento in cui la velocità di reazione entra nella fase **lineare** di amplificazione è estremamente variabile.

Plateau: La reazione di amplificazione si ferma. Il DNA non viene più amplificato, i reagenti sono tutti esauriti (END-POINT).

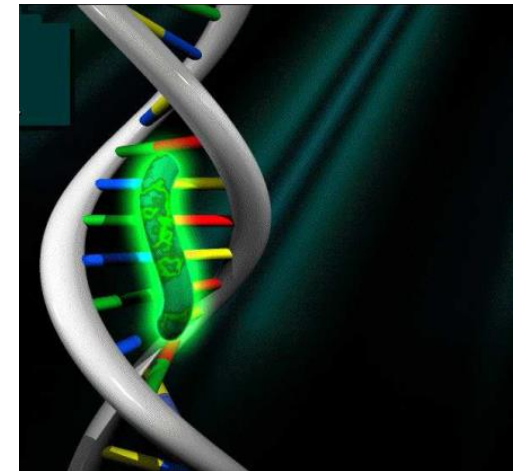
Probes fluorescenti

Esistono numerosi protocolli e **chimiche** diverse per Real-time PCR. Sono tutti basati sulla *detection* di prodotti di PCR attraverso la generazione di segnali fluorescenti.

Quelli usati più frequentemente sono:

- SYBR GREEN
- TAQMAN PROBES

Il SybrGreen è un colorante fluorescente che ha bassa fluorescenza in soluzione ma emette un forte segnale fluorescente quando si lega al dsDNA, mano a mano che i prodotti di PCR si accumulano, la fluorescenza aumenta.

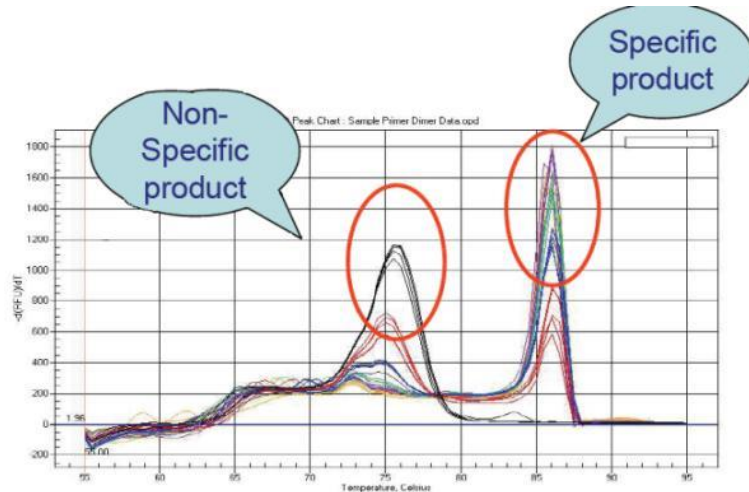


E' il metodo più semplice ed economico per fare Real-Time.

Poiché il SybrGreen si lega a qualsiasi dsDNA presente nella reazione, compresi i dimeri di primers e i prodotti aspecifici, il che può indurre una sovrastima della concentrazione del target.

ANALISI della CURVA di MELTING

Consente di identificare il prodotto di amplificazione specifico rispetto a prodotti aspecifici.



Al termine della PCR la temperatura viene lentamente aumentata inducendo un decremento della fluorescenza.

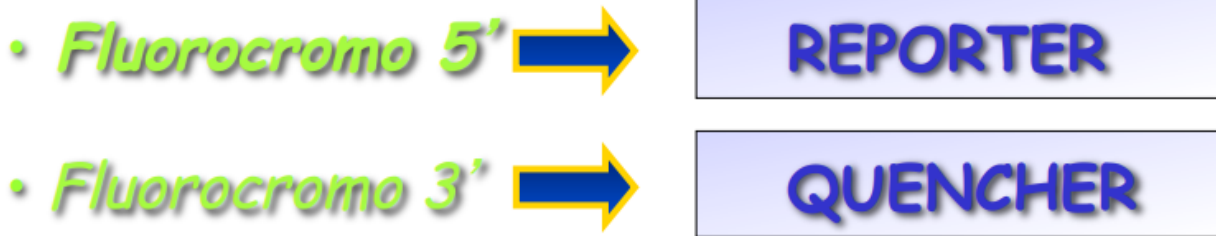
La temperatura in corrispondenza della quale si ha un repentino decremento della fluorescenza corrisponde alla T_m (temperatura di melting a cui i primers si disaccoppiano dal template) del prodotto

TaqMan Probes

Le sonde TaqMan sono oligonucleotidi disegnati, esattamente come primers delle PCR, per essere complementari alla sequenza bersaglio da amplificare

Il sistema TaqMan è costituito da 2 primers e una sonda (probe)

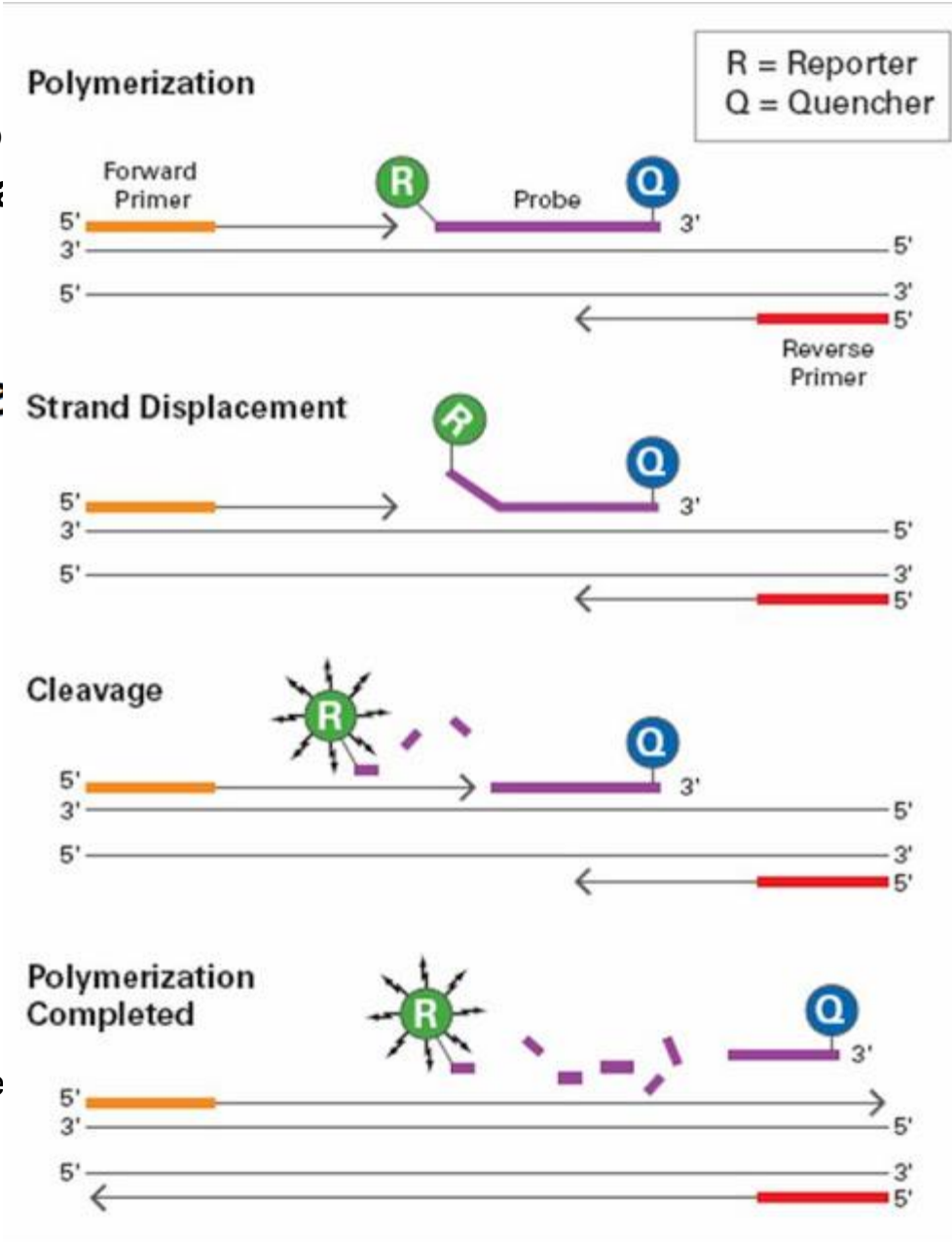
Il probe è costituito da un oligonucleotide marcato con fluorocromi alle estremità 5' e 3'



l'aumento della fluorescenza emessa da **R** è direttamente proporzionale al numero di ampliconi generati.

R = possiede un'elevata energia ed è in grado di emettere fluorescenza

Q = è una molecola a bassa energia con il ruolo di spegnere la fluorescenza di **R**.



Analisi Quantitativa relativa

Questo tipo di approccio viene **usato soprattutto in studi di gene-expression.**

L'approccio si basa sull'uso di uno **standard interno** che in genere è un house-keeping gene (gene che non “dovrebbe” variare nell'espressione), dotato delle seguenti caratteristiche:

- Stesso numero di copie in tutte le cellule
- Espresso in tutte le cellule

I più usati sono:

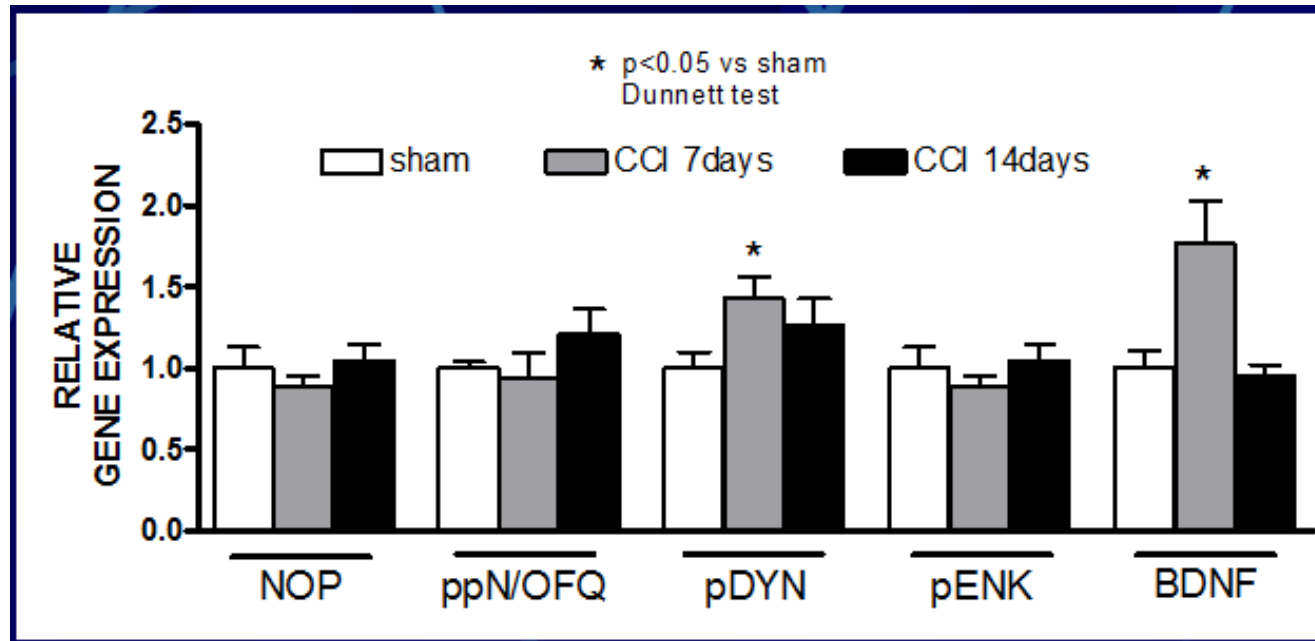
- ✓ **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)**
- ✓ **Beta-actina**

Metodo comparativo del $\Delta\Delta Ct$

La quantità del target viene normalizzata rispetto al controllo endogeno (**house-keeping gene**) ed espressa relativamente ad un campione di **controllo**.

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ campione} - Ct \text{ reference}) - \text{media campione controllo}$$

Esempio di analisi quantitativa tramite PCR dei geni di interesse in un modello di dolore neuropatico



Sham= falsamente operati

CCI 7days= operati e sacrificati al giorno 7

CCI 14days= operati e sacrificati al giorno 14

Molteplici impieghi della Real Time PCR:

- ✓ Clonaggio DNA e cDNA, di geni o frammenti genici
- ✓ Mutagenesi *in vitro*
- ✓ Ingegnerizzazione DNA

- ✓ Test diagnostici per la presenza di agenti infettivi
- ✓ Diagnosi prenatale di malattie genetiche
- ✓ Analisi di predisposizione genetica a patologie

- ✓ **analisi di variazioni di sequenza alleliche**
- ✓ **sequenziamento di DNA e cDNA**

- ✓ Quantificazione delle differenze nell'espressione genica
- ✓ Identificazione di cambiamenti nell'espressione di geni sconosciuti
- ✓ Analisi forense di situazioni criminose (scienze forensi)
- ✓ Controllo di qualità industriale

Le tecnologie omiche

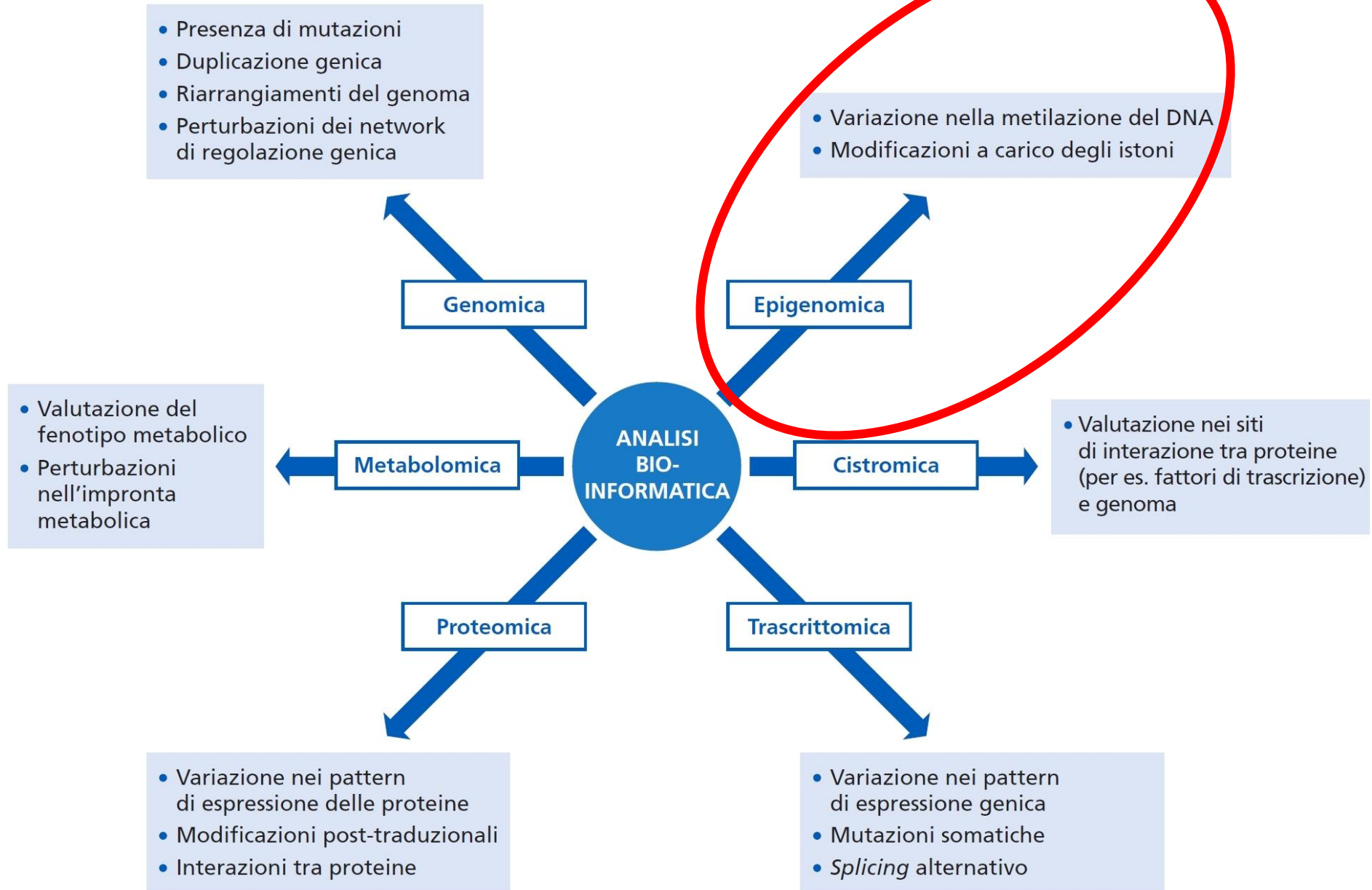
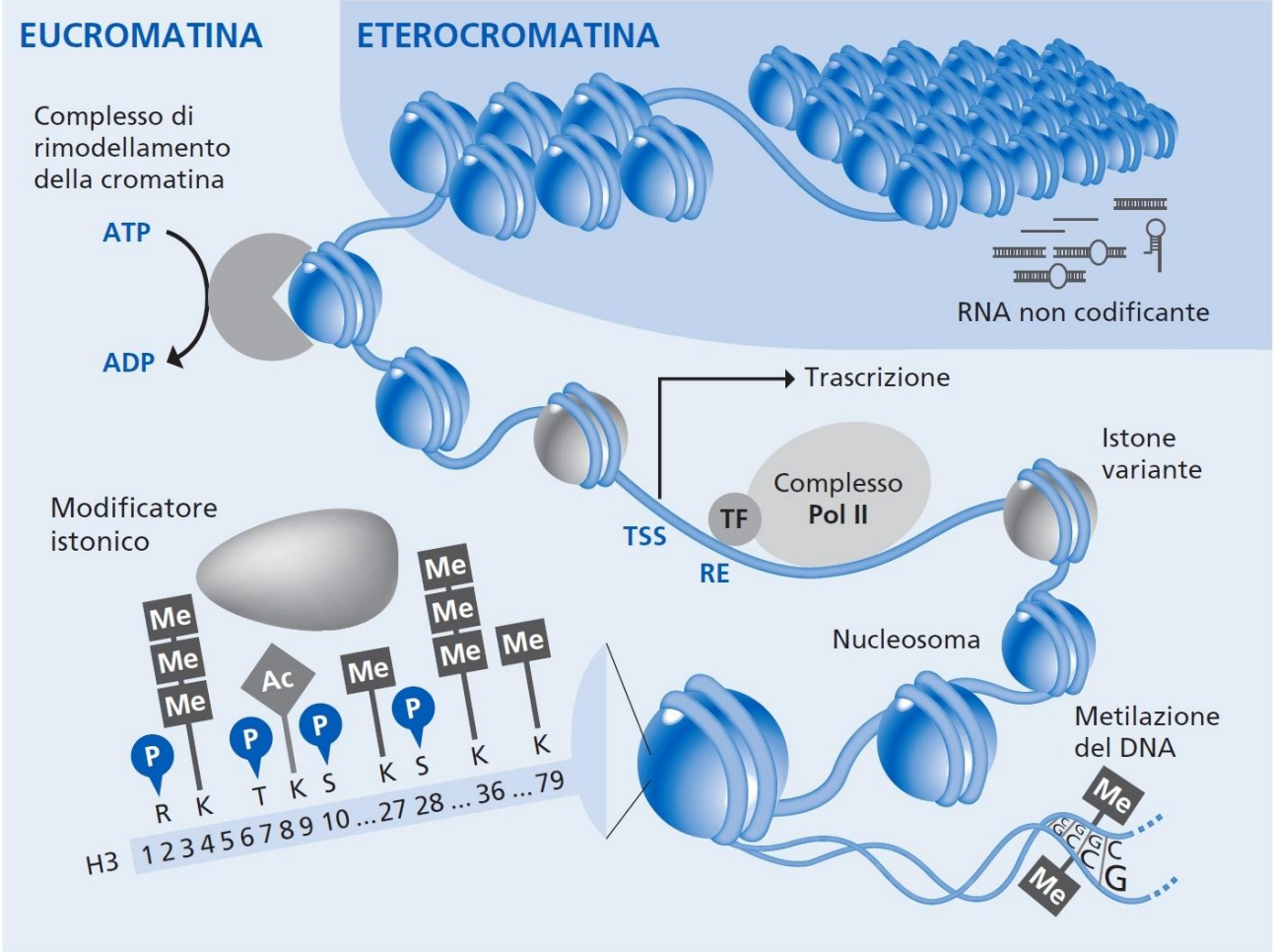


Figura 3.4 Analisi bioinformatica e applicazioni delle tecnologie omiche.

Figura 3.7 Meccanismi di controllo epigenetico della trascrizione. Le code degli istoni possono essere modificate da reazioni di metilazione, acetilazione e fosforilazione grazie all'intervento di modificatori istonici come le metilasi, acetilasi e chinasi istoniche. ATP, adenosintrifosfato; ADP, adenosindifosfato; TSS, sito di inizio della trascrizione; Me, metilazione; P, fosforilazione; Ac, acetilazione; TF, fattore di trascrizione; RE, elementi di risposta; R, arginina; K, lisina; T, treonina; S, serina.



Immunoprecipitazione della cromatina

Crosslinking

La proteina d'interesse (*Protein Of Interest, POI*) viene "legata" con una fissazione tramite formaldeide al sito sul DNA a cui è legata; questo passaggio viene definito *crosslinking*

Sonicazione

Il DNA viene tagliato mediante sonicazione. Questo produce frammenti di DNA a doppio filamento, di solito lunghi fino a 1 kb

Immunoprecipitazione

I frammenti di DNA legati alla POI vengono isolati mediante immunoprecipitazione: la proteina viene marcata con un anticorpo legato a *beads* magnetici e il complesso POI-DNA viene separato magneticamente

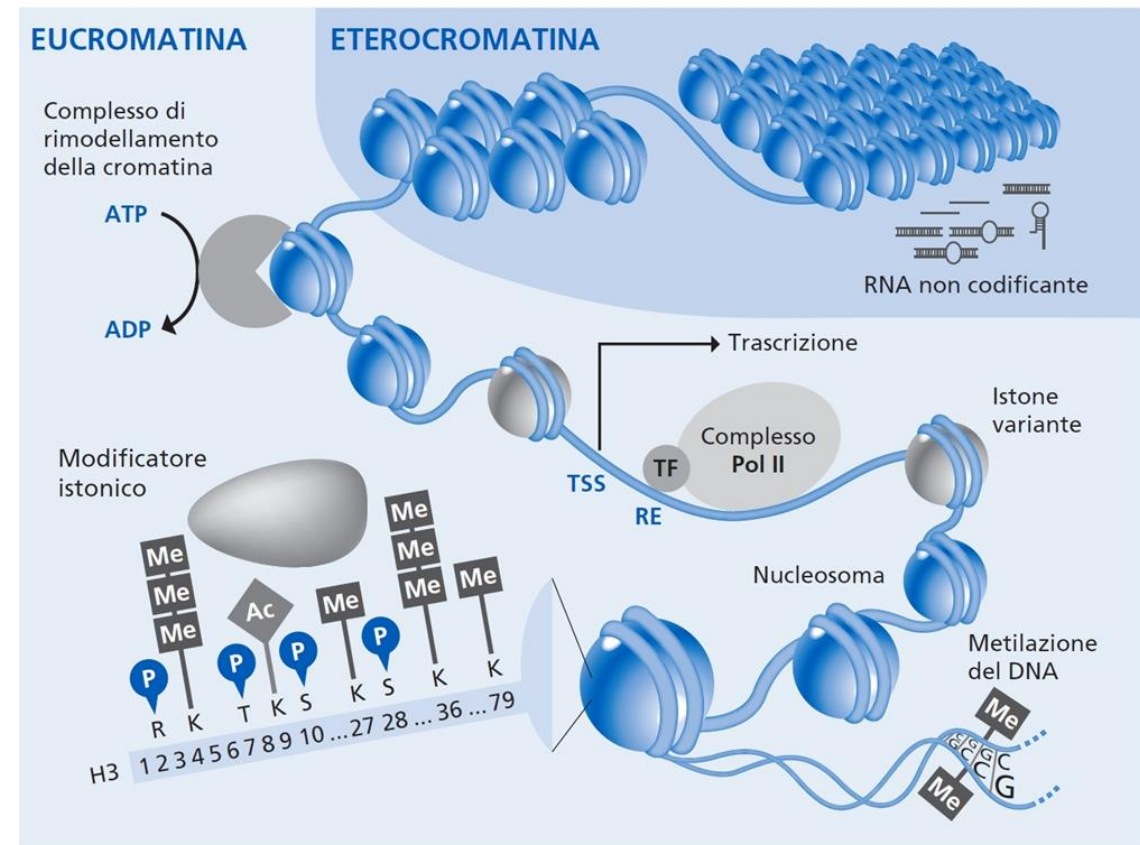
Crosslinking inverso Purificazione DNA

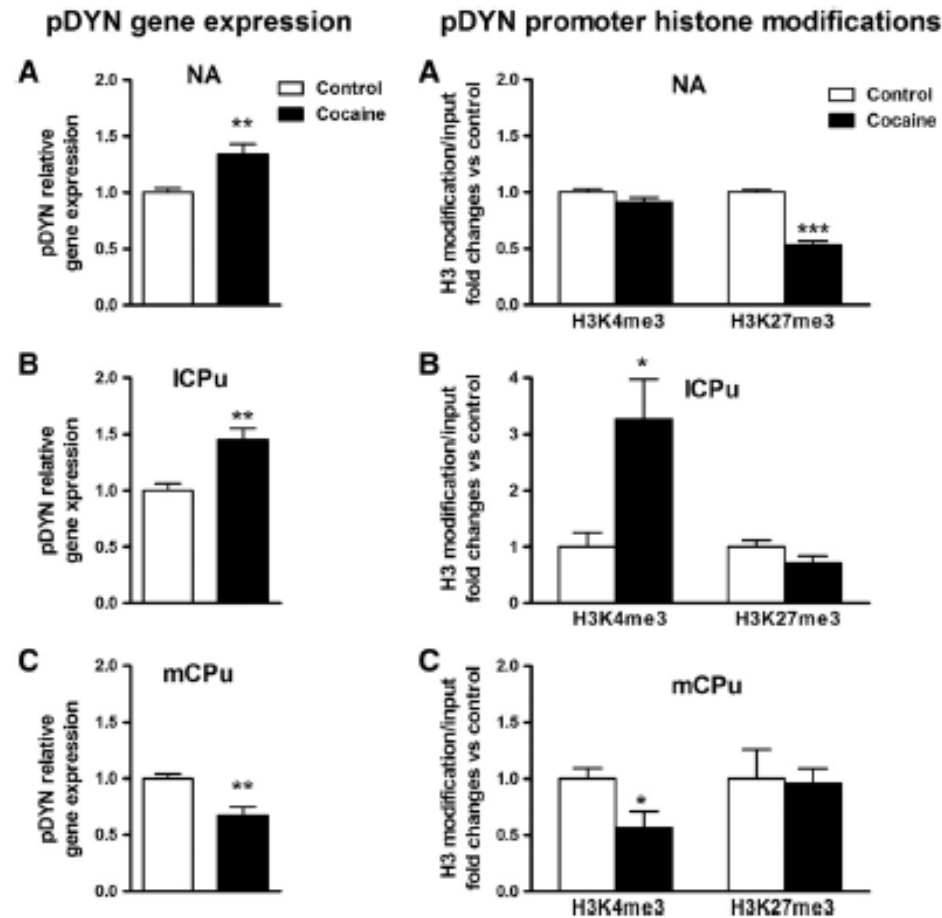
Il *crosslinking* tra la POI e il DNA viene annullato usando calore e i filamenti di DNA vengono purificati

Amplificazione Denaturazione

I frammenti di DNA vengono amplificati e denaturati (DNA a singolo filamento) per l'analisi successiva

Figura 3.6 Schema rappresentativo della procedura di immunoprecipitazione della cromatina, processo iniziale delle analisi di cistomica.





Dynorphin/KOP and nociceptin/NOP gene expression and epigenetic changes by cocaine in rat striatum and nucleus accumbens

Francesca Felicia Caputi¹, Manuela Di Benedetto¹, Donatella Carretta, Sussy Bastias del Carmen Candia, Claudio D'Addario, Chiara Cavina, Sanzio Candeletti, Patrizia Romualdi*

Department of Pharmacy and Biotechnologies, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Irnerio 48, 40126 Bologna, Italy

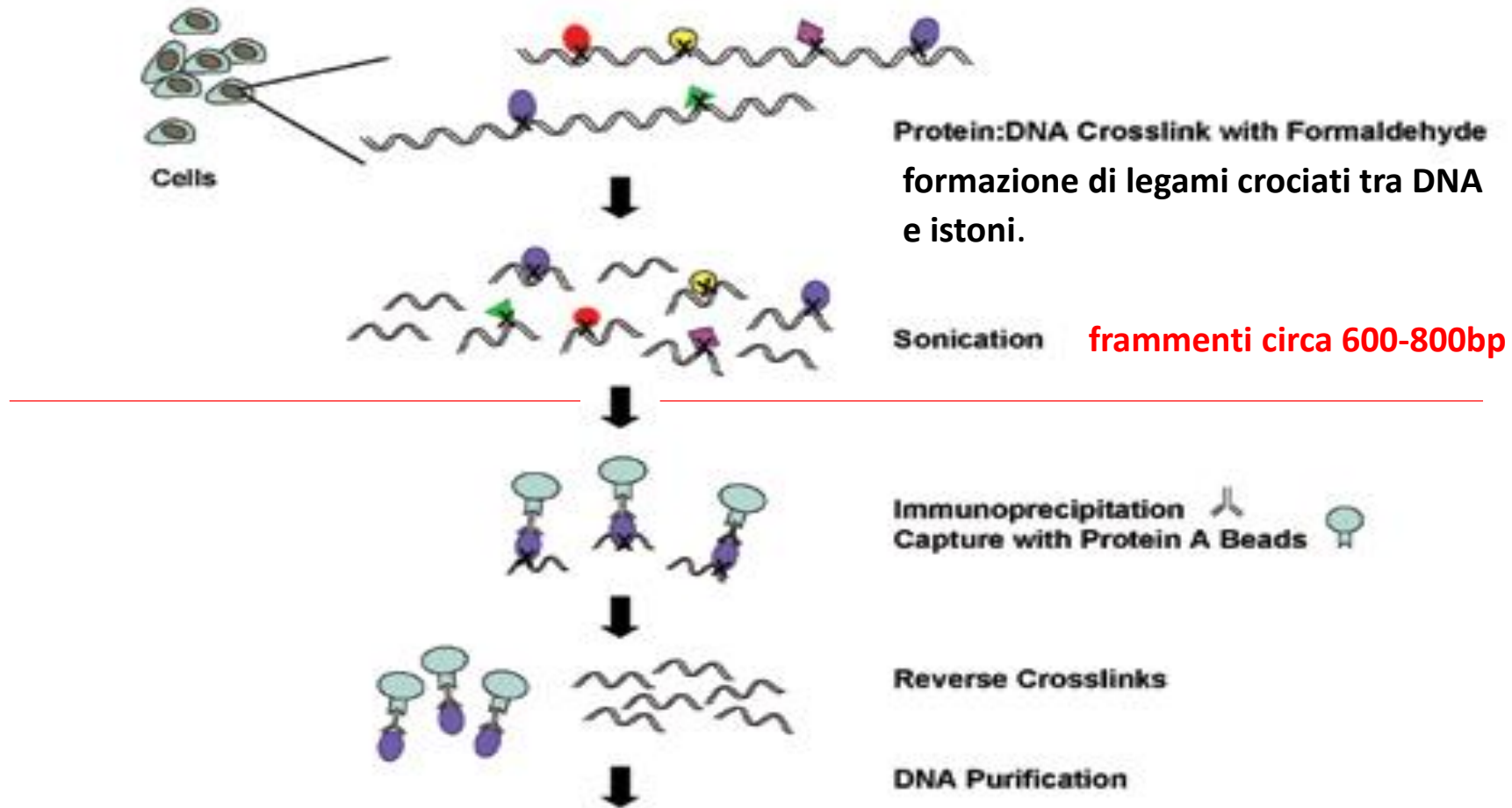
H3K27me3 (repressive marker)

H3K4me3 (activating marker)

In the NA, cocaine treatment induced a significant reduction of H3K27me3 (repressive marker) in the pDYN promoter region (0.53 ± 0.04 versus control group = 1.00 ± 0.02 , $t = 10.70$, $df = 10$, $p < 0.0001$); no changes of H3K4me3 levels were observed in the same promoter region (Fig. 2A, right panel).

Fig. 2. Left panel — pDYN mRNA levels in the striatum. pDYN gene expression was measured in rat nucleus accumbens (A), lateral (B) and medial (C) caudate-putamen. Animals ($n = 6$) were chronically infused s.c. with cocaine (total daily dose: 50 mg/kg) for 7 days and compared to saline-treated rats (control group, $n = 6$). Bars represent $2^{-\Delta\Delta Ct}$ value calculated by Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) method. Gene expression was normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); data are expressed as means \pm SE of 6 animals for each group. ** $p < 0.01$ versus control group. Right panel — pDYN promoter histone modifications. RT-qPCR analyses of H3K4me3 and H3K27me3 immuno-precipitated DNA fragments at pDYN promoter in rat nucleus accumbens (A), lateral (B) and medial (C) caudate-putamen. ChIP histogram shows the levels of specific histone modifications; normalized to total input DNA, in rats chronically infused with cocaine for 7 days. Data are expressed as means \pm SE of 6 animals for each group. *** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$ versus control.

1^ Estrazione della cromatina



2^ Immunoprecipitazione e purificazione prodotti

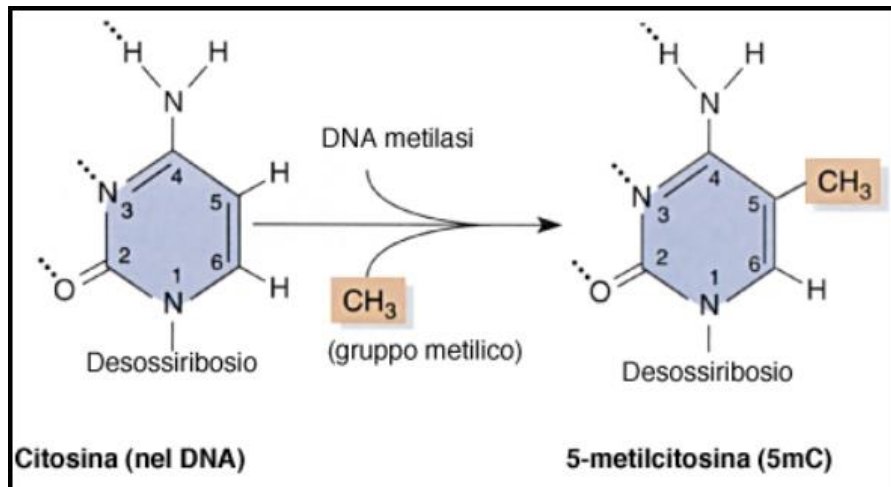
3^ Real Time PCR

Analisi del grado di Metilazione del DNA

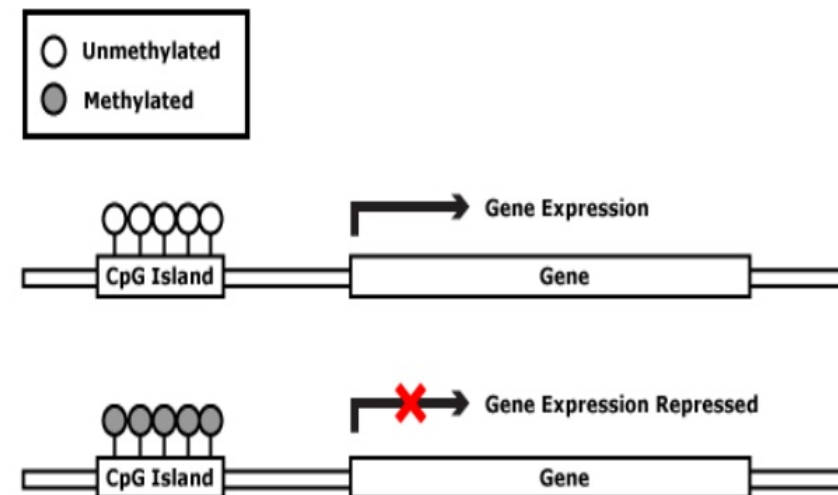
Dei circa 3 miliardi di coppie di basi che costituiscono il genoma di mammifero, circa il **40% sono coppie CG e il 2-7% di esse è metilato.**

Nelle cellule eucariotiche la metilazione è a carico della Citosina (C) delle **isole CpG** che sono tratti di genoma, nei quali le sequenze CpG sono 10 volte più frequenti, si trovano soprattutto in prossimità dei siti di inizio della trascrizione.

L'enzima DNA metiltransferasi (DNMT) opera una metilazione in posizione 5 della citosina



DNA Cytosine Methylation



La metilazione del DNA è associata al silenziamento genico

Esistono diverse metodiche per valutare il grado di metilazione di un gene:

- Metodiche **ELISA** che valutano il grado totale di metilazione in un campione biologico
- **Tecnica della bisulfitazione** → una reazione chimica che causa la deaminazione delle citosine, ma non quella delle metil-citosine.

In seguito è possibile analizzare la percentuale di metilazione attraverso



PCR

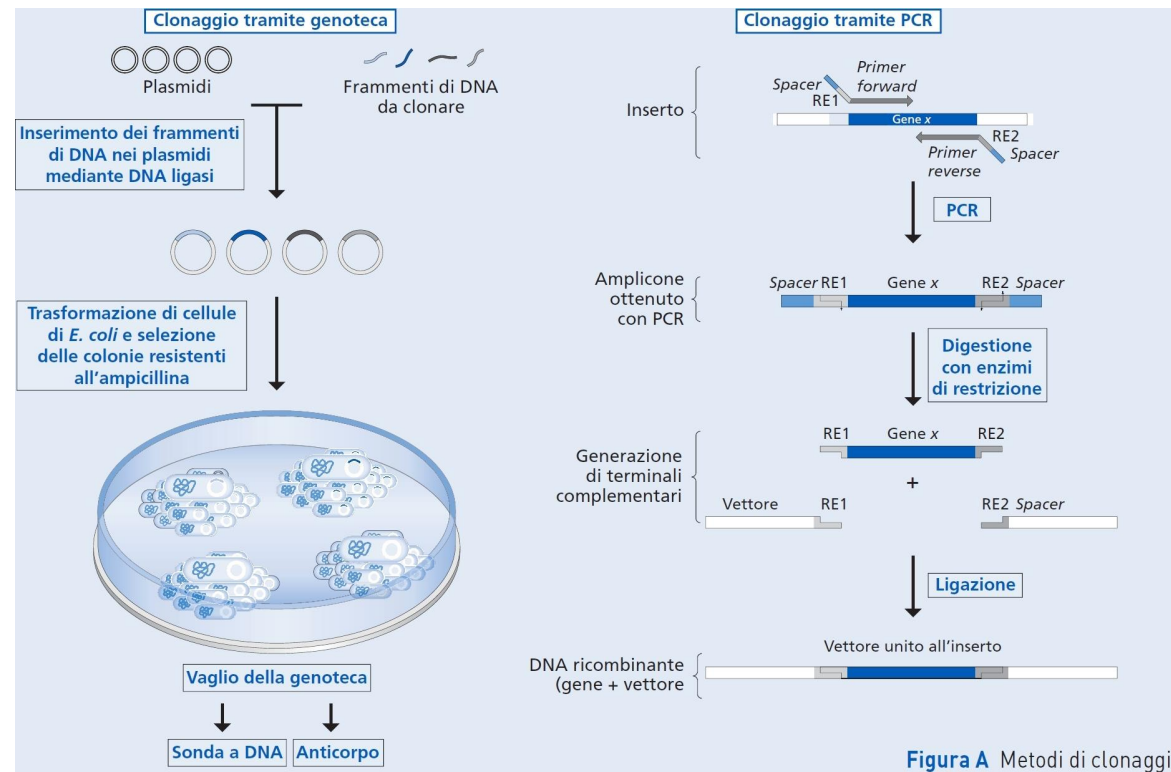
Pyrosequencing
(sequenziamento diretto)

Le ultime due possono essere effettuate con precisione in specifiche regioni promotore dei geni di interesse.

Pyrosequencing è quella che più delle altre permette una quantificazione accurata di ogni singola citosina e una variabilità tra i diversi run molto bassa

Clonaggio

Clonaggio di un gene: cioè produzione/generazione di un sistema cellulare in cui viene integrato un gene o un frammento di DNA che può essere quindi replicato in maniera infinita



1) produzione/generazione di un sistema cellulare in cui viene integrato un gene o un frammento di DNA



2) che può essere quindi replicato in maniera infinita

Per il clonaggio sono strategicamente determinanti gli enzimi di restrizione

Esempi di enzimi di restrizione

Per: 1) produzione/generazione di un sistema cellulare in cui viene integrato un gene o un frammento di DNA

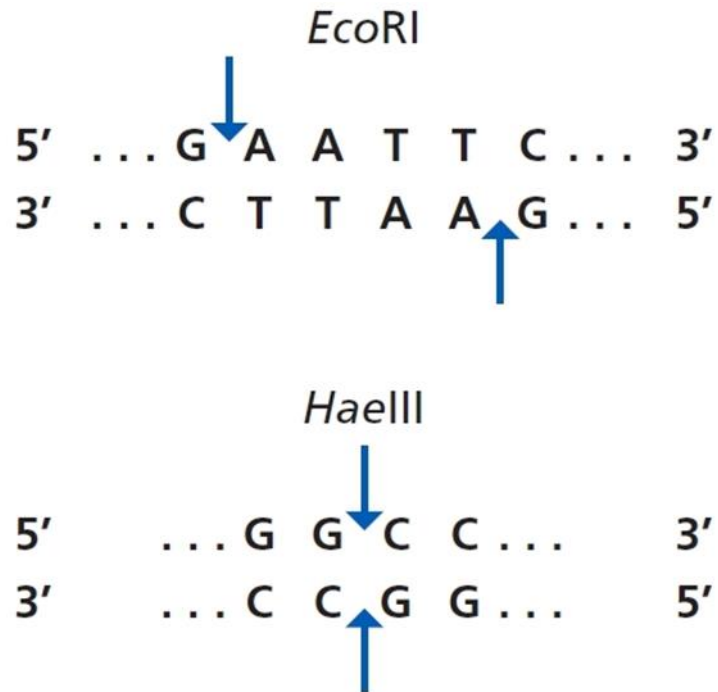


Figura 8.1 Siti di restrizione degli enzimi *EcoRI* e *HaeIII*.

Microrganismo	Enzima di restrizione	Sequenza bersaglio
<i>Anabaena variabilis</i>	<i>AvaI</i>	CPyCGPuG
<i>Bacillus amyloliquefacens</i> H	<i>BamHI</i>	GGATCC
<i>Bacillus albinum</i>	<i>BglII</i>	AGATCT
<i>Brevibacterium albinum</i>	<i>BaI</i>	TGGCCA
<i>Escherichia coli</i> RY13	<i>EcoRI</i>	GAATTC
<i>Escherichia coli</i> R245	<i>EcoRII</i>	CCAGG
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeII</i>	PuGCGCPy
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	GGCC
<i>Haemophilus haemophilus</i>	<i>HhaI</i>	GCGC
<i>Haemophilus influenzae</i> RD	<i>HindII</i>	GTPyPuAC
<i>Haemophilus influenzae</i> RD	<i>HindIII</i>	AAGCTT
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>HpaI</i>	GTTAAC
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>HpaII</i>	C C GG
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>KpnI</i>	GGTACC
<i>Moraxella bovis</i>	<i>MboI</i>	GATC
<i>Providencia stuartii</i>	<i>PstI</i>	CTGCAG
<i>Streptomyces albus</i>	<i>SaI</i>	GTCGAC
<i>Serratia marcescens</i>	<i>SmaI</i>	CCC G GG
<i>Xanthomonas malvacearum</i>	<i>XmaI</i>	CCC G GG

Clonaggio tramite genoteca



Plasmidi

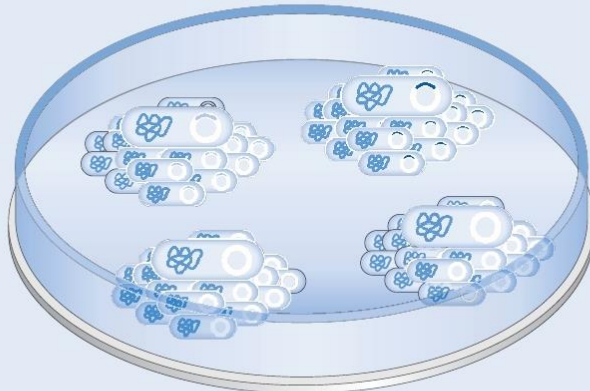


Frammenti di DNA da clonare

Inserimento dei frammenti di DNA nei plasmidi mediante DNA ligasi



Trasformazione di cellule di *E. coli* e selezione delle colonie resistenti all'ampicillina



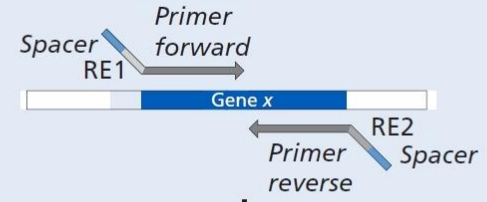
Vaglio della genoteca

Sonda a DNA

Anticorpo

Clonaggio tramite PCR

Inserito



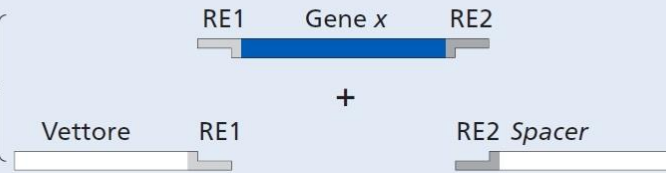
PCR

Amplicone ottenuto con PCR



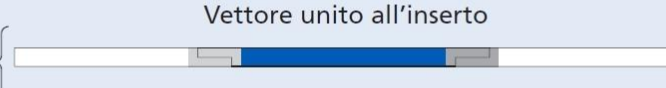
Digestione con enzimi di restrizione

Generazione di terminali complementari



Ligazione

DNA ricombinante (gene + vettore)

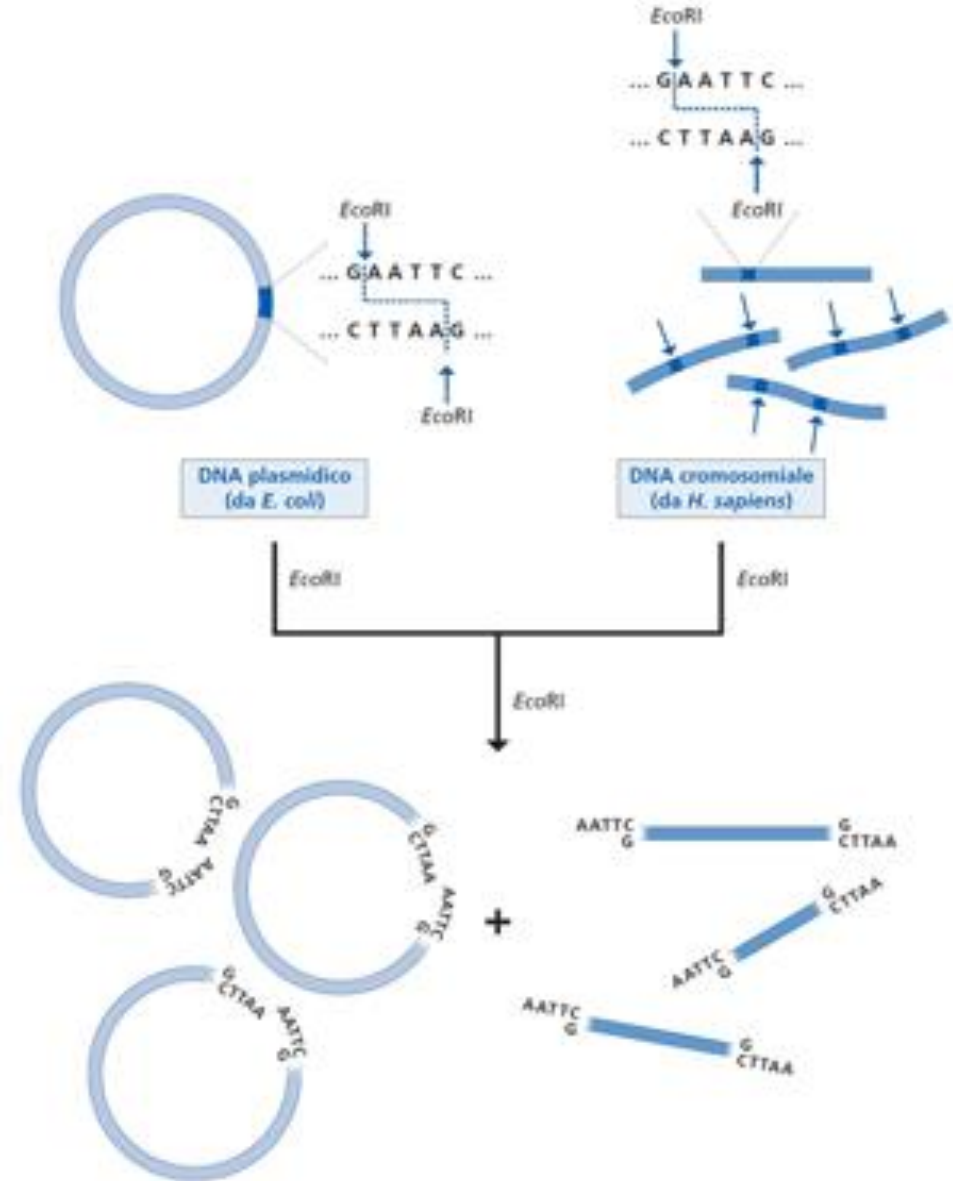


Differenti strategie per il clonaggio

Figura A Metodi di clonaggio.

Esempi di enzimi di restrizione

Microrganismo	Enzima di restrizione	Sequenza bersaglio
<i>Anabaena variabilis</i>	<i>Ava</i> I	CPyCGPuG
<i>Bacillus amyloliquefacens</i> H	<i>Bam</i> HI	GGATCC
<i>Bacillus albinum</i>	<i>Bg</i> II	AGATCT
<i>Brevibacterium albinum</i>	<i>Ba</i> I	TGGCCA
<i>Escherichia coli</i> RY13	<i>Eco</i> RI	GAATTC
<i>Escherichia coli</i> R245	<i>Eco</i> RII	CCAGG
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>Hae</i> II	PuGCGCPy
<i>Aemophilus aegyptius</i>	<i>Hae</i> III	GGCC
<i>Haemophilus haemophilus</i>	<i>Hha</i> I	GCGC
<i>Haemophilus influenzae</i> RD	<i>Hind</i> II	GTPyPuAC
<i>Haemophilus influenzae</i> RD	<i>Hind</i> III	AAGCTT
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Hpa</i> I	GTTAAC
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Hpa</i> II	CCGG
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Kpn</i> I	GGTACC
<i>Moraxella bovis</i>	<i>Mbo</i> I	GATC
<i>Providencia stuartii</i>	<i>Pst</i> I	CTGCAG
<i>Streptomyces albus</i>	<i>Sa</i> I	GTCGAC
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Sma</i> I	CCCGGG
<i>Xanthomonas malvacearum</i>	<i>Xma</i> I	CCCGGG



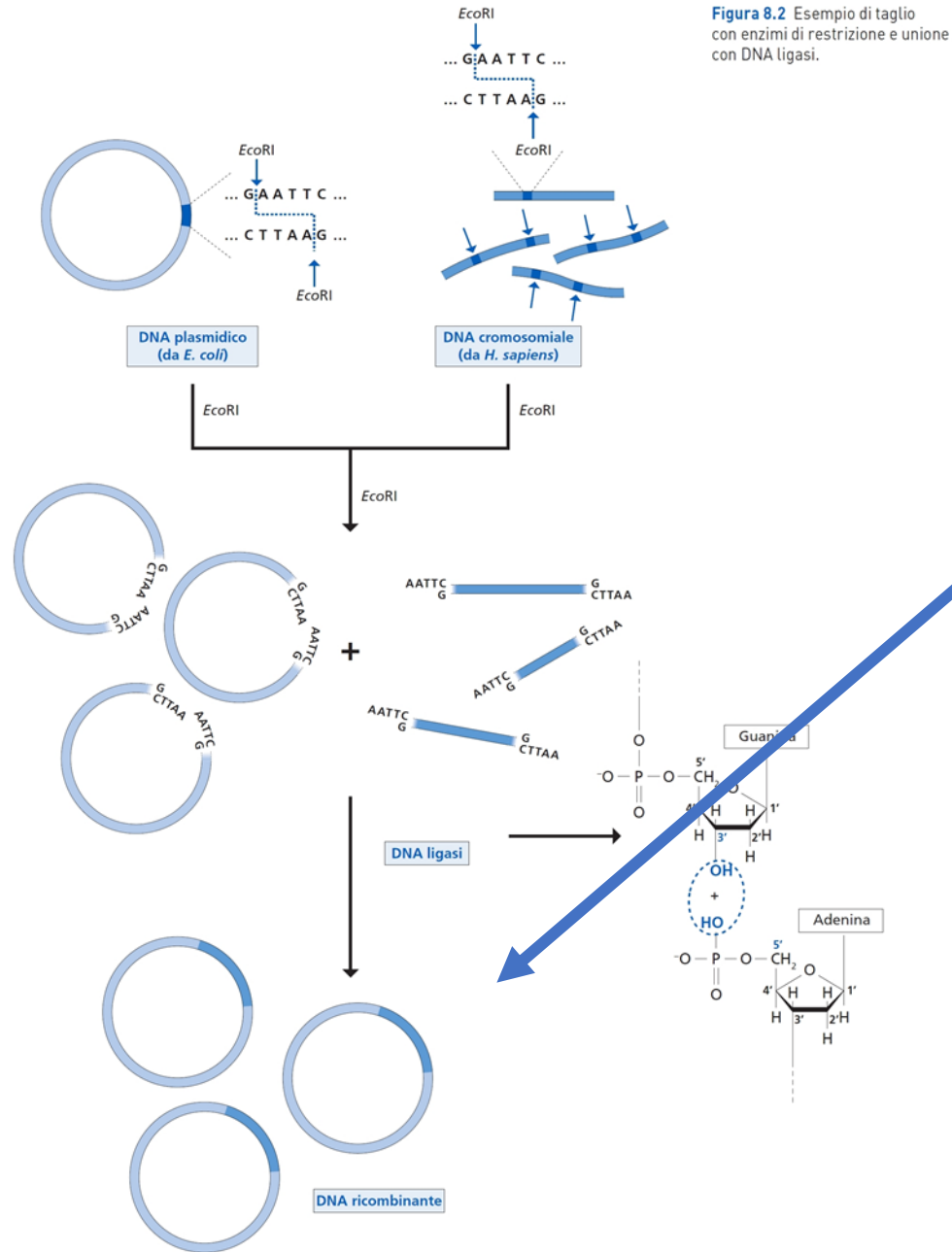


Figura 8.2 Esempio di taglio con enzimi di restrizione e unione con DNA ligasi.

Una volta formata la molecola ricombinante, questa può essere moltiplicata all'infinito se immessa nel genoma di una cellula vivente (**clonaggio**):

Prima di effettuare il clonaggio

occorre **prima** integrare il frammento di DNA di interesse (per esempio, il gene che codifica per la proteina/farmaco) in un elemento di DNA che venga riconosciuto e replicato dalla cellula ospite tale elemento è definito **vettore**:

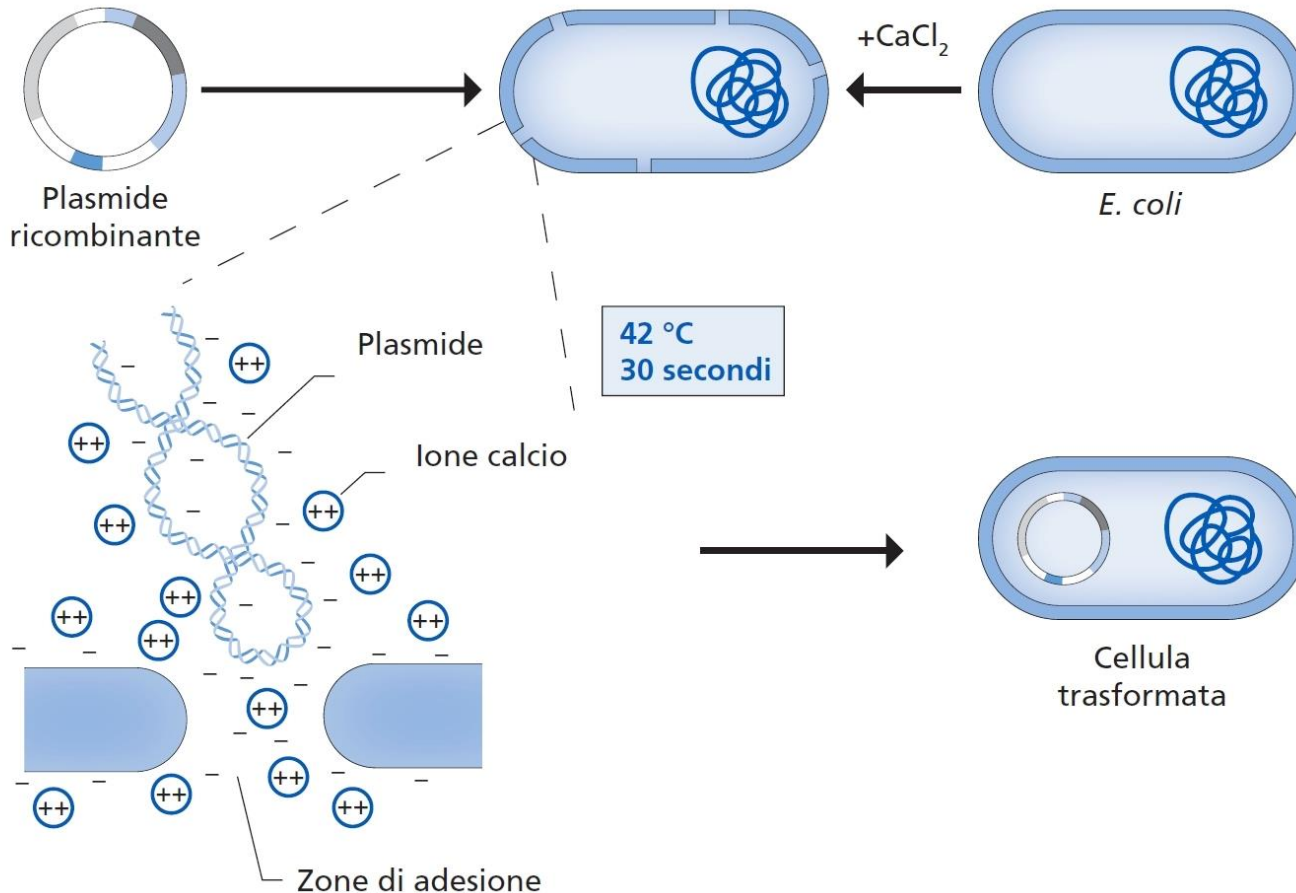
POI,
Per la moltiplicazione della molecola di DNA ricombinante

Si possono utilizzare come vettori

PLASMIDI o VIRUS

Per la produzione di una proteina ricombinante, il gene codificante per tale proteina è trasferito in sistemi cellulari semplici, come i batteri e le cellule eucariote in coltura

Trasformazione di batteri



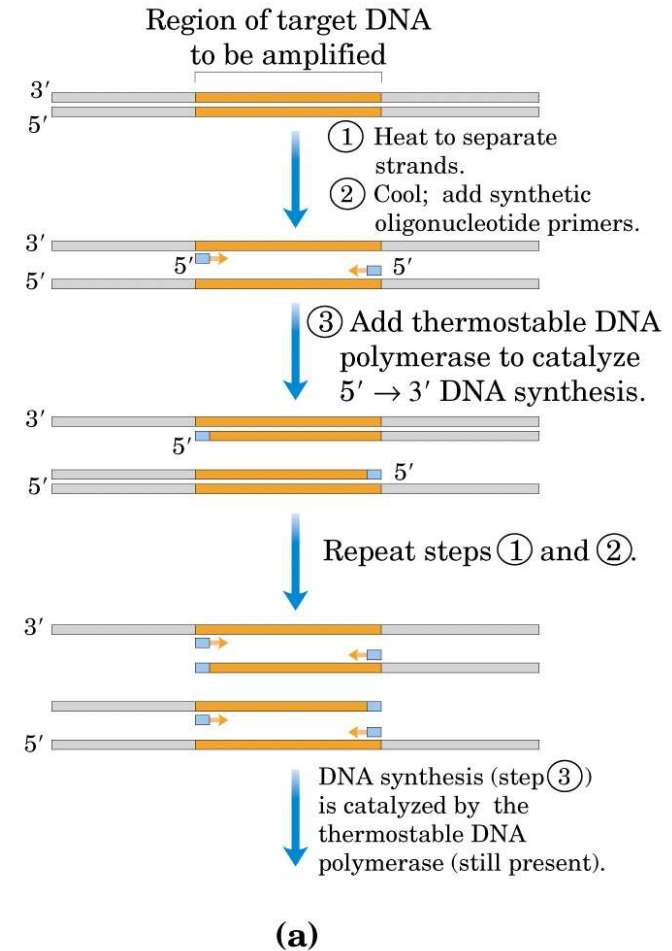
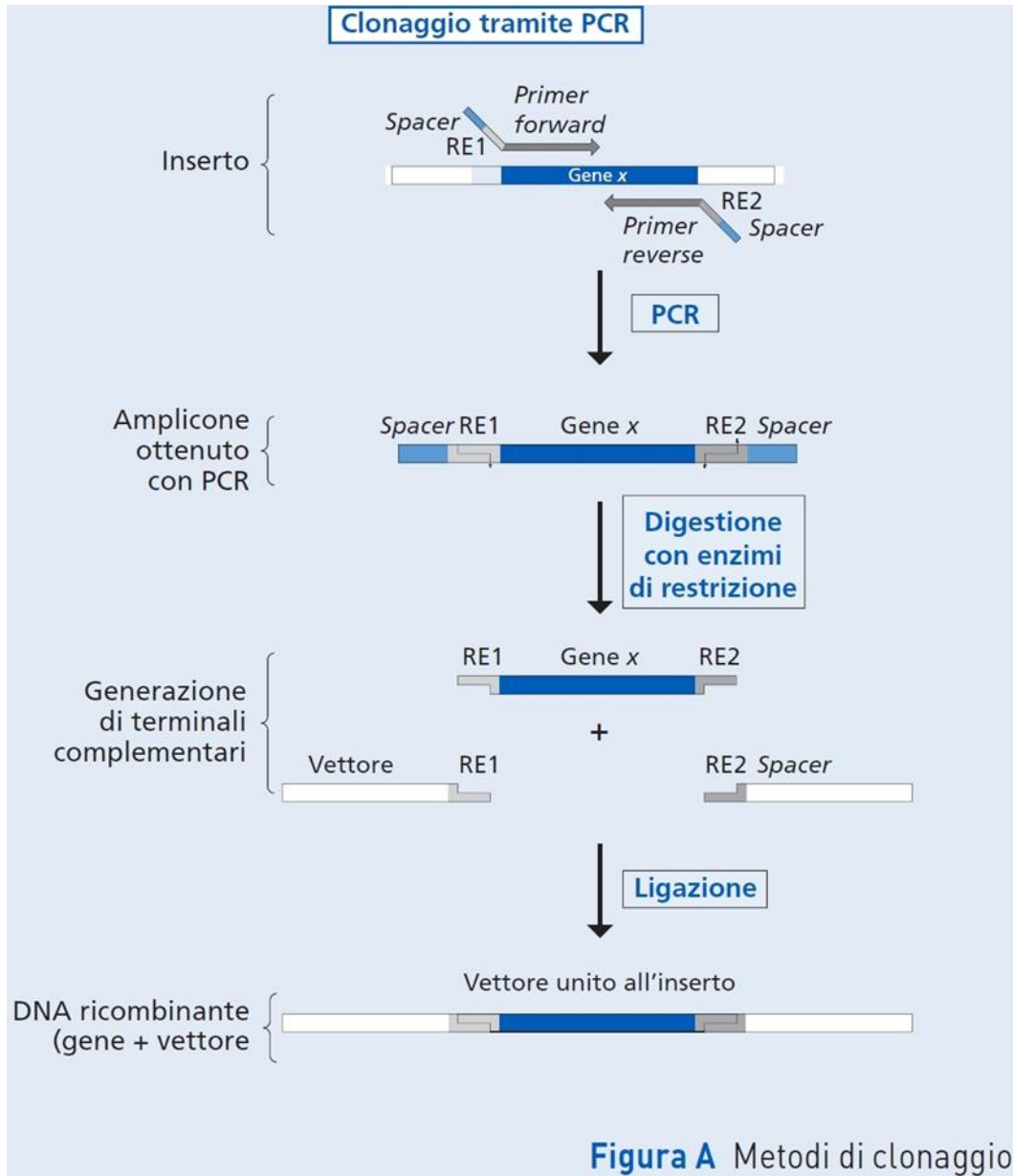
La **trasformazione** permette di inserire DNA plasmidico nei batteri.

Alla miscela DNA e batteri si aggiungono ioni Cl⁻ (in una soluzione acquosa di CaCl₂) che neutralizzano la carica negativa del DNA e generano delle fenditure nella parete cellulare aumentandone, in modo transitorio, la permeabilità, grazie anche a un concomitante shock termico (pochi secondi a 42°C).

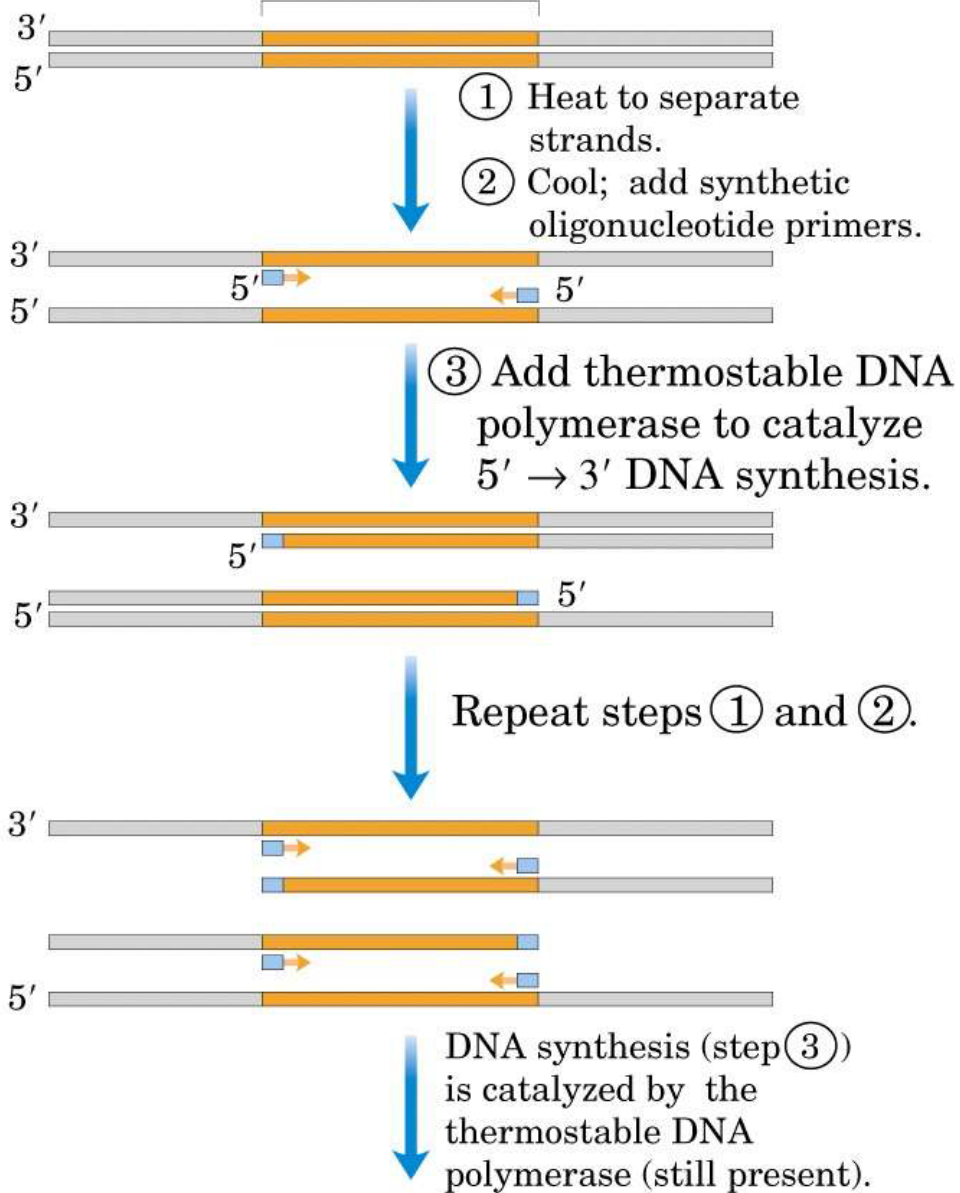
Clonaggio mediante PCR



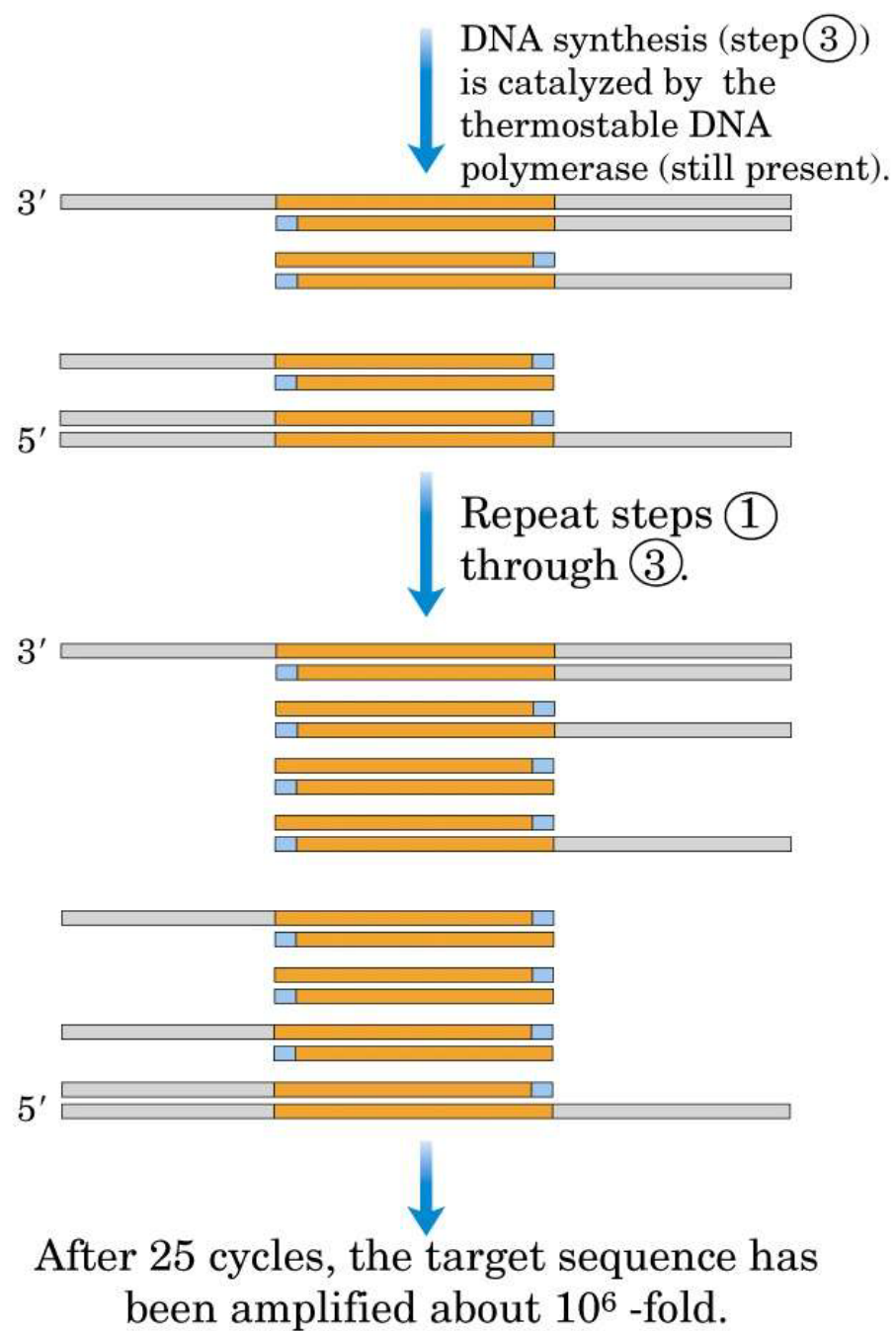
In alternativa e attualmente



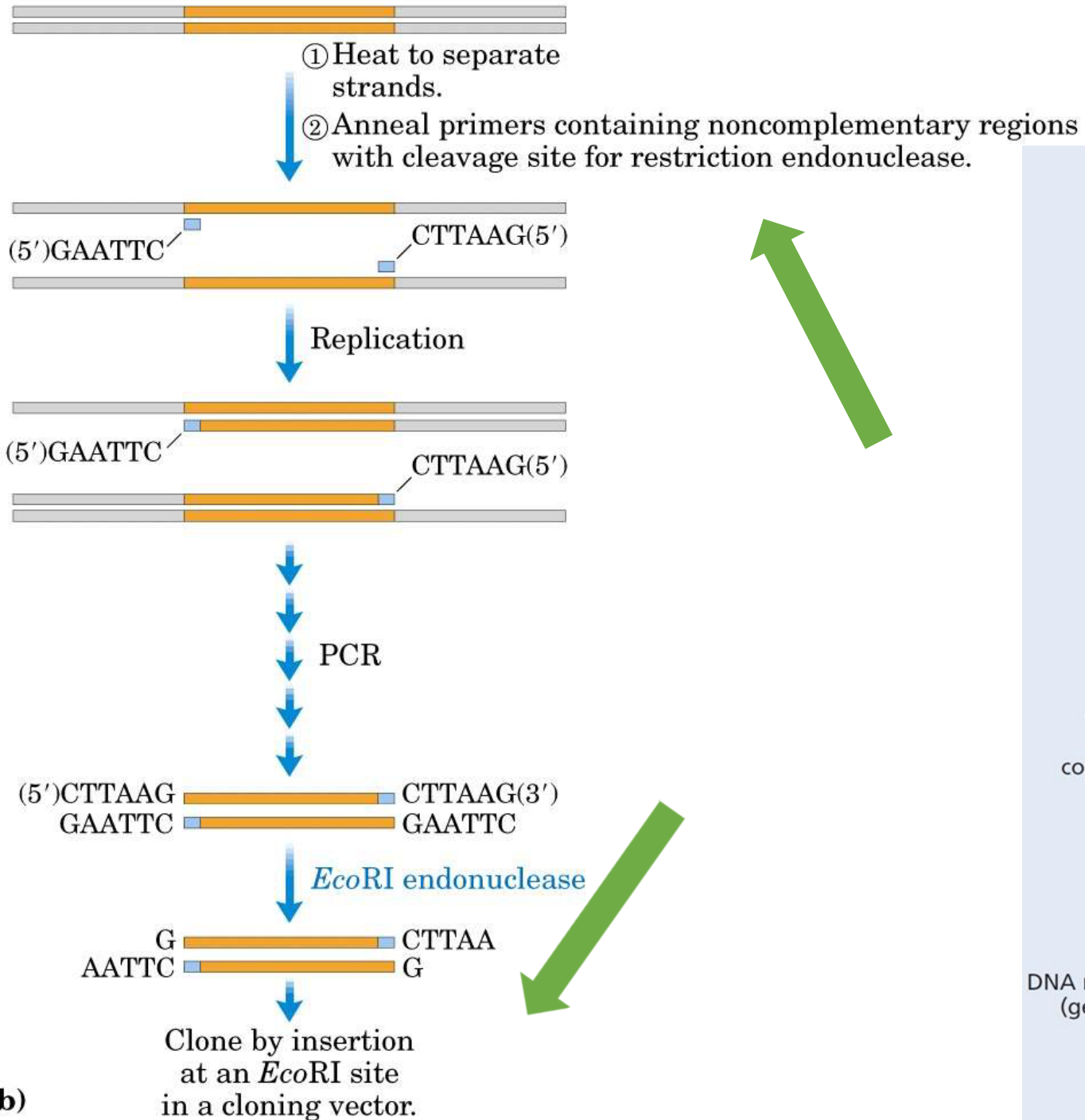
Region of target DNA
to be amplified



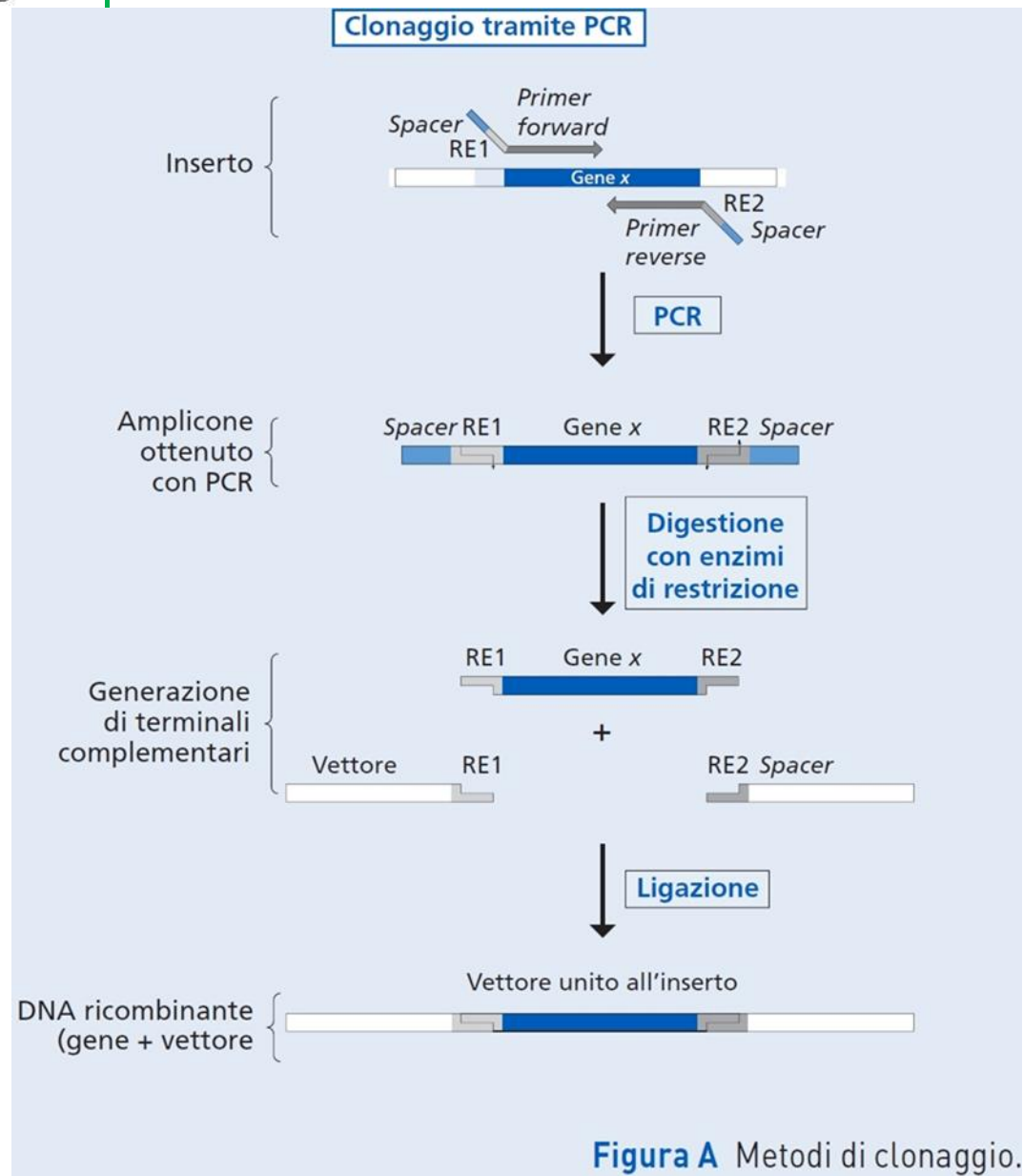
(a)



(a)



(b)



POI,

Per la moltiplicazione della molecola di DNA ricombinante

Si possono utilizzare come vettori

PLASMIDI o VIRUS


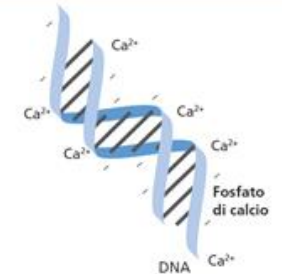
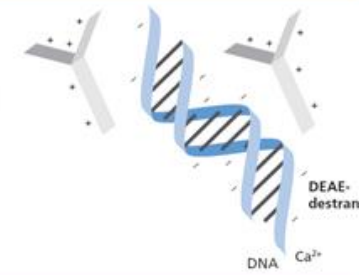

Tabella 8.1 I vettori di DNA.

Nome	Dimensione dell'inserito (numero di nucleotidi)	Ospite	Utilizzo
Plasmide	3000	Batterio, mammifero	Clonaggio, produzione
Cosmide	45 000	Batterio	Genoteche
YAC	800 000	Lievito	Genoteche
Virus batteriofago	20 000-30 000	Batterio	Genoteche
Baculovirus	25 000	Insetto	Produzione
Virus di mammiferi	20 000	Mammifero	Clonaggio, produzione

I vettori devono:

- essere replicabili, cioè contenere un'origine di replicazione (come i plasmidi batterici) o potersi integrare nel genoma della cellula ospite (si pensi ai vettori virali)
- contenere un marcatore di selezione, cioè una sequenza di DNA che conferisca alla cellula ospite la resistenza a un antibiotico specifico (per esempio, tetraciclina per le cellule batteriche o neomicina per quelle eucarioti)
- non potersi replicare al di fuori delle cellule bersaglio (per motivi di sicurezza)

Tabella 8.2 Metodi biochimici e fisici per l'inserimento di DNA esogeno in cellule di mammifero.

Metodi biochimici		
Lipofezione	Liposomi: particelle formate da lipidi anionici (analoghi sintetici del doppio strato fosfolipidico della membrana plasmatica) che inglobano DNA quando miscelati insieme. Posti a contatto con le cellule i liposomi si fondono con la membrana plasmatica rilasciando il DNA esogeno all'interno della cellula	Vantaggi: efficienza (< 40%), scarsa tossicità, riproducibilità 
Coprecipitazione con calcio fosfato	Il DNA plasmidico viene miscelato con CaCl ₂ e tampone fosfato in modo che si formi un precipitato di fosfato di calcio che ingloba il DNA. A contatto con la membrana cellulare il precipitato rilascia il DNA che viene incorporato nella cellula	Vantaggi: di semplice attuazione, buona efficienza (< 40%), riproducibile, economico Svantaggi: tossicità, non funziona su alcuni tipi cellulari 
Adsorbimento mediante DEAE-destrano	Dietilamminoetil (DEAE), carico positivamente, associato a un oligomero di D-glucosio (destrano) lega i gruppi fosfato di molecole di DNA mediando il loro ingresso per endocitosi attraverso le membrane cellulari. Le cellule vengono preparate mediante shock osmotico con glicerolo o dimetilsolfossido (DMSO)	Vantaggi: di semplice attuazione Svantaggi: efficienza scarsa 
Infezione con vettori virali	Virus a integrazione nel genoma (retrovirus, lentivirus, adeno-associati) e virus episomali (adenovirus)	Vantaggi: ottima efficienza, specificità per alcuni tipi cellulari Svantaggi: costi elevati, mutagenesi inserzionale 

Metodi di trasferimento del DNA in cellule in coltura

Metodi fisici

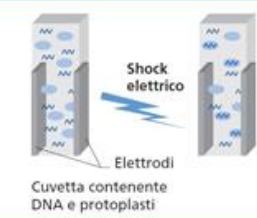
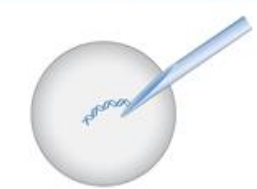
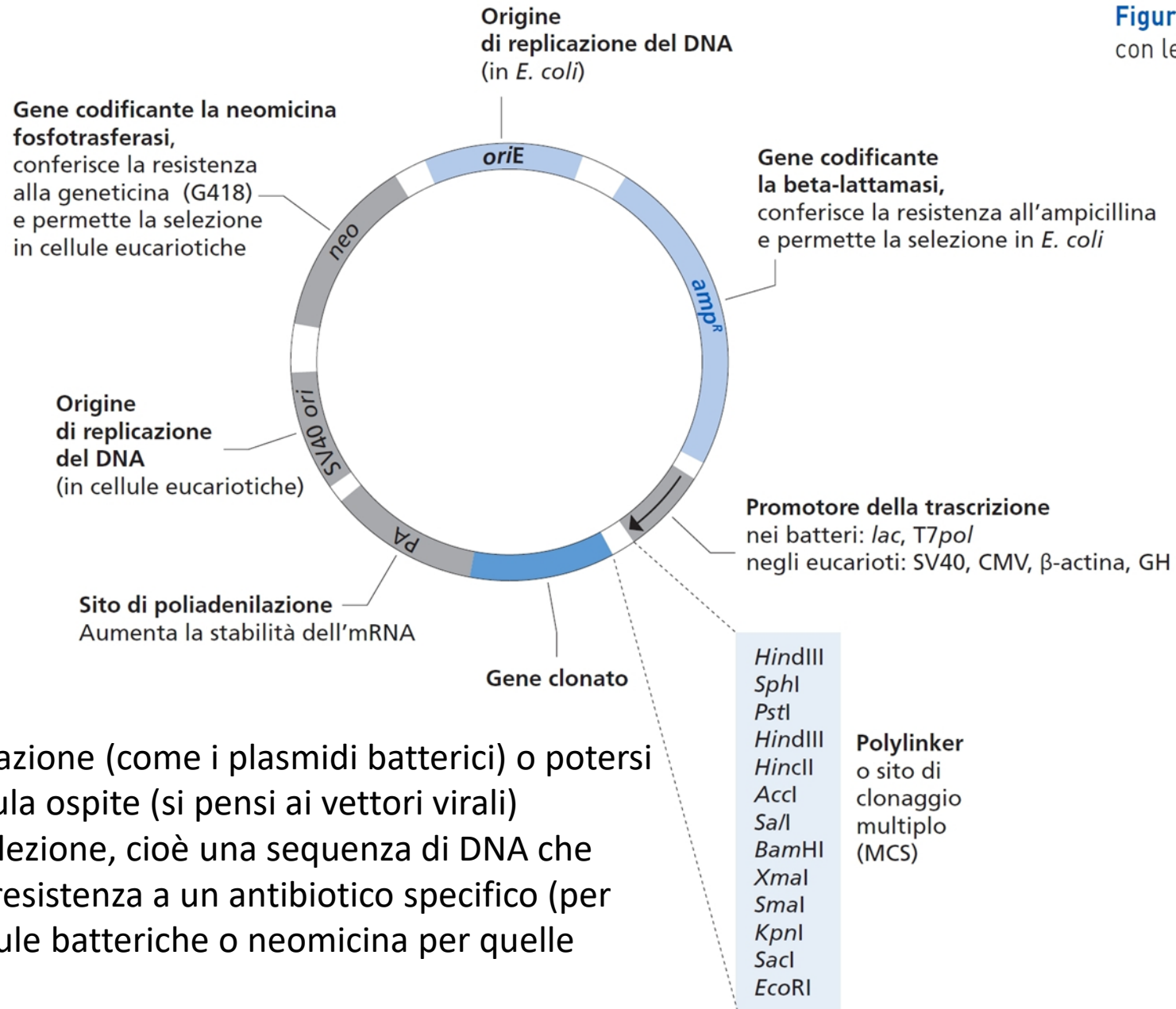
Elettroporazione	Il DNA viene miscelato con una sospensione concentrata di cellule in una cella collegata a due elettrodi. Il passaggio di un impulso elettrico genera dei pori sulla membrana cellulare in cui penetra il DNA	Vantaggi: adatta per cellule che crescono in sospensione o con membrane cellulari resistenti Svantaggi: tossicità 
Microiniezione	Il DNA viene iniettato direttamente nel nucleo di una cellula utilizzando un'attrezzatura che contiene microiniettore e microscopio a contrasto di fase	Vantaggi: efficienza elevata Svantaggi: non applicabile in larga scala, necessita di buona manualità dell'operatore 

Figura 8.3 Mappa di un plasmide con le principali caratteristiche.



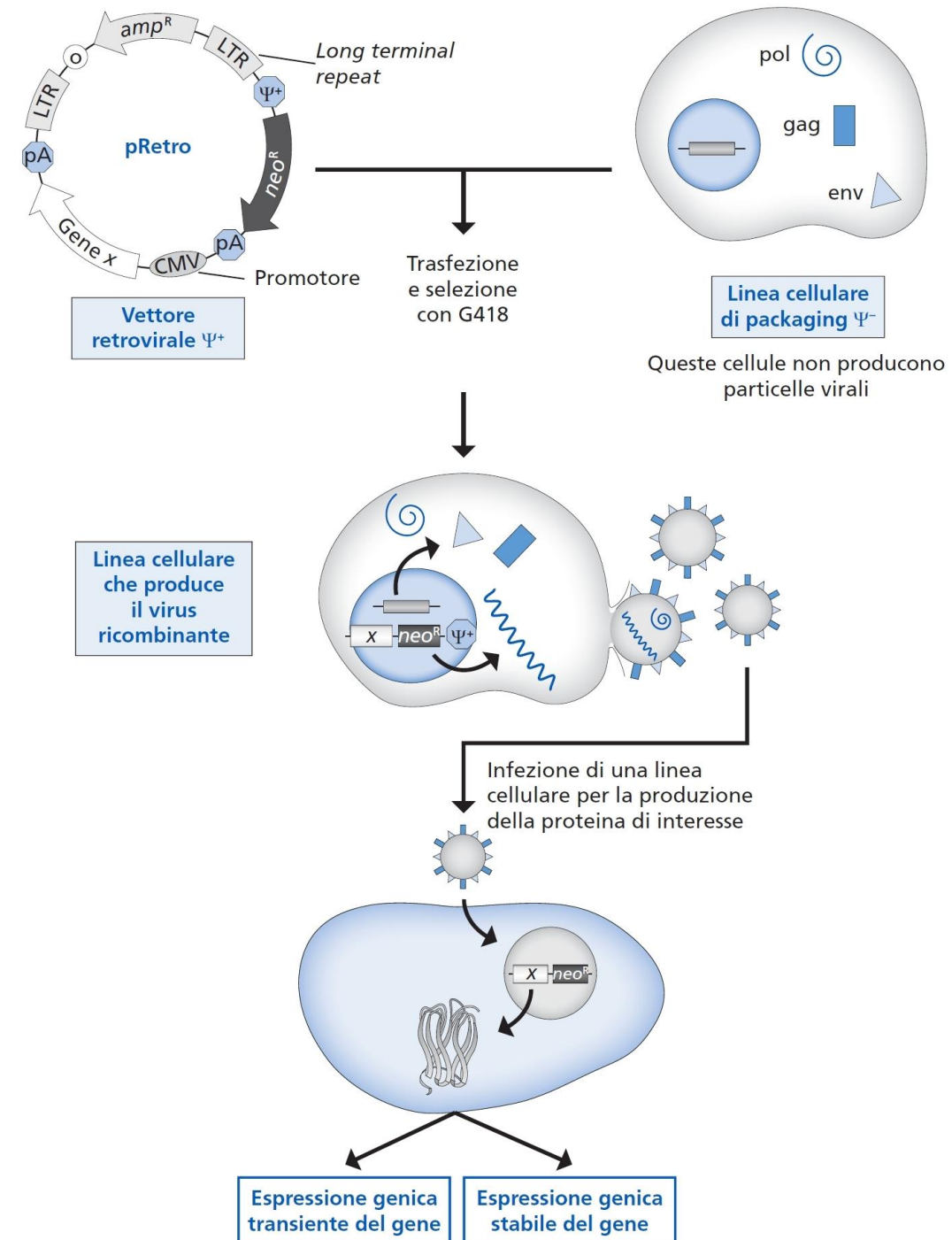
I vettori devono:

- contenere un'origine di replicazione (come i plasmidi batterici) o potersi integrare nel genoma della cellula ospite (si pensi ai vettori virali)
- contenere un marcatore di selezione, cioè una sequenza di DNA che conferisca alla cellula ospite la resistenza a un antibiotico specifico (per esempio, tetraciclina per le cellule batteriche o neomicina per quelle eucarioti)
- non potersi replicare al di fuori delle cellule bersaglio (sicurezza)

Figura 8.4 DNA ricombinante e infezione virale.

In questo caso nel genoma virale sono stati eliminati/modificati i geni responsabili della formazione di particelle virali, dell'infezione e dell'uccisione delle cellule infettate (group antigen protein: **gag**; trascrittasi inversa, RNasi H e integrasi: **pol**; proteine del capside: **env**).

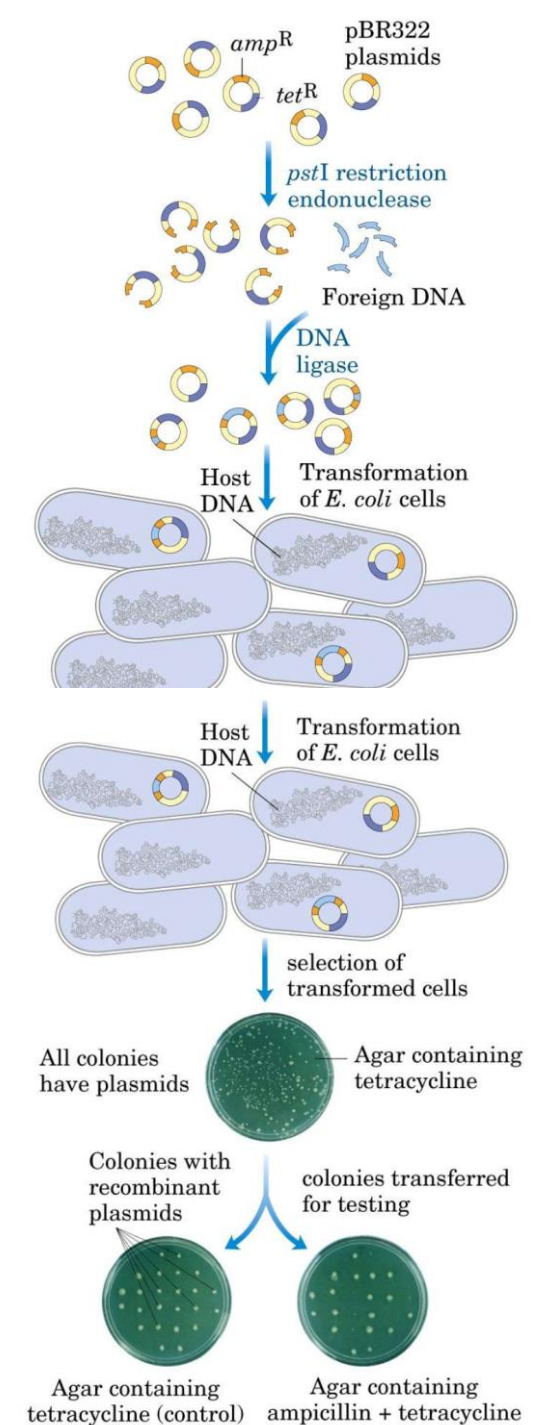
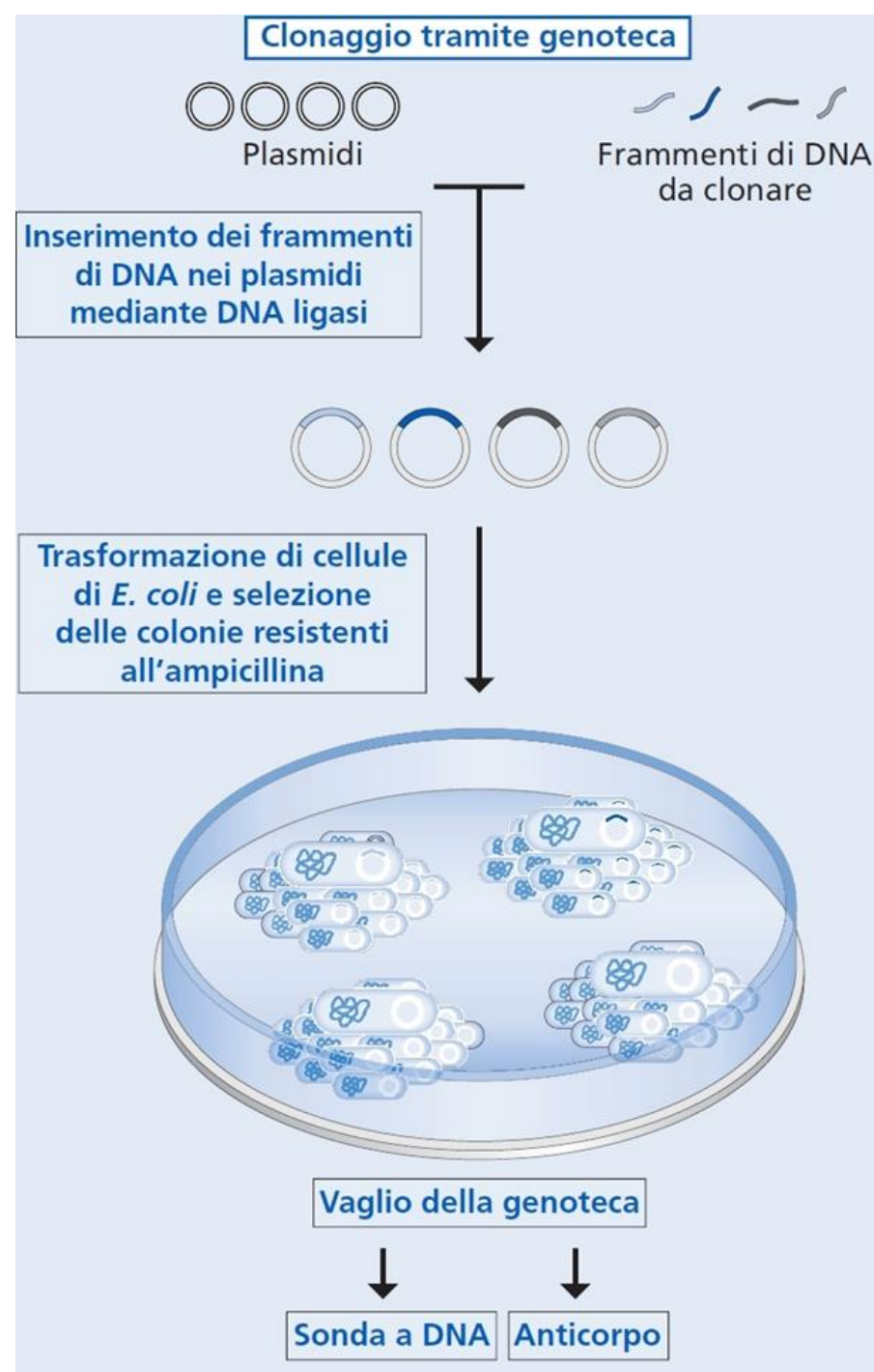
Il vettore virale contiene però la sequenza Ψ deputata all'impacchettamento del DNA virale nei virioni, necessaria per poter ricostruire le particelle virali in una fase successiva. Infatti, il vettore virale, una volta legato al gene d'interesse, viene transfettato in cellule batteriche ingegnerizzate (dette packaging cells) contenenti i geni virali **gag**, **pol** ed **env**. Grazie all'espressione di queste proteine virali, il DNA ricombinante transfettato viene impacchettato dalle packaging cells in particelle virali. In seguito, le particelle virali sono utilizzate per infettare cellule ospiti (batteriche o eucariote) in cui avviene l'espressione della proteina d'interesse, grazie alla presenza nei vettori virali di promotori della trascrizione genica.



Nella **transfezione** i plasmidi sono inseriti in cellule di mammifero con metodi chimici o fisici, come uno shock elettrico, l'uso di liposomi oppure la microiniezione.

Per isolare e propagare cloni cellulari in cui il gene sia integrato stabilmente nel genoma, si procede con una **transfezione** stabile in cui, dopo la transfezione, l'antibiotico di selezione è mantenuto nel mezzo di coltura per diverse settimane, in modo da eliminare tutte le cellule non transfettate e poter propagare solo quelle ricombinanti.

L'**infezione mediata dai virus** è un procedimento molto efficiente per l'integrazione del DNA ricombinante nel cromosoma batterico o di cellule eucariotiche.

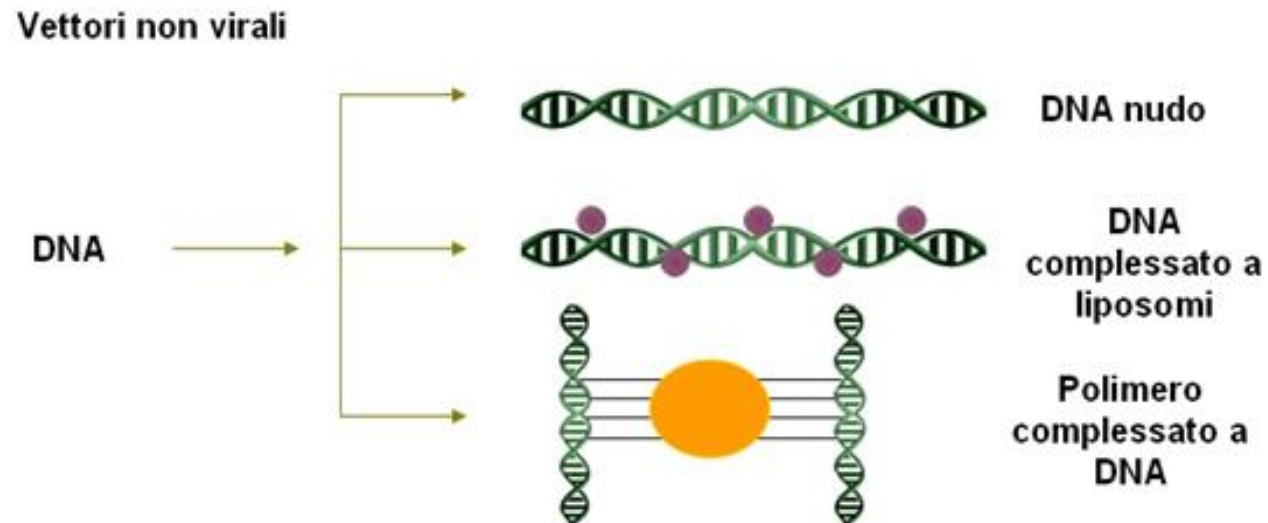


Vettori utilizzati per terapie geniche

Per trasferire il **transgene** nella cellula bersaglio è necessario disporre di un sistema in grado di veicolarvi all'interno il DNA, cioè un vettore.

Esistono due grandi categorie di vettori che consentono il trasferimento genico:

- **Vettori non virali**: si basano sull'uso di DNA, da solo o complessato a molecole che ne facilitino l'ingresso nella cellula



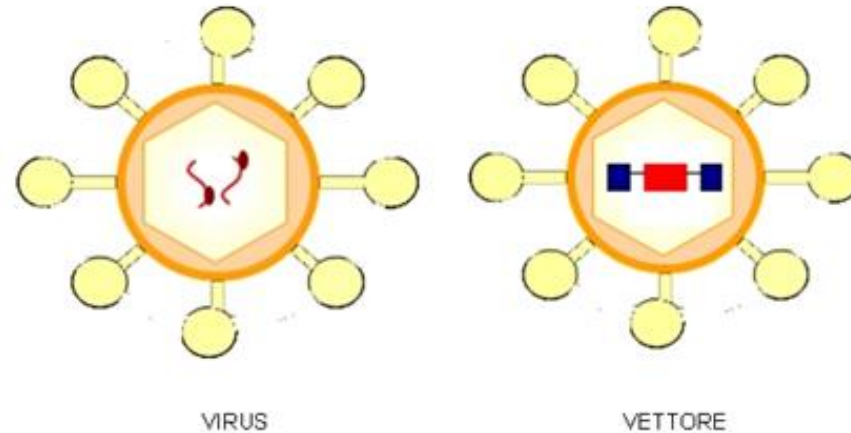
- **Vettori virali:** si basano sull'utilizzo di virus opportunamente modificati in modo tale da poter veicolare il genoma all'interno delle cellule bersaglio senza dare malattia (**retrovirali, adenovirali, herpes simplex, adenoassociati**)

I virus sono entità **specializzate nel trasferimento di informazione genetica** nelle cellule → **Per questa ragione si è pensato di sfruttare questa loro peculiarità adattandola alle opportune necessità.**

A differenza dei virus, i vettori da essi derivati **non sono in grado di portare a termine un'infezione produttiva in seguito all'introduzione del materiale genetico** (trasduzione).

Tuttavia gli organismi hanno sviluppato barriere fisiche e biologiche per evitare proprio l'introduzione di materiale genetico esogeno al loro interno da parte dei virus. Questo rappresenta una difficoltà da tenere in considerazione nello sviluppo e nell'applicazione dei vettori virali.

Il costrutto di un vettore virale prevede la delezione parziale o totale di alcuni geni virali (p.es gag, pol, env; solitamente responsabili dell'attività patologica, ma non indispensabili per l'inserimento del transgene nella cellula.



L'eliminazione di parti del genoma virale originale consente anche di avere maggior spazio a disposizione per inserire la cosiddetta "cassetta di espressione" contenente il transgene.

Non esiste un vettore ideale adatto per ogni situazione, ma ognuno di essi è caratterizzato da vantaggi e svantaggi da prendere in considerazione di volta in volta, in relazione alle caratteristiche della patologia da trattare.

VETTORI RETROVIRALI

Caratteristiche:

- virus a RNA;
- enzima trascrittasi inversa permette di sintetizzare un DNA complementare;
- capacità di integrazione del DNA complementare in quello cromosomico;
- veicolano inserti di DNA lunghi sino a 8kb.



Vantaggi:

- DNA integrato in modo stabile anche nella progenie cellulare permette una terapia genica a lungo termine;
- applicazione in tumori di tessuti non proliferanti dove solo cellule cancerogene sono in attiva replicazione consentendo una infezione selettiva rispetto al tessuto circostante.

Svantaggi:

- non applicabile a terapia genica *in vivo* per clearance virale da parte del sistema immunitario;
- bassa produzione;
- infettano solo cellule in attiva replicazione non adatti nelle patologie con tessuti con replicazione cellulare ridotta o nulla (es. tessuto nervoso).

VETTORI ADENOVIRALI

Caratteristiche:

- virus a DNA ;
- tropismo particolare per l'epitelio respiratorio, la cornea ed il tratto gastrointestinale;
- infettare un'ampia gamma di tipi cellulari;
- non c'è integrazione del DNA;
- veicolano inserti di DNA lunghi sino a 7-8kb.



Vantaggi:

- possono essere prodotti con titoli elevati;
- applicazione nella terapia genica per patologie genetiche ereditarie.



Svantaggi:

- non è possibile avere un'espressione a lungo termine dei geni inseriti per mancanza di integrazione;
- difficile applicazione in terapia genica contro il cancro potendo infettare ogni tipo di cellula non è possibile avere una azione di tossicità selettiva solo per cellule cancerogene;
- inducono forti risposte immunitarie.

Le tecniche del DNA ricombinante nella ricerca e sviluppo di nuovi farmaci

Screening di tipo fenotipico (classico): prima *in vitro* (sistemi cellulari, tessuti) poi *in vivo* (modelli animali di malattia)

(Precoce indicazione di efficacia o no, maggiore lentezza e «impegno»)

Screening on target (genetico o meccanicistico): indagine (anche HTS) sul bersaglio molecolare

(+ rischiosi anche per la tardiva rilevazione di adeguatezza/funzionamento o no alle fasi finali)

Pro e contro, (unknown unknowns)

E' inoltre possibile ingegnerizzare le linee cellulari umane con **geni reporter di funzione**, ossia costrutti che permettono la rilevazione e misurazione della funzione di geni e proteine. Questi sistemi permettono di eseguire lo screening di farmaci ad azione su uno specifico bersaglio molecolare e si sono dimostrati molto potenti per vagliare con strumentazione robotizzata a elevato rendimento l'attività di miriadi di molecole in modo sistematico.

Queste «**piattaforme**»
(**sistemi**) consentono studi
ad elevato rendimento
(*High Throughput
Screening HTS*)

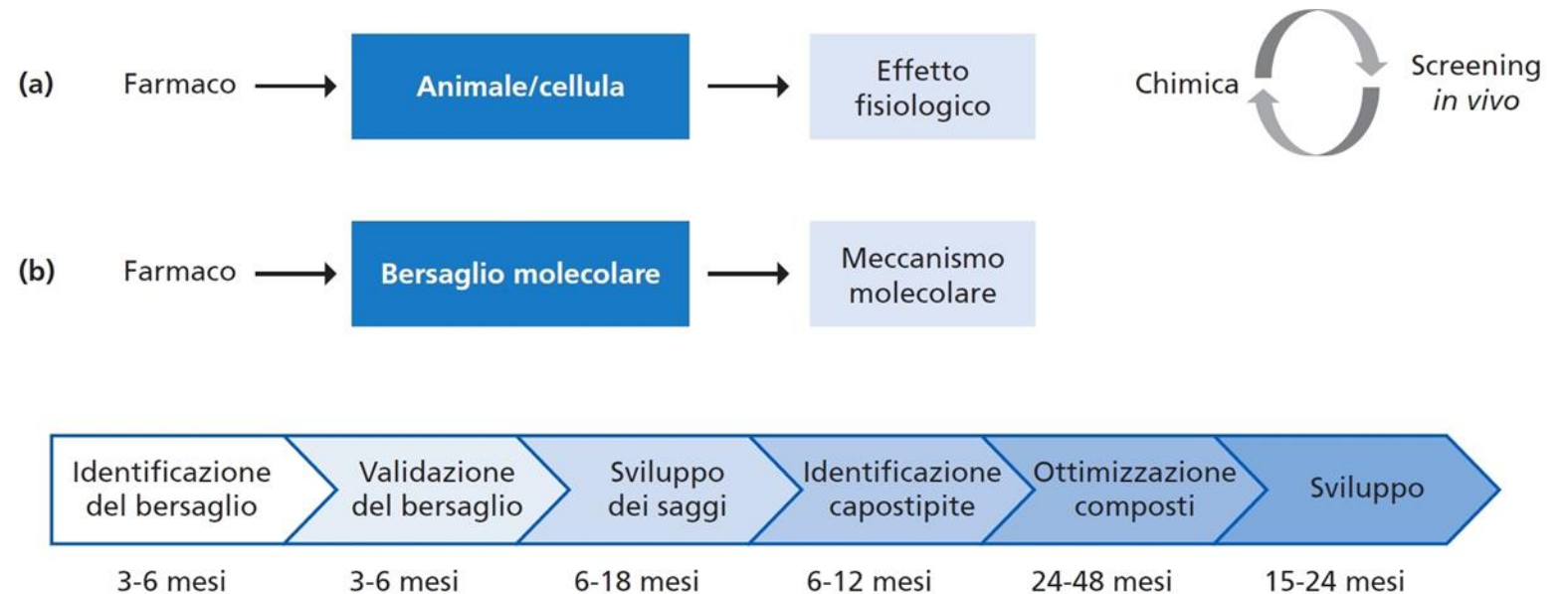


Figura 2.2 Confronto tra ricerca e sviluppo di un farmaco basato su screening fenotipico o su screening *on target*. **(a)** Screening fenotipico: l'effetto del farmaco viene definito da parametri specifici misurati in un organismo animale, in una cellula o in una coltura d'organo. I saggi sono progettati usando le conoscenze sulla malattia, degli effetti di altri farmaci su essa o su basi biologiche. I composti vengono migliorati sulla base degli effetti e ritestati. **(b)** Screening *on target*: lo studio è basato sull'identificazione del bersaglio (fasi di identificazione e validazione), quindi si progetta un sistema ad alta resa (generalmente cellulare) robotizzato, che usa fluorofori che rivelano l'interazione farmaco-bersaglio. Il saggio permette di identificare la molecola capostipite utilizzando una libreria di composti; viene quindi ottimizzata la sua interazione con il bersaglio (ottimizzazione dei composti).

Bersagli genetici: p.es. i casi di Alzheimer familiare con mutazioni familiari della beta-amiloide o degli enzimi del suo catabolismo

Bersagli meccanicistici: recett./enzimi collegati al rischio p.es. di depressione, malattie cardiovascolari etc.

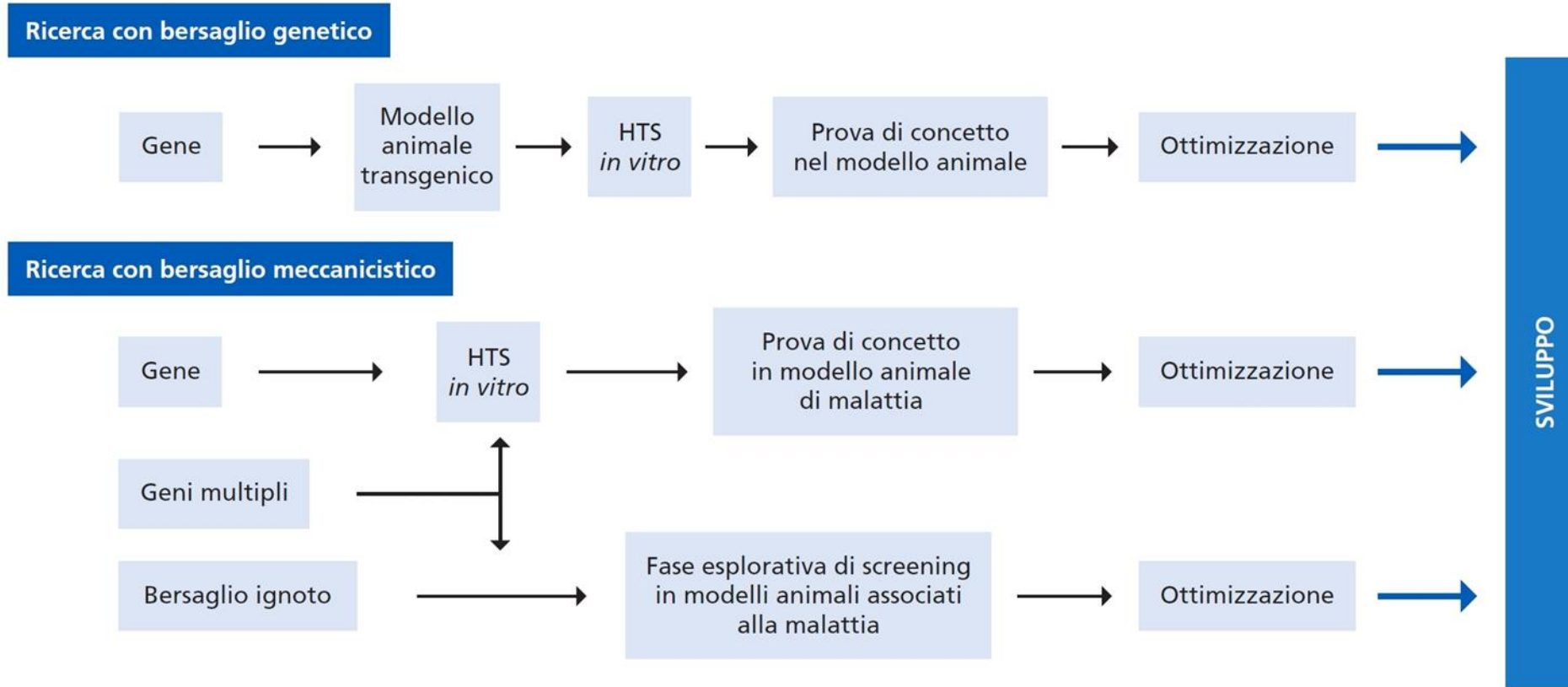


Figura 2.3 Diagramma di flusso del processo di R&S. Visione riassuntiva di un processo di ricerca con una profonda integrazione tra progettazione razionale di un farmaco e suo studio in modelli di malattia, al fine di evidenziare fin dalle prime fasi le limitazioni farmacocinetiche e farmacodinamiche dei composti in studio; il processo di ottimizzazione prevede che lo studio dei nuovi composti venga ogni volta ripetuto nei modelli animali.

Tabella 8.3 Caratteristiche di alcune delle principali proteine reporter.

Proteina reporter	Metodi di rilevazione dell'attività	Vantaggi	Svantaggi
β -galattosidasi	Saggio colorimetrico	Ben caratterizzata, stabile, rilevazione automatizzabile	Presenza di attività endogena in cellule di mammifero, enzima tetramerico (risposta non lineare)
Luciferasi	Emissione di fotoni	Alta attività specifica, mancanza di attività endogena (basso background)	Richiede l'aggiunta di luciferina, cofattore, O ₂ , ATP
GFP (<i>Green Fluorescent Protein</i>)	Emissione di fluorescenza	Monomeric, non richiede substrato, assente nei mammiferi, varianti con diversa fluorescenza	Bassa sensibilità per mancanza di amplificazione (non è una reazione enzimatica)

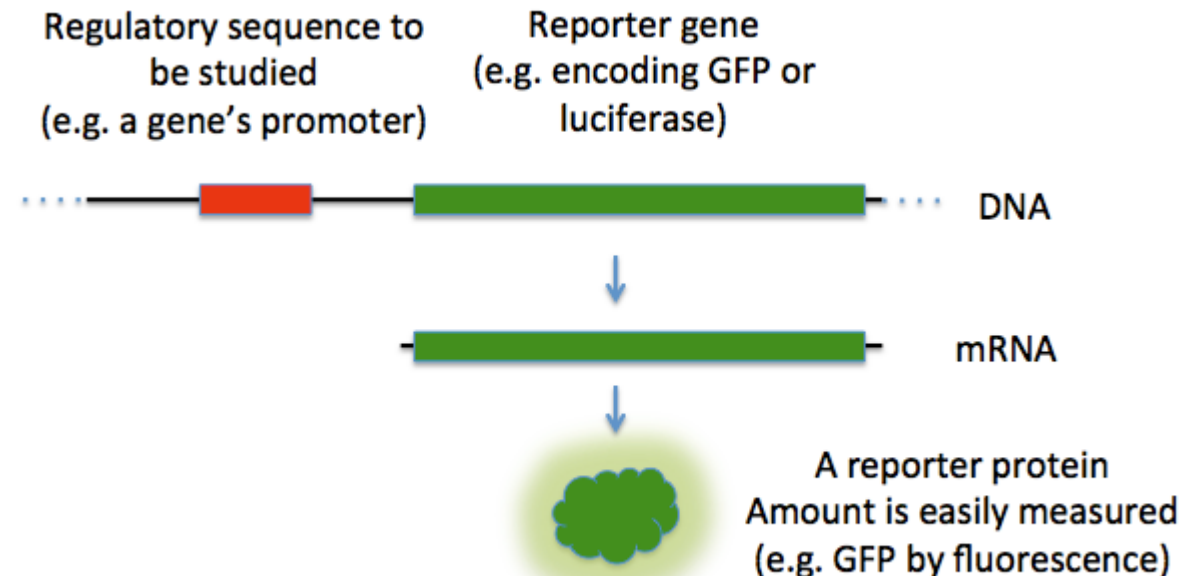


Tabella 2.1 Rischi e benefici delle ricerche fenotipica e *on target*.

	Ricerca <i>on target</i>		Ricerca fenotipica
	Target genetico	Target meccanicistico	
Tipo di malattia	Malattia genetica	Tutte	Tutte
Tipo di bersaglio	Singolo gene associato alla malattia	Qualsiasi	Qualsiasi
Numero di bersagli	Singolo	1-3	Multiplo
Metodo di screening principale	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Analisi	Regolazione genica	Modulazione del target	Parametri fisiologici diversi
Identificazione del bersaglio	Studi genetici e di associazione (<i>linkage analysis</i>)	Osservazioni fisiologiche	Non richiesta
Validazione del bersaglio e prova di principio	Fenotipo dell'animale transgenico e reversibilità di tale fenotipo	Farmaci, siRNA o antisenso in un modello rilevante di patologia	Farmaci, siRNA o antisenso in un modello rilevante di patologia
Possibilità di HTS	Sì	Sì	No
Limitato da specie-specificità	Sì	Sì	Sì
Vantaggi	Modello animale altamente predittivo Uso di animali transgenici per l'identificazione di composti attivi	Screening ad alta resa e progettazione razionale del farmaco	Screening in modelli rilevanti per la patologia e risposta <i>in vivo</i> integrata
Svantaggi	Dimensioni della popolazione portatrice di malattia Forme sporadiche verso forme familiari Ruolo del gene nello sviluppo	Limitato numero di bersagli analizzabili contemporaneamente La famiglia di farmaci isolati può avere effetti biologici indesiderati	Bassa resa Dipendenza assoluta dal modello di screening prescelto Il farmaco di riferimento può avere effetti biologici non noti

Ovviamente, un'applicazione molto importante dell'ingegneria genetica cellulare in ambito farmacologico è la produzione di farmaci.

Le linee cellulari stabilmente transfettate con un gene codificante per una proteina umana sono ampiamente utilizzate per produrre proteine terapeutiche ricombinanti, ulteriormente perfezionabili con successive generazioni di biofarmaci ottenute tramite mutazioni opportune della proteina originaria.

Tabella 9.2 Classificazione delle proteine usate in clinica.

Gruppi	Esempi	Funzione	Impiego clinico	
Gruppo 1 Proteine terapeutiche con attività enzimatica o regolatrice	1a) Sostituire una proteina mancante o anomala	Insulina	Regolazione dei livelli di glucosio	Diabete mellito
		Ormone della crescita	Azioni anaboliche	Difetti della crescita
		Fattore VIII	Coagulazione	Emofilia A
		β -glucocerebrosidasi	Idrolisi del glucocerebroside a glucosio e ceramide	Malattia di Gaucher
		Enzimi pancreatici	Digestione del cibo	Pancreatite cronica, fibrosi cistica, disturbi primari o secondari della digestione
	1b) Potenziare un processo esistente	Eritropoietina	Eritropoiesi	Anemie
		G-CSF	Proliferazione dei neutrofili	Neutropenia
		FSH	Ovulazione	Riproduzione assistita
		Interferone α	Immunoregolatore	Epatite, tumori
		Interleuchina 2	Stimolazione di linfociti T e B	Carcinoma renale metastatico
		tPA	Fibrinolisi	Embolia, infarto acuto, ictus
		Ormone paratiroideo	Formazione dell'osso	Osteoporosi
	1c) Indurre una nuova funzione	Collagenasi	Degradazione del collagene	Ulcere, ustioni
		Streptochinasi	Conversione del plasminogeno in plasmina	Infarto acuto del miocardio, embolia polmonare, trombosi venosa
		Papaina	Proteasi	Ulcere, ferite, ustioni

continua ...

Gruppo 2 Proteine terapeutiche contenenti domini di legame	2a) Regolare attività fisiopatologiche	Anticorpi monoclonali	Legame a VEGF-A	Tumori colon-retto
		Bevacizumab	Legame a HER2	Tumore mammario HER2*
		Trastuzumab	Legame a TNF α	Malattie autoimmuni
	2b) Rilasciare il principio attivo in un distretto specifico	Adalimumab	Legame a IL2R	Rigetto acuto del trapianto renale
		Basiliximab	Legame a PD1	Melanoma
		Pembrolizumab		Tumore polmonare
Nivolumab				
Proteine di fusione (per esempio, CTLA4-IgG, sTNFR-IgG)		Co-inibitore di linfociti T Legame a TNF α	Immunosoppressione Malattie autoimmuni	
Gruppo 3 Vaccini a proteina	Proteine di fusione (per esempio, IL2 e tossina batterica)		Legame a IL2R	Linfoma cutaneo a cellule T
		Immunotossine		
	Anticorpi coniugati	Brentuximab	Legame a CD30	Linfoma di Hodgkin CD30*
		Trastuzumab emtansine	Legame a HER2	Tumore mammario HER2*
		Radioimmunoconiugati	Legame a CD20	Linfoma follicolare non-Hodgkin
Gruppo 4 Proteine per diagnostica	Ibritumomab tiuxetano			

Farmaci biotecnologici

- ❖ **Produzione di nuovi farmaci (ormoni, fattori di crescita, citochine)**
- ❖ **Nuovi meccanismi d'azione**

Il primo farmaco biotecnologico commercializzato per uso terapeutico nel 1982 è stata l'**insulina** ricombinante

Farmaci biotecnologici di prima generazione (proteine terapeutiche, anche di origine umana, su larga scala)

Farmaci biotecnologici di seconda generazione (peptidi, oligonucleotidi antisenso che hanno principale applicazione come sonde diagnostiche)

1) Proteine terapeutiche

ormoni / proteine la cui sintesi è diminuita
fattori per il potenziamento di risposte immunitarie

produzione di proteine

- in batteri
- in animali transgenici

Fattori limitanti:

- attività biologica
- minima risposta immunitaria del paziente
- somministrazione:
 - limitata attività
 - facile degradabilità
 - (via endovenosa)

**Tossicità di proteine
biotecnologiche effetti
collaterali →
cautela!!!!**

vettori virali con limitazione da virulenza per
direzionare il farmaco

bioreattori da impiantare sottocute per
prolungare attività

2) Vaccini

- ❖ **vettori ingegnerizzati per produzione su larga scala di antigeni utilizzati per la preparazione di vaccini sintetici**
- ❖ **ingegnerizzare il genotipo di virus e batteri ha permesso di ideare nuovi metodi di attenuazione per realizzare vaccini con microorganismi vivi**
- ❖ **conoscenza dei meccanismi molecolari e cellulari di immunità ha permesso la razionalizzazione nel disegno di nuovi vaccini**

3) Biotecnologie e ricerca farmacologica

- ❖ Individuazione di geni a potenziale oncogenico e dei meccanismi che ne determinano l'espressione in cellule neoplastiche
- ❖ malattie ereditarie

**finalità: blocco dell'espressione del gene
sostituzione del gene**

Impiego di modelli animali transgenici

Modelli animali **knock-in** e **knock-out (KO)**

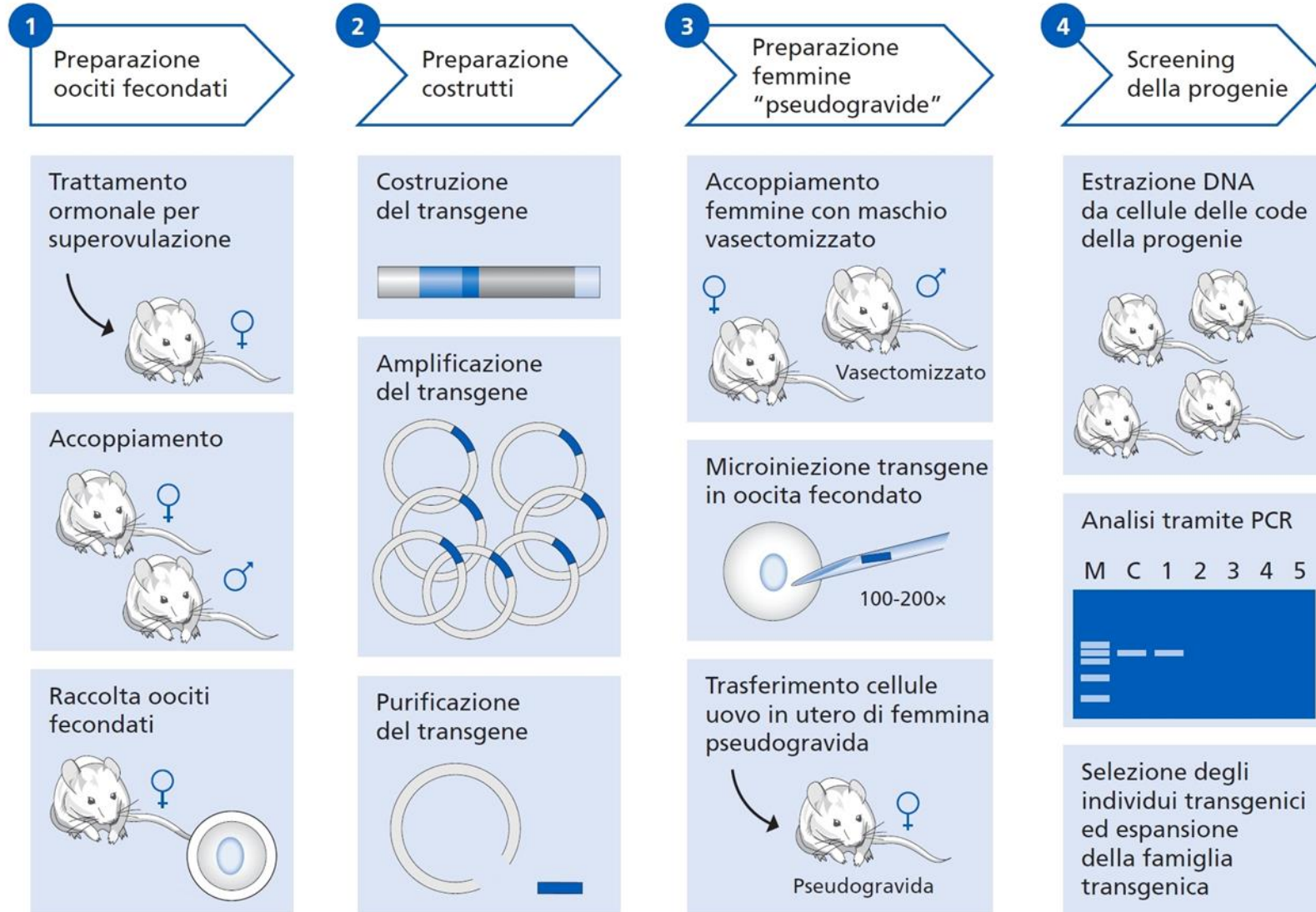
Metodi per la transgenesi animale

Un processo relativamente complesso che utilizza tecniche diverse; le principali sono:

- transgenesi standard;
- gene targeting;
- ricombinazione mediata da CRISPR/Cas9;
- transgenesi condizionale;
- clonazione

Figura 8.7

Tappe sperimentali nella transgenesi animale standard.



La transgenesi standard avviene utilizzando la cellula uovo fecondata e si basa su 4 fasi distinte:

1. preparazione degli oociti fecondati, tramite induzione di superovulazione con trattamenti ormonali specifici seguita da fecondazione per accoppiamento naturale e raccolta delle uova fecondate;
2. in parallelo si isola e purifica un quantitativo elevato del transgene contenente il DNA da integrare nel genoma;
3. microiniezione di 100-200 copie di transgene nel pronucleo maschile (perché leggermente più grande di quello femminile) della cellula uovo fecondata, che è quindi trasferita nell'utero di una femmina pseudogravida (precedentemente posta in accoppiamento con un maschio reso sterile per vasectomia in modo da stimolare un sistema naturale di preparazione dell'utero all'annidamento dello zigote);
4. se gli oociti attecchiscono e la gravidanza procede fino al termine nella madre adottiva (o anche surrogata), l'ultima fase della transgenesi consiste nell'analisi individuale della cucciolata per identificare i portatori del transgene.

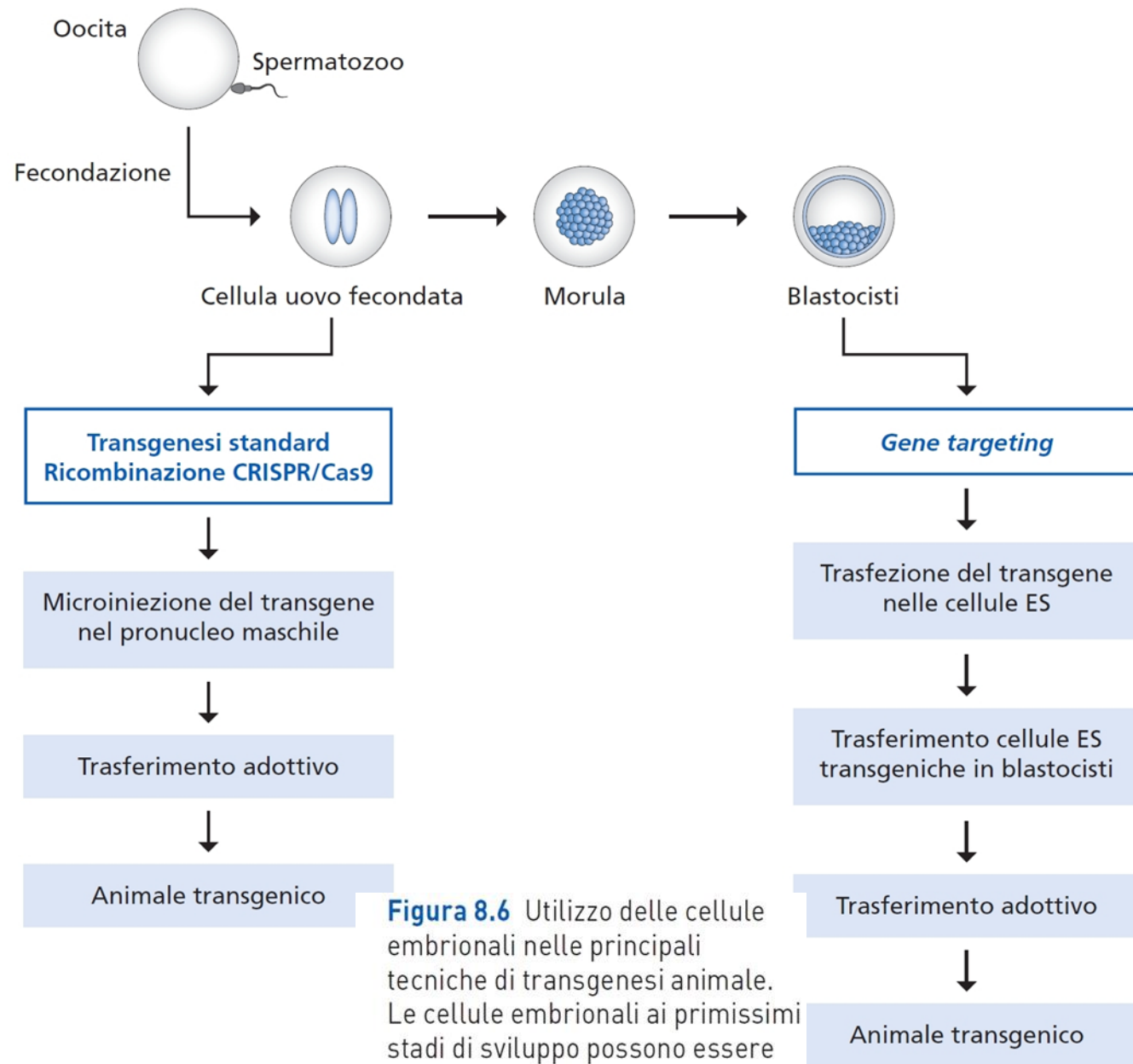


Figura 8.6 Utilizzo delle cellule embrionali nelle principali tecniche di transgenesi animale. Le cellule embrionali ai primissimi stadi di sviluppo possono essere modificate geneticamente e poi impiantate in una madre adottiva per ottenere individui transgenici.

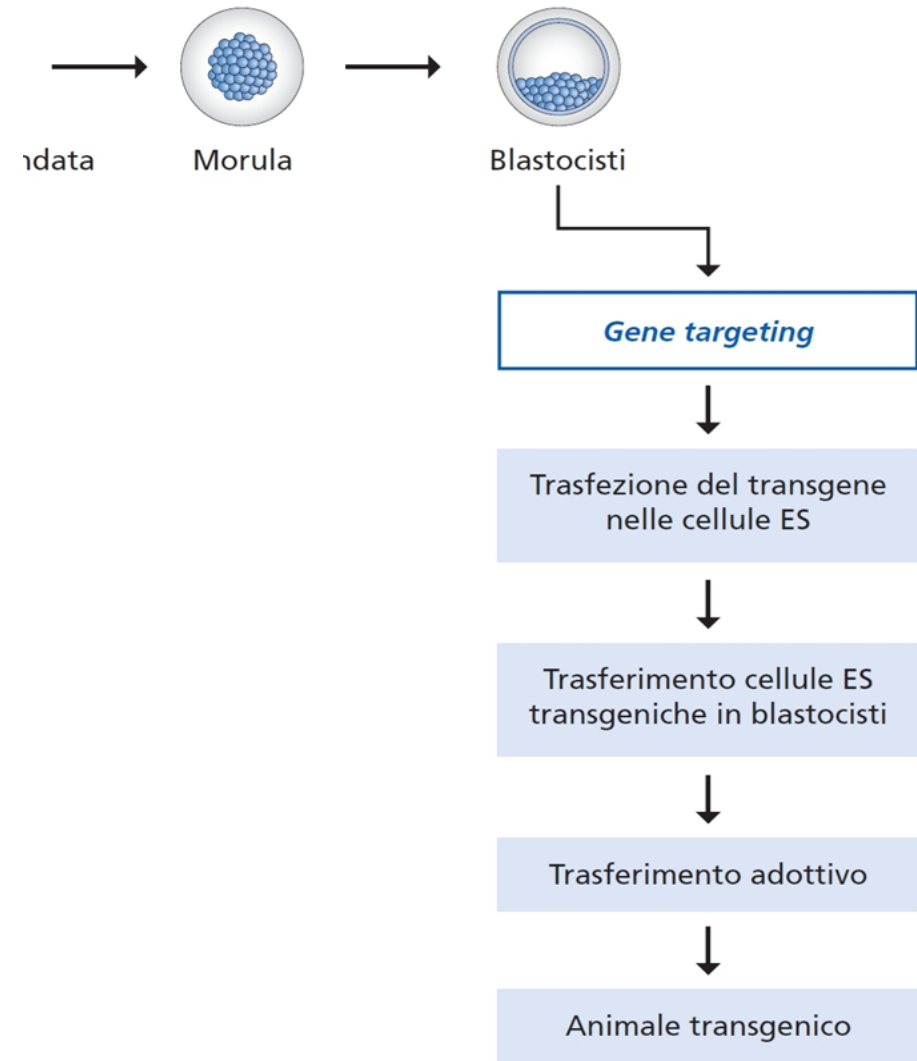
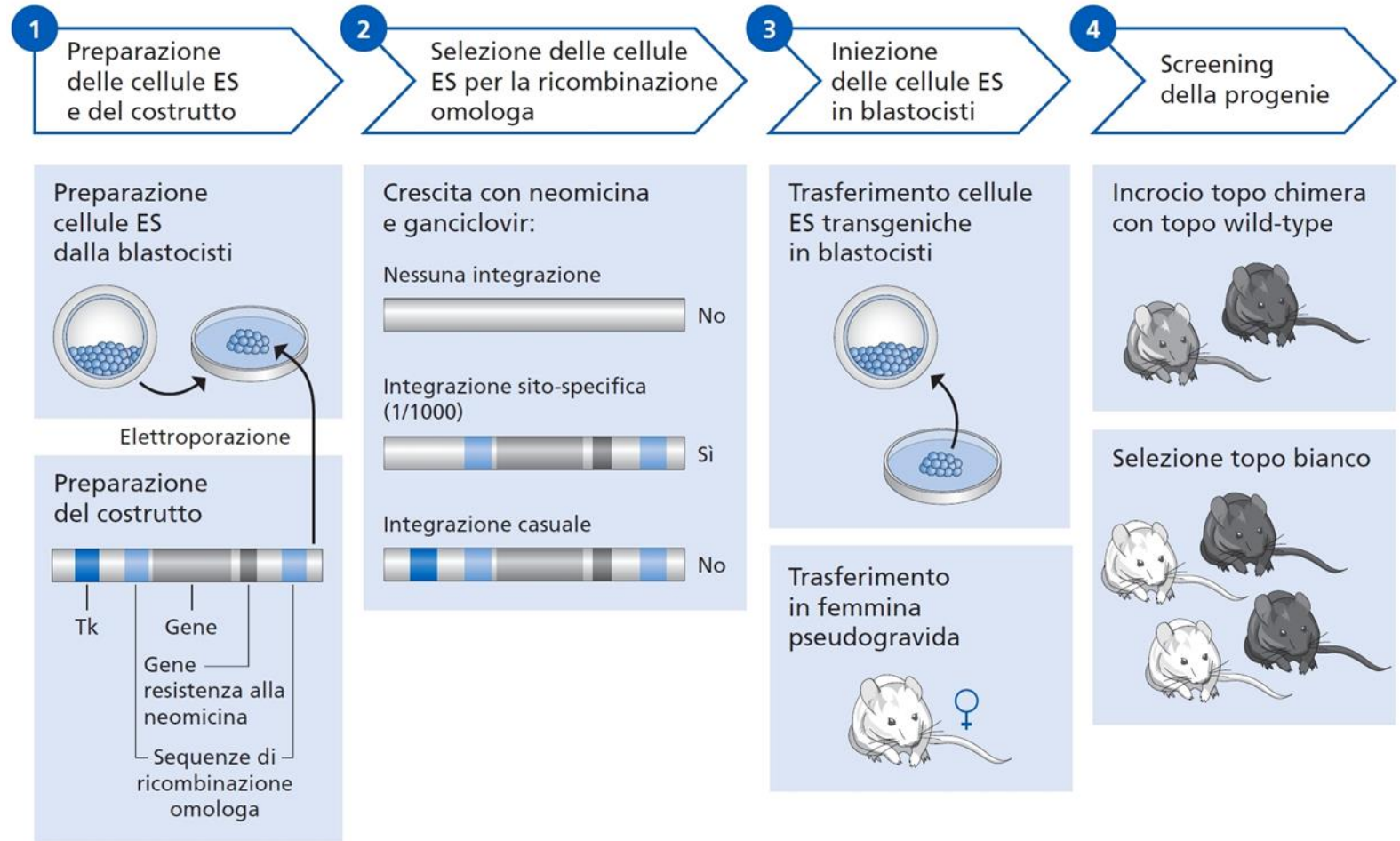


Figura 8.8

Tappe sperimentali del *gene targeting* per la transgenesi animale.



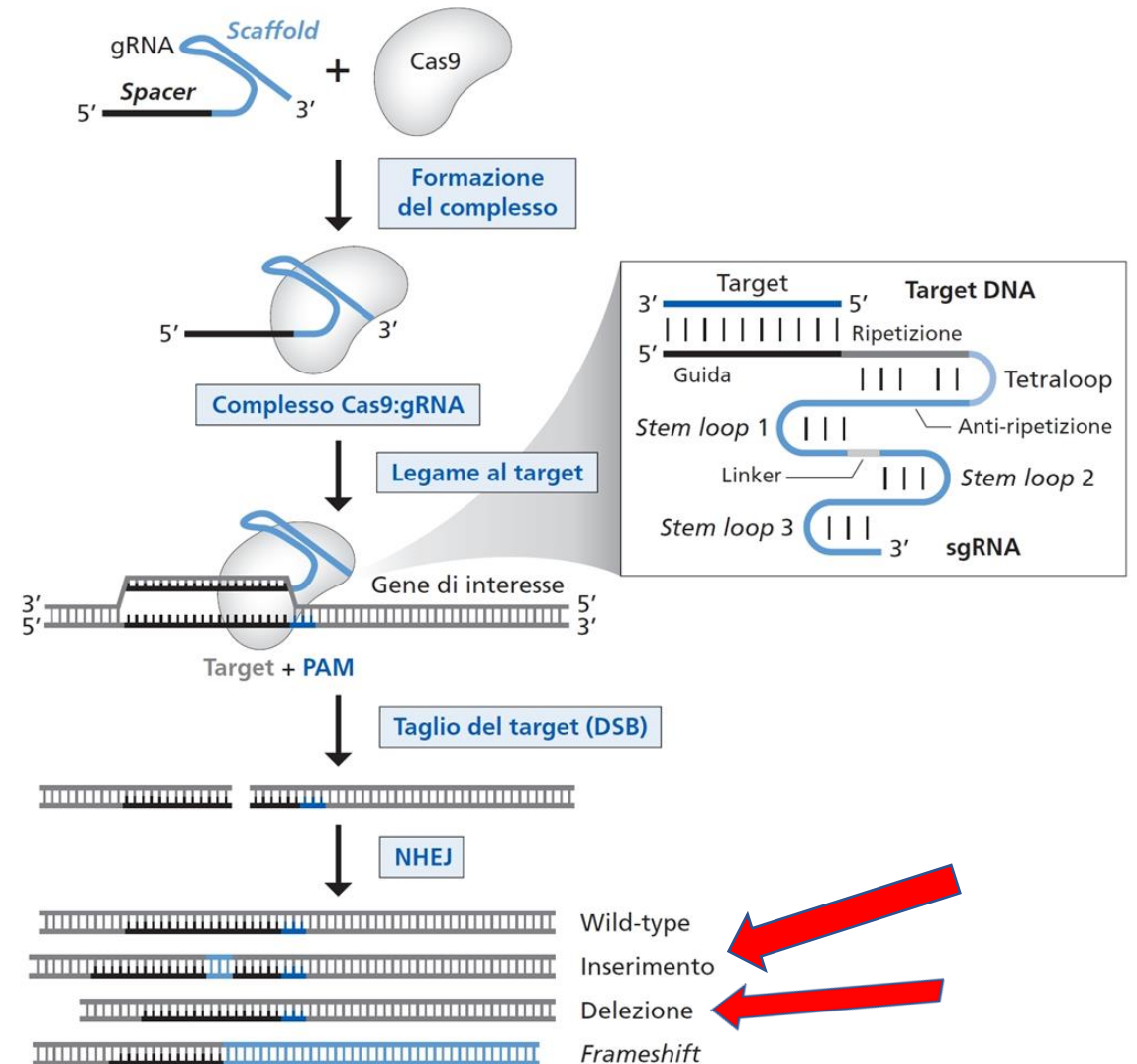
Metodi per la transgenesi animale

- ricombinazione mediata da CRISPR/Cas9;

Sistema CRISPR/Cas9, si basa su sistemi presenti in natura di genome editing, preposti alla correzione del genoma dei batteri per acquisire resistenza contro le infezioni virali.

Nel genoma dei batteri è presente una regione contenente sequenze di DNA chiamate *Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)*, su cui agiscono le proteine dette *CRISPR-associated proteins* o **Cas**.

Per ottenere animali **knock-out o knock-in** con il sistema CRISPR/Cas9 si procede iniettando direttamente nello zigote la proteina Cas batterica insieme a un RNA guida (sintetizzato in modo da contenere la sequenza di appaiamento specifica per il tratto di gene da eliminare o modificare). Dopo pochi giorni in coltura, le cellule transgeniche raggiungono lo stadio di morula, che viene trasferita nell'utero di una femmina pseudogravida. La progenie è analizzata a tre settimane di vita per valutare la presenza della mutazione desiderata (l'analisi si effettua sul genoma prelevato da cellule della coda). Il grado di semplicità, efficienza e adattabilità di questa metodica è talmente elevato che questo sistema di transgenesi sta soppiantando quelli più classici, fornendo modelli molto sofisticati, utili allo studio e allo sviluppo di farmaci e ad altri molteplici tipi di applicazione.



Metodi per la transgenesi animale

Un processo relativamente complesso che utilizza tecniche diverse; le principali sono:

- transgenesi condizionale;

si basa sull'enzima di ricombinazione chiamato Cre (Cyclization Recombination), isolato dal fago P1, che instaura un legame a elevata affinità con brevi tratti di DNA a sequenza specifica, chiamati LoxP, effettuando un taglio all'interno di tali sequenze e richiudendo il DNA eliminando il tratto compreso fra due sequenze LoxP.

Si può avere così la **delezione ubiquitaria o meglio ancora condizionale per tessuto** (CRE associato p.es. a promotore di albumina per il fegato o di nestina per i neuroni o CRE attivato da somm. di sostanze effettuata in un tessuto in un dato momento («a piacere»).

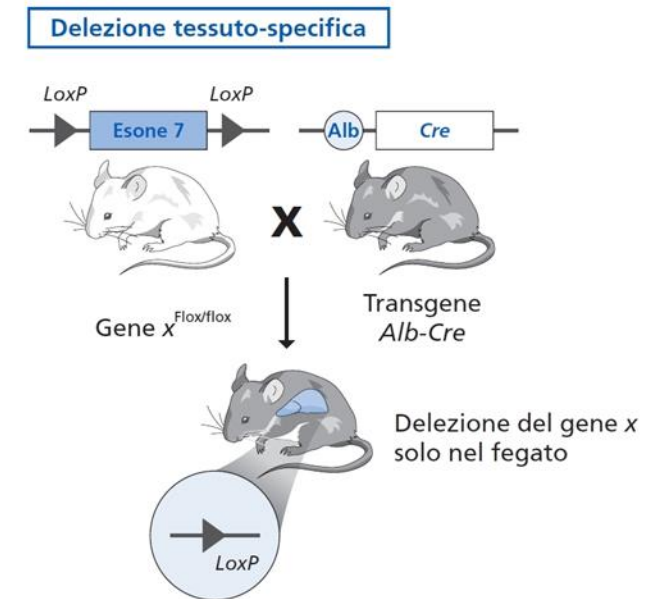
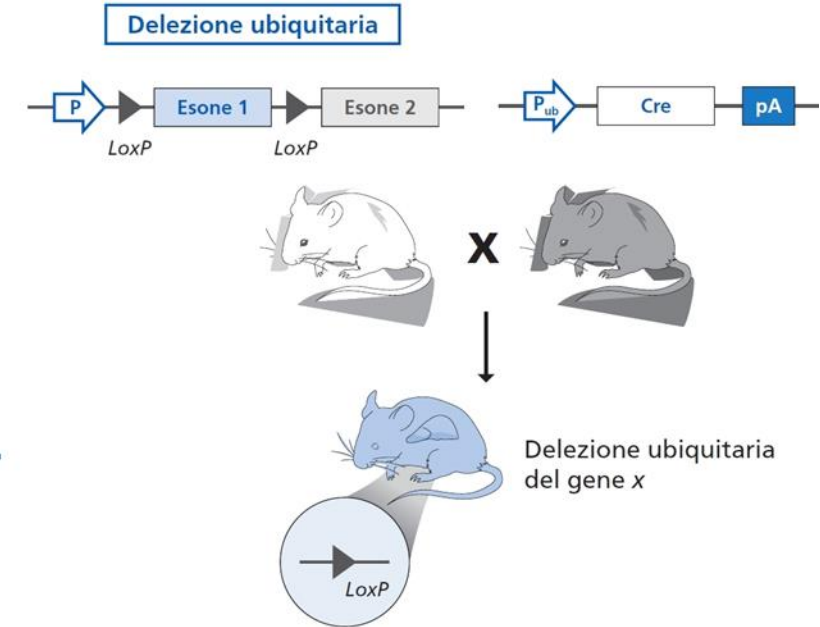
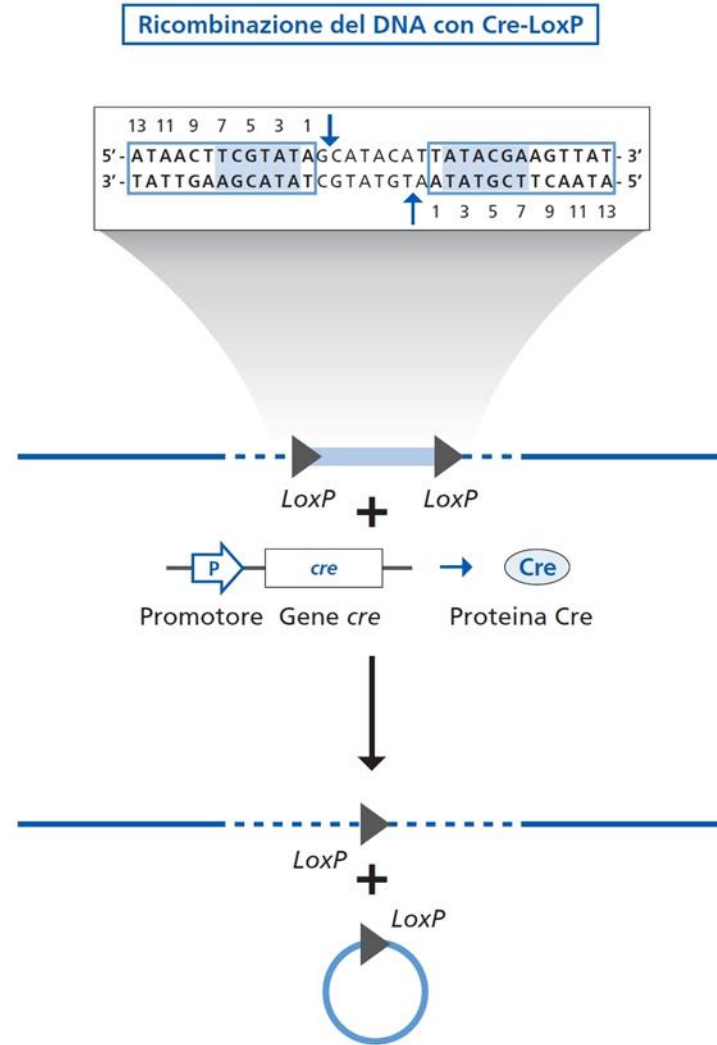


Figura 8.10 Ricombinazione mediata dal sistema Cre-Lox nella transgenesi animale ubiquitaria e condizionale.

Tabella 8.4 Animali transgenici per studi di funzione genica.

Modello animale	Studi di funzione genica
<i>Danio rerio</i> (pesce zebrato)	Studio di patologie dello sviluppo, del sistema cardiaco e linfatico e di processi altamente conservati
<i>Rattus norvegicus</i> (ratto)	Studi di fisiologia, farmacologia, comportamento, patologie cardiovascolari e neurologiche
<i>Mus musculus</i> (topo)	Studi di fisiologia, farmacologia, comportamento e patologie maggiormente utilizzati come modelli di patologie umane

Studio della funzione di geni e modelli di patologie

Tabella 8.5 Esempi di modelli murini di patologie umane.

Modello	Gene bersaglio	Modello di patologia
Topi <i>knock-in</i>	<i>hRas</i>	Cancro
	<i>c-myc</i>	Cancro
	<i>hSOD-1</i> mutato	Sclerosi laterale amiotrofica
	β -globina umano	Talassemia
	Recettore LDL umano	Aterosclerosi
	<i>hAPP</i> mutato	Morbo di Alzheimer
Topi <i>knock-out</i>	Apolipoproteina E	Aterosclerosi
	Glucocerebrosidasi	Malattia di Gaucher
	<i>CTFR</i>	Fibrosi cistica
	<i>TP53</i>	Cancro
	<i>RB1</i>	Cancro

Animali reporter (ad es. generati con Crispr/cas9)

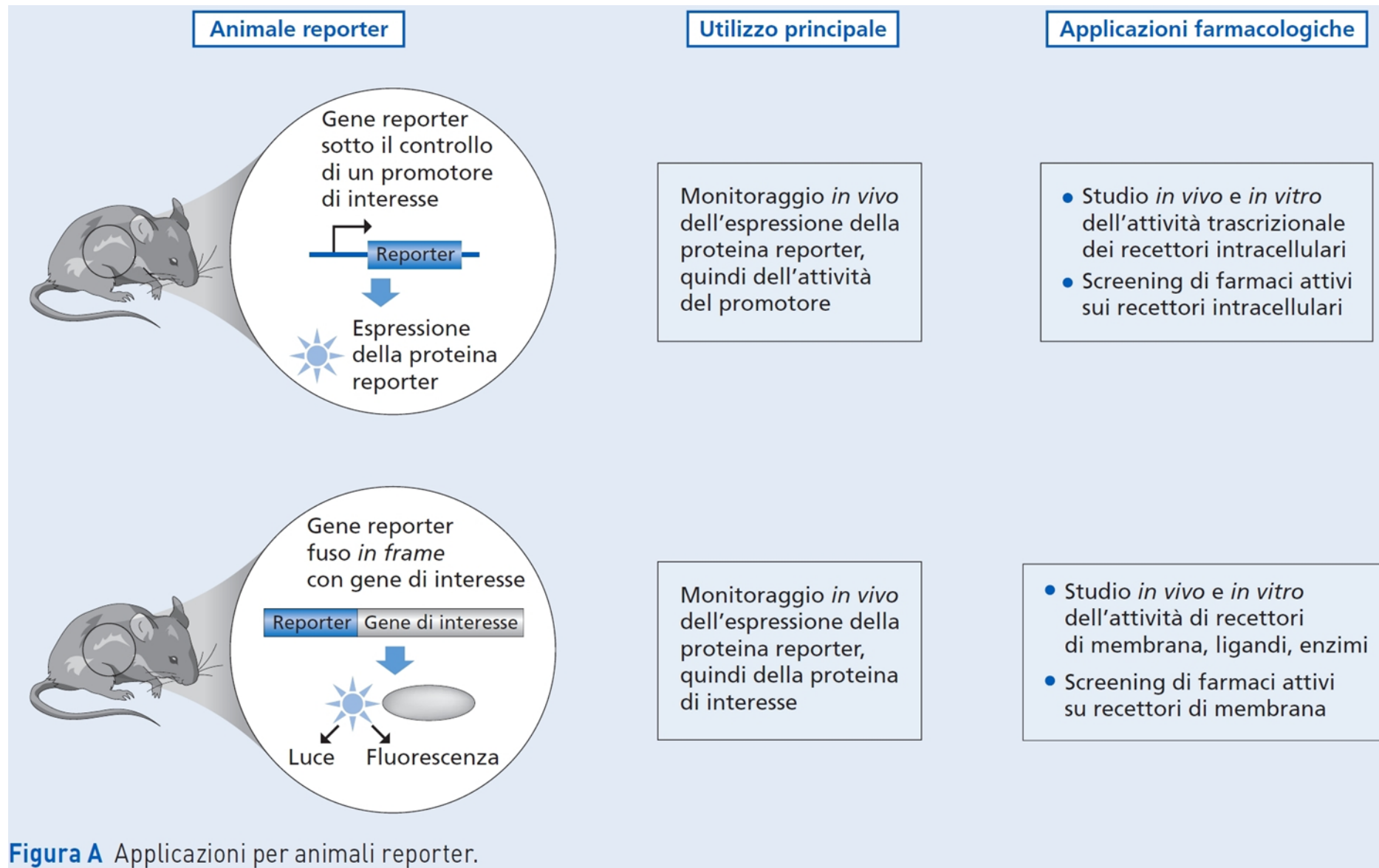


Figura A Applicazioni per animali reporter.

Animali transgenici per la produzione di proteine terapeutiche ottenuti con la transgenesi standard. (a) il vettore utilizzato contiene un promotore che permette l'espressione del transgene in cellule specifiche, come il promotore della β -lattoglobulina, che direzionano l'espressione nella ghiandola mammaria. (b) Transgenesi per la produzione e purificazione della lattoferrina da animali transgenici.

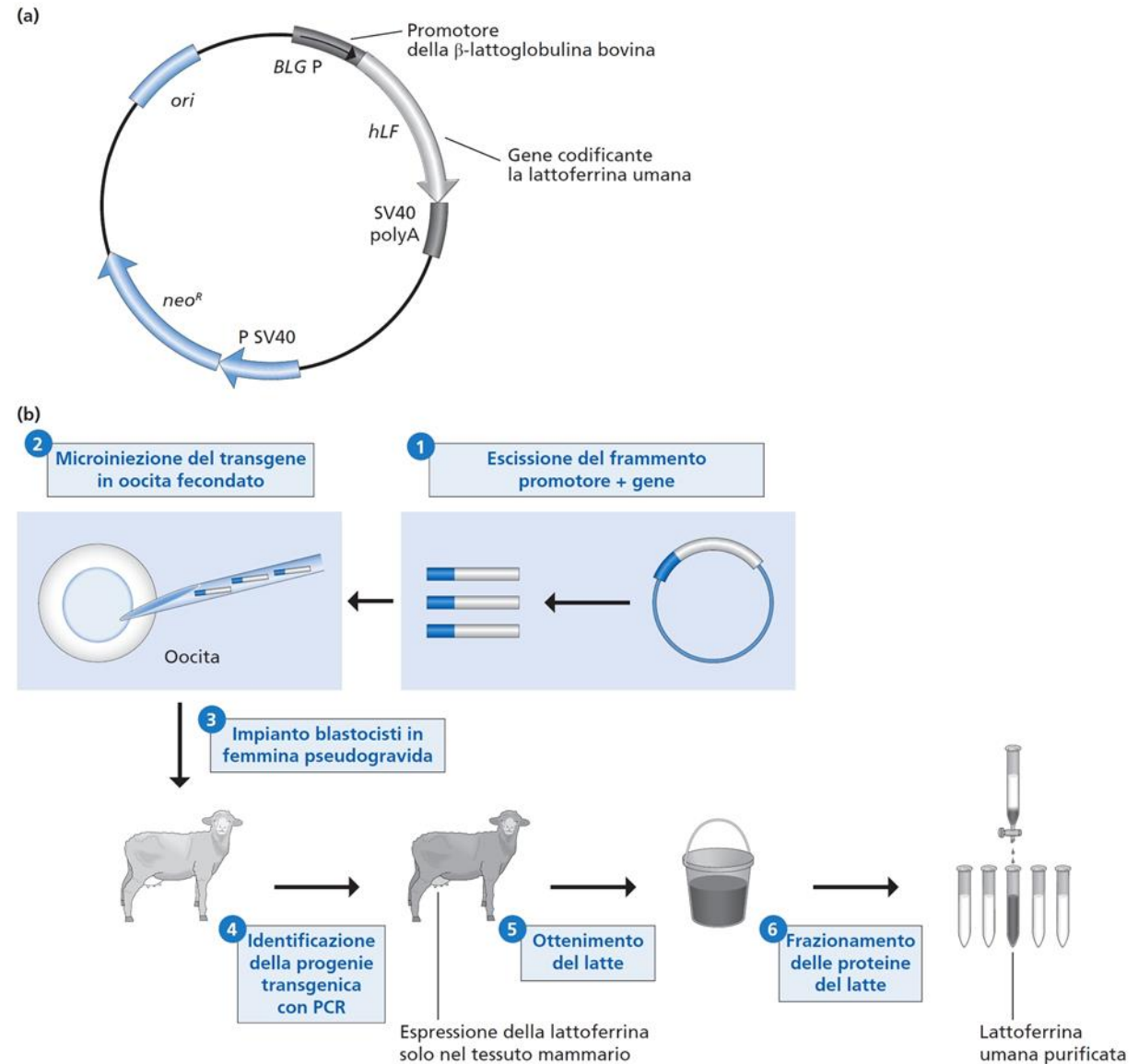


Figura 8.11 Animali transgenici per la produzione di proteine terapeutiche ottenuti con la transgenesi standard. (a) Il vettore utilizzato contiene un promotore che permette l'espressione del transgene in cellule specifiche, come il promotore della β -lattoglobulina, che direzionano l'espressione nella ghiandola mammaria. (b) Transgenesi per la produzione e purificazione della lattoferrina da animali transgenici.

Tabella 8.6 Transgeni e promotori di trascrizione utilizzati per la produzione di biofarmaci.

Transgene	Promotore	Specie transgenica
Attivatore tissutale del plasminogeno	Proteina acida del siero	Capra
Antitripsina $\alpha 1$	Lattoglobulina β	Pecora
Fattore di coagulazione IX	Lattoglobulina β	Pecora
Proteina solubile CD4	Proteina acida del siero	Topo
Lattoferrina	Caseina α_{s1}	Mucca
Urochinasi	Caseina α_{s2}	Topo
CFTR	Caseina β	Topo
Interleuchina 2	Caseina β	Coniglio

Tabella 8.7 Metodologie di transgenesi e specie animali utilizzate nei diversi ambiti di applicazione farmacologica degli animali transgenici.

Applicazioni	Metodo di transgenesi					Specie più utilizzate
	Transgenesi standard	Gene targeting	Clonaggio	Transgenesi condizionale	CRISPR/Cas9	
Studio di funzione genica	x	x		x	x	Topo
Studi farmacologici	x	x		x	x	Ratto Pesce zebrato
Modelli di patologia	x	x		x	x	Topi <i>knock-in</i> e <i>knock-out</i>
Produzione di biofarmaci*	x				x	Capra, pecora, coniglio, mucca
Modelli per xenotrapianto**		x			x	Maiale

* Si veda anche la Tabella 8.4.

** Si veda anche il Box 8.4.

Tabella 8.8 Sistemi biologici per la produzione di farmaci biotecnologici.

Organismo	Velocità di crescita	Costi di produzione	Resa	MPT	Ospite	Esempi di farmaci (impiego terapeutico)
Batteri	+++++	Bassi	+++++	+	<i>E. coli</i>	Insulina (diabete)
						Ormone della crescita (disordini della crescita)
						Denileuchina diftotox (linfoma a cellule T)
						Paratormone (osteoporosi)
						G-CSF (neutropenia)
Cellule eucariotiche	+++	Elevati	++ (~1 g/L)	++++	<i>S. cerevisiae</i>	Antigene superficie HBV (vaccino anti-epatite B)
						Adenosina deaminasi (immunodeficienze)
					Cellule Sf9*	Proteine del poliovirus (vaccino anti-poliomielite)
						mAB anti-EGFR (tumore metastatico del colon-retto)
					Cellule CHO	LH (infertilità)
						IFN β (sclerosi multipla)
	TPA (infarto acuto)					
	mAb anti-HER2 (tumore metastatico mammario)					
Piante	++	Medi	+++ (~1 mg/g foglie)	++	Tabacco**	Proteina C (inibizione della coagulazione)
						Eritropoietina (anemia)
					Riso**	IFN α (epatite B e C)
	α 1-antitripsina (fibrosi cistica, emorragia)					
Animali	+	Alti per transgenesi, bassi per mantenimento	+++ (~10 g/L latte)	++++	Capra	TPA (infarto acuto)
					Mucca	Lattoferrina (antibatterico)
					Coniglio	IL2 (immunoterapia dei tumori)
					Pecora	Fattore VIII (emofilia A)
						Fattore IX (emofilia B)

MPT: modificazioni post-traduzionali.

* Cellule derivate da tessuto ovarico del lepidottero *Spodoptera frugiperda* rese transgeniche tramite infezione con un baculovirus ricombinante.

** Specie transgeniche di *Nicotiana* e *Oryza* derivate dalla trasformazione delle cellule del callo con un plasmide ricombinante attraverso metodo diretto o tramite il batterio *Agrobacterium tumefaciens*.

Terapia genica

si intende l'inserzione di materiale genetico (DNA) all'interno delle cellule al fine di poter curare delle patologie → TRASFEZIONE

→ la TERAPIA GENICA mira a correggere le cause molecolari delle patologie mediante la sostituzione o l'aggiunta di un'informazione genetica "CORRETTA" nelle cellule del tessuto affetto.

considerazioni bioetiche

Inizio terapia genica anni '90 (1° trial clinico di trasferimento genico in cellule somatiche umane '89/'90 in USA, nel '92 in Italia)

APPROCCIO

1[^] → è necessario in primo luogo identificare il singolo gene o i diversi geni responsabili della malattia genetica.

2[^] → si può tentare in secondo luogo - almeno per alcune malattie - la sostituzione dei geni malati sfruttando un virus reso inattivo (svuotato preventivamente del suo corredo genetico) **CHE FUNGE DA VETTORE** .



Si può poi 'correggere' il DNA, rimpiazzando le sequenze difettose tramite l'uso di enzimi di restrizione che sono come "forbici" molecolari enzimatiche, (con cui si preleva il gene "sano") in modo tale che la cellula sintetizzi correttamente le proteine necessarie al corretto funzionamento metabolico.

ALTRO POSSIBILE APPROCCIO: in cui non si va a sostituire un gene difettoso ma se ne **aggiunge uno che possa mettere in moto un fenomeno terapeuticamente utile.**

→ TRASFEZIONE delle cellule somatiche di un individuo avente una malattia genetica con un segmento di DNA contenente l'allele sano.

Esistono due tipologie di terapia genica:

→ delle **cellule germinali** = il materiale genetico viene trasferito all'interno delle cellule germinali (spermatozoi ed ovociti) **o delle cellule staminali totipotenti** (dei primissimi stadi dello sviluppo dell'embrione). In questo caso la modifica si trasmette anche alla prole; attualmente tale possibilità presenta molti limiti pratici ed etici.

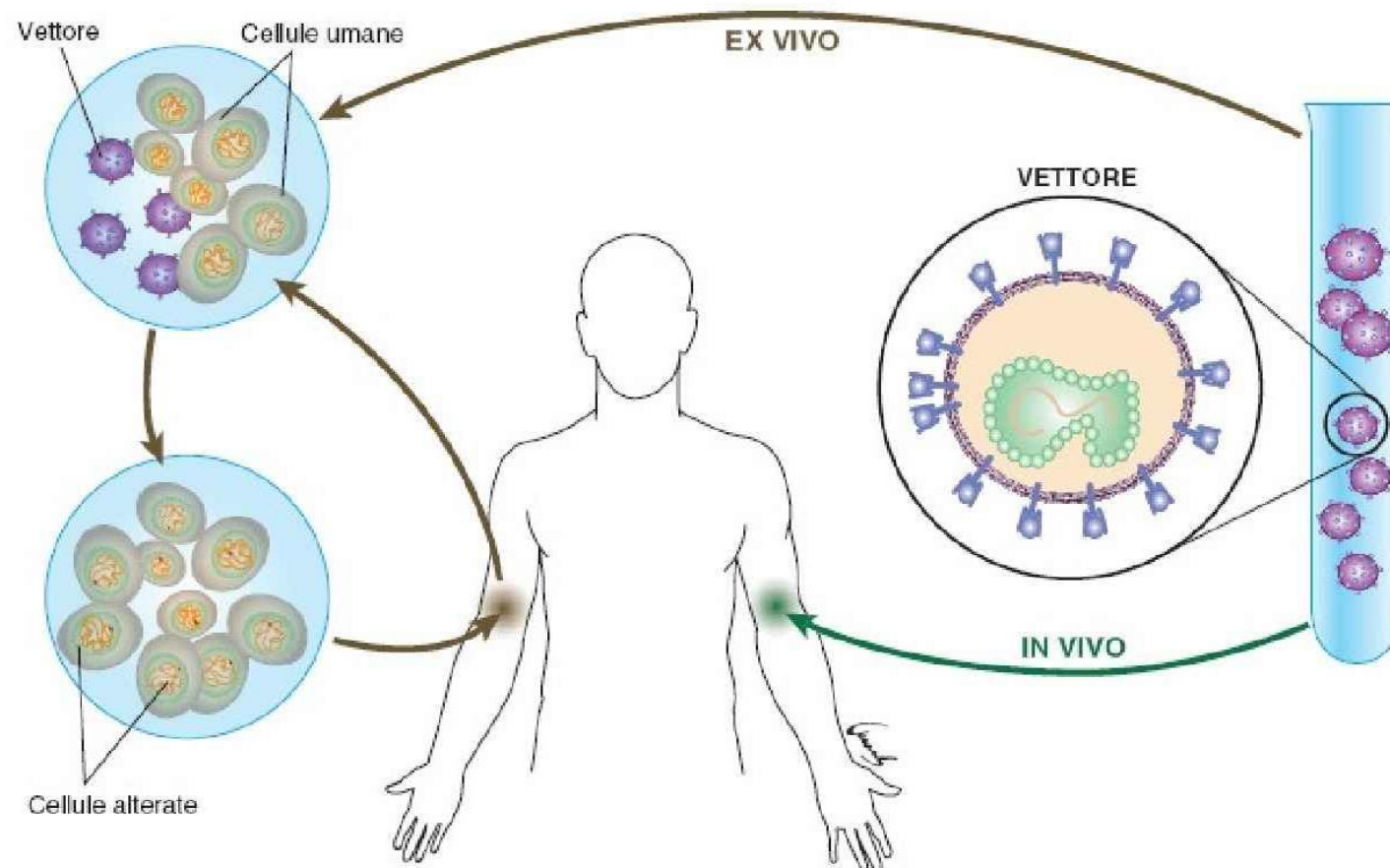
→ delle **cellule somatiche** = modifica il genoma dell'individuo ricevente e gli effetti della modifica sono limitati all'individuo e non si riscontrano nella prole. Oggi è la via più studiata e tentata.

La terapia genica delle cellule somatiche, a sua volta, viene suddivisa in due gruppi: la terapia genica "ex vivo" e quella "in vivo"

"ex vivo" = prelevare **le cellule somatiche della persona interessata e metterle in coltura**. Le cellule vengono "trasfettate" con il gene d'interesse, inserito tramite un apposito vettore (spesso vengono usati vettori virali) e successivamente reinfuse o reinpiantate nel corpo del soggetto. Si tratta di una procedura lunga e costosa ma permette di selezionare ed amplificare le cellule d'interesse. Attualmente è la modalità più utilizzata.

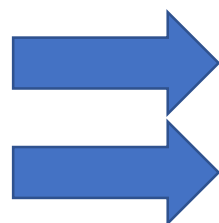
"in vivo" = viene attuata **in tutti quei casi in cui le cellule non possono essere messe in coltura o prelevate e reimpiantate**, come ad esempio quelle del cervello o del cuore e della maggior parte degli organi interni. In questo caso il gene viene inserito nell'organismo tramite un apposito vettore, direttamente per via locale o sistemica.

Questa metodica ha un'elevata compliance ed è molto economica, ma di più difficile applicazione



◆ **FIGURA 21.8**

Schema di un intervento di terapia genica *ex vivo*, nella quale le cellule del paziente vengono prelevate, trasdotte tramite un vettore virale in laboratorio e ritrapiantate (freccie marroni), ed *in vivo*, nella quale il vettore virale viene somministrato direttamente all'interno del paziente (freccia verde).



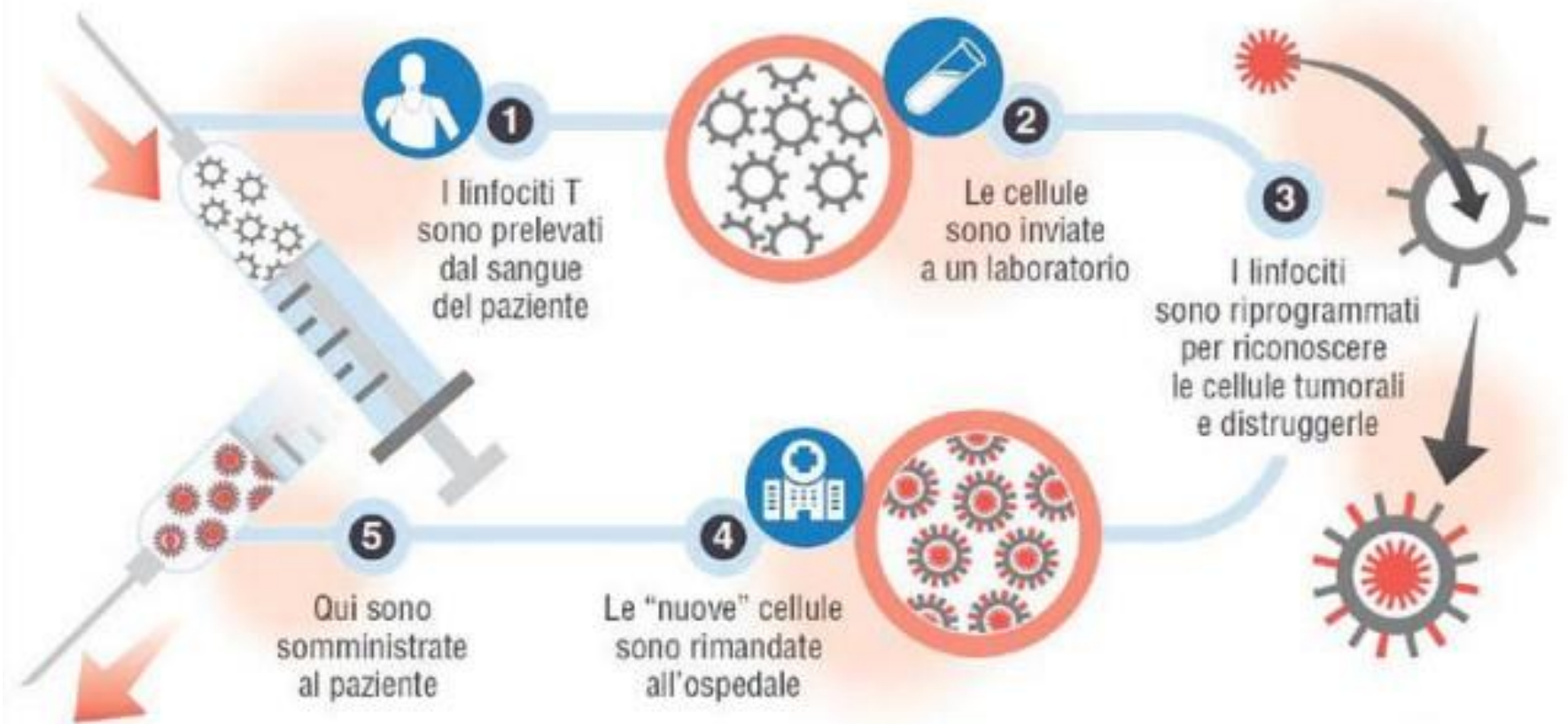
patologie congenite

patologie acquisite (cancro, malattie infettive)

Infine, popolazioni di cellule umane estratte da un paziente, coltivate in laboratorio, modificate geneticamente o riprogrammate in modo opportuno costituiscono esse stesse il principio attivo di terapie cellulo-mediate o rigenerative

Come funziona la terapia genica

L'Fda ha approvato un nuovo trattamento contro una forma di linfoma



La tecnologia CAR-T



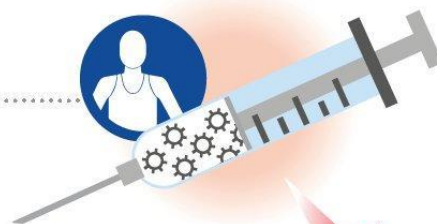
CHE COS'È

Terapia genica o immunoterapia sperimentata su bambini e adolescenti affetti da Leucemia linfoblastica acuta

COME SI PROCEDE

Fase 1

Prelievo Linfociti T del paziente



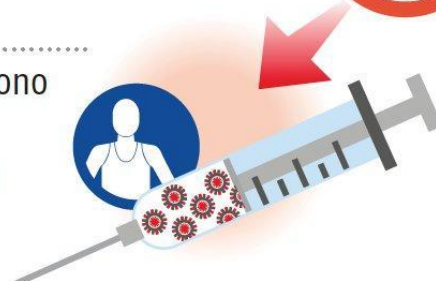
Fase 2

Manipolazione genetica dei Linfociti T attraverso il CAR (Recettore Chimerico Sintetizzato in laboratorio)



Fase 3

I Linfociti T manipolati vengono reinfusi nel paziente. Sono più forti. Riconoscono e attaccano il tumore



L'ASPETTATIVA DI VITA DOPO LA CURA

 **3/4 bambini** guariscono completamente

 **5 anni** dopo la diagnosi sono ancora in vita:

● bambini



● adolescenti



Ogni anno nel mondo si ammalano 250mila bambini



400 nuovi casi solo in Italia

PREVISIONE NEOPLASIE 2016 - 2020

7.000 bambini

4.000 adolescenti

CAR-T:

Chimeric Antigen Receptor T - Recettore antigenico chimerico T

Il linfocita T transgenico viene ingegnerizzato per esprimere un recettore chimerico per un antigene tumorale collegato al CD3 del linfo T.

Quindi legandosi all'antigene tumorale scatena la risposta immunitaria del linfocita T in maniera diretta sulle cellule tumorali

**Due modi per agire sui geni e i loro prodotti:
modificare il DNA o eliminare l'mRNA**

1

Tramite la terapia genica
o DNA editing (o *genome editing*)

2

Tramite l'impiego di aODN
(antisense oligodeoxynucleotides)
e di *Small Interfering RNA* (siRNA)

1 Lo studio delle basi genetiche associate ad una malattia attraverso l'impiego delle moderne strategie di sequenziamento, ha permesso di associare diverse mutazioni a specifiche condizioni patologiche.

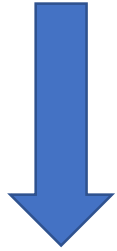
Da queste osservazioni sono nate nuove strategie volte a :

- Inserire una sequenza di DNA codificante per una proteina non funzionante o mancante → **terapie genica**
- Sostituire il DNA mutato con una sequenza genica corretta → **DNA editing**



I primi approcci volti a modificare il DNA hanno sfruttato:

→ il meccanismo di ricombinazione del DNA, che presentava alcune difficoltà come la frequenza con cui poi veniva espresso il prodotto. Nonostante l'utilizzo di enzimi di restrizione ancora era difficile tagliare con precisione il DNA



Problematiche superate con la CRISPR-Cas9

Questo approccio permette di:

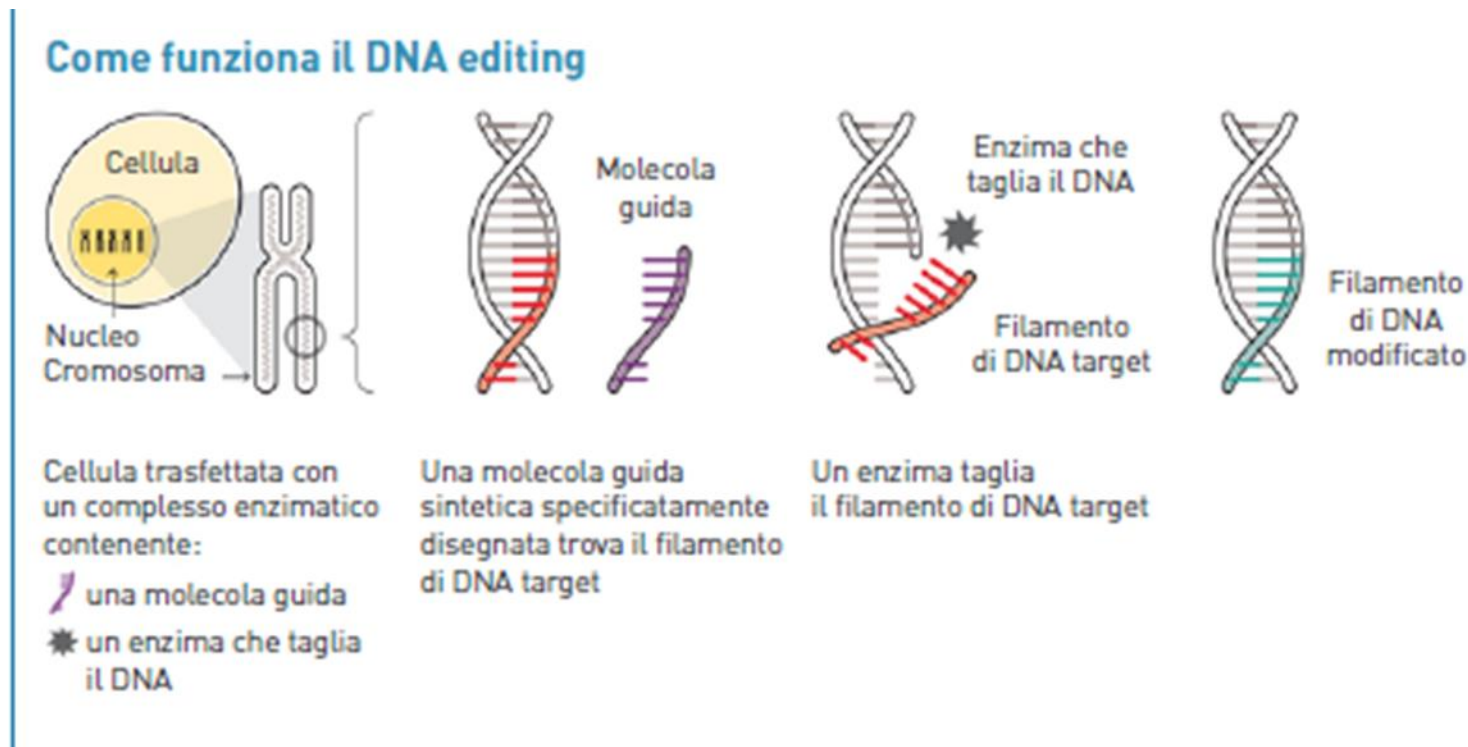
- 1) eliminare una sequenza di DNA
- 2) introdurre o correggere una mutazione
- 3) inserire una sequenza di DNA
- 4) attivare o reprimere l'espressione di un gene.

Questo approccio presenta ad oggi alcune limitazioni ed è legato anche ad aspetti etici e alla necessità di un'attenta valutazione del bilancio rischio/beneficio.

Il complesso CRISPR-Cas9 è un complesso formato da :

Una proteina Cas9 ad attività enzimatica e una sequenza di RNA

Trae origine da un meccanismo di immunità adattativa che i batteri hanno conservato per riconoscere e proteggersi da DNA esogeno.

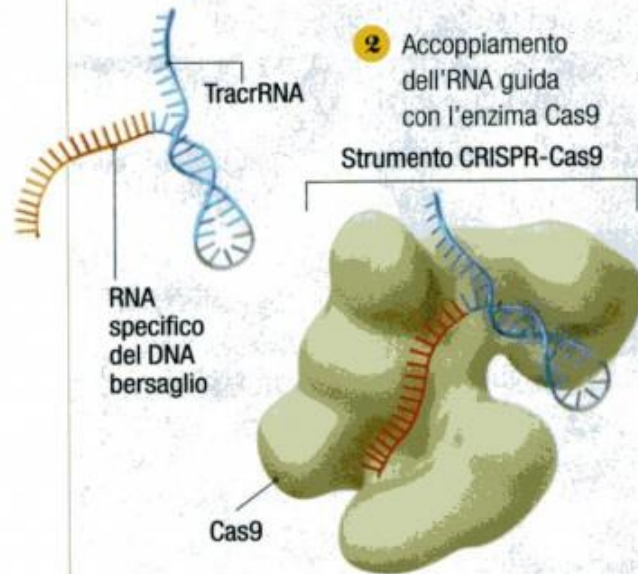


Come funziona lo strumento CRISPR-Cas9

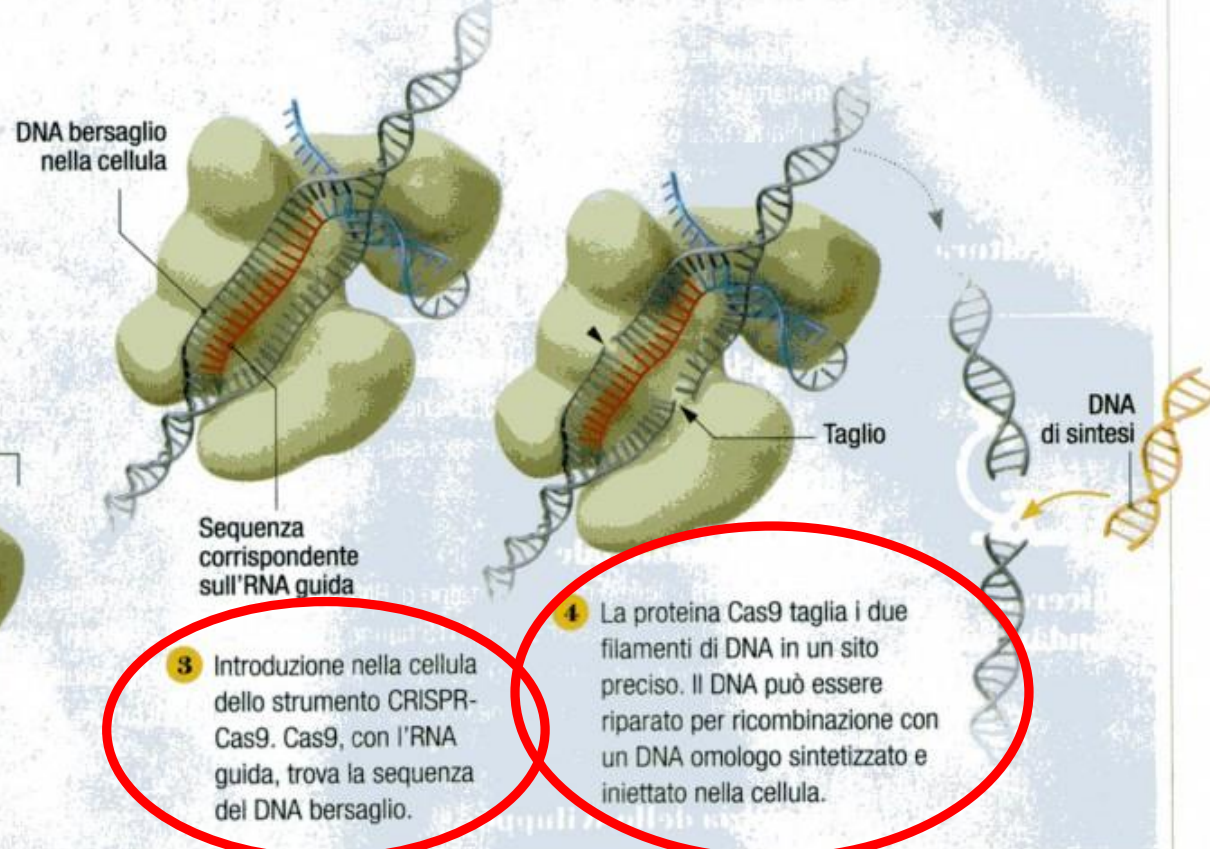
I batteri hanno sviluppato un'arma precisa ed efficace, CRISPR-Cas9, contro le invasioni virali. I biologi l'hanno sfruttata per farne forbici molecolari che tagliano, nelle cellule, il DNA in un sito bersaglio. Contrariamente ai metodi precedenti per modificare il genoma, i quali richiedono enzimi spe-

cifici in ciascuna situazione, lo strumento CRISPR-Cas9 utilizza la stessa proteina, l'enzima Cas9, per ogni situazione. Il solo elemento specifico da costruire è un RNA, che guida l'enzima Cas9 nel punto del genoma da tagliare. E gli RNA sono molto più semplici da sintetizzare degli enzimi.

- 1 Costruzione di un RNA guida per fusione delle sequenze di un RNA batterico (tracrRNA) e di un RNA specifico (complementare) della sequenza del DNA bersaglio.



- 2 Accoppiamento dell'RNA guida con l'enzima Cas9



- 3 Introduzione nella cellula dello strumento CRISPR-Cas9. Cas9, con l'RNA guida, trova la sequenza del DNA bersaglio.

- 4 La proteina Cas9 taglia i due filamenti di DNA in un sito preciso. Il DNA può essere riparato per ricombinazione con un DNA omologo sintetizzato e iniettato nella cellula.

2 Agendo sull'RNA andiamo ad agire su un prodotto, senza quindi modificare il codice genetico.

La tecnica di interferenza dell'RNA deriva dal concetto generale che:

Un RNA in presenza di una catena complementare di RNA forma un doppio filamento molto stabile che non può essere tradotto

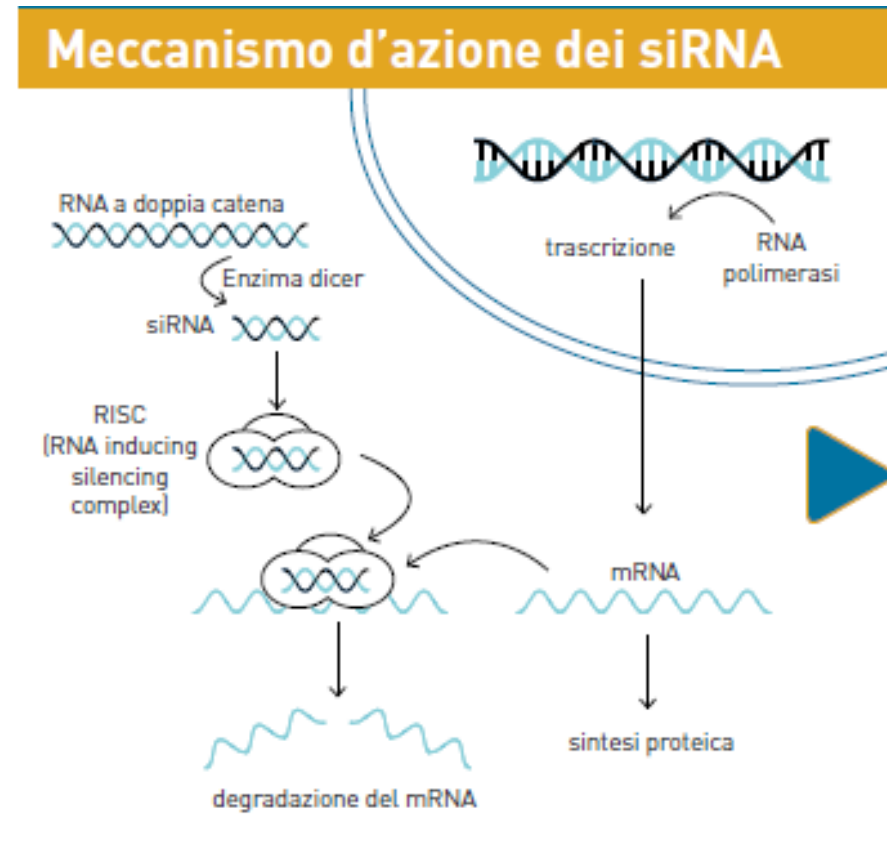
= sintesi proteica abolita

**Andrew Fire and Craig Mello
(2006 premio Nobel)**

Scoprirono che quando una cellula è esposta ad un **RNA a doppio filamento** si può avere un silenziamento genico specifico perché:

1^- si **attivano delle RNA endonucleasi che lo tagliano in piccoli frammenti** perché lo riconoscono come estraneo (**siRNA**)

2^- i **siRNA** si associano al complesso **RISC** che li guida verso l'RNA complementare → a cui si legano favorendone la degradazione



SILENZIAMENTO POST-TRASCRIZIONALE

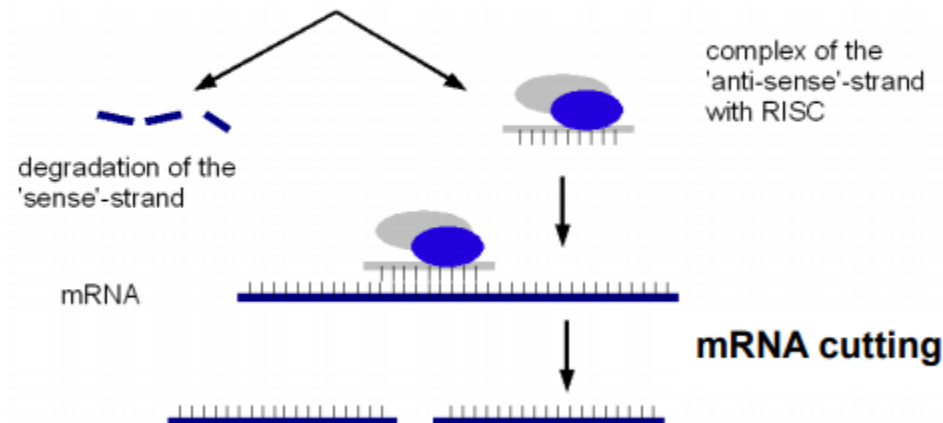
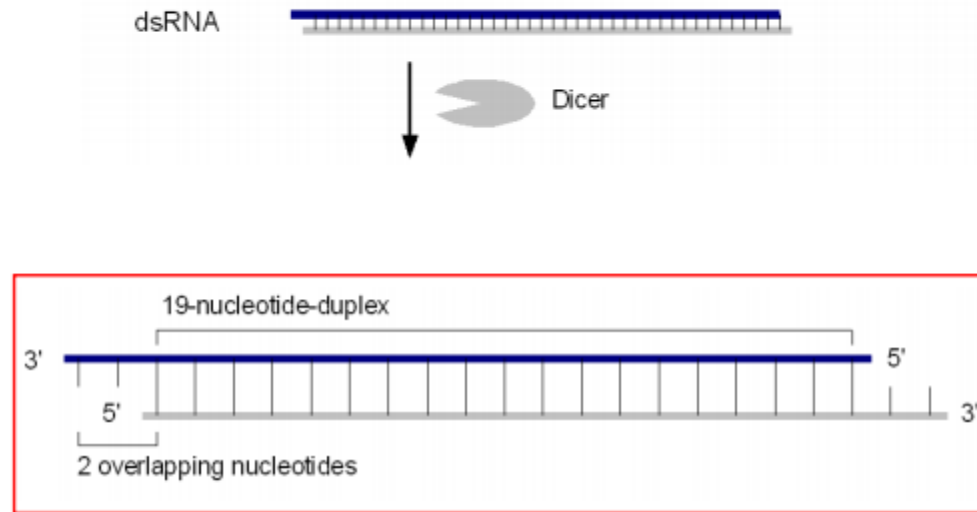
Interferenza a RNA: meccanismo biochimico dell'iRNA

1. **DICER** digerisce il dsRNA frammenti da ~21bp (short interfering RNAs → siRNAs)

DICER:

- RNase III ribonuclease family
- Specifico per dsRNA
- Altamente conservato in insetti, piante, vermi, umani

2. **Produzione di siRNA 21-22 dsRNA, con 5'-P, 2nt sporgenti**



3. **Gli siRNA subiscono separazione delle eliche e vengono integrati nel RISC** (RNA Induced Silencing Complex)

RISC:

- **SLICER** viene co-purificata con
- **ARGONAUTE** e **EIFC2** (elongation factor)
- **l'elicasi**

4. **Riconoscimento e taglio endonucleasico del mRNA target:** il siRNA si lega all'mRNA complementare (target) e l'attività nucleasica (**Slicer**) di RISC degrada l'mRNA.

5. Le ribonucleasi cellulari completano la degradazione dell'mRNA target.

siRNA vs. oligonucleotidi antisenso (a ssDNA)

Similarità

- Lunghezza
- Metodologia di *delivery* comune
- Induzione di silenziamento genico a livello post-trascrizionale
- Digestione di mRNA bersaglio da parte di endonucleasi
- Possibilità di stabilizzare con basi modificate
- Bio-distribuzione simile

Differenze

- Doppio filamento vs. singolo filamento
- Maggiore stabilità del siRNA
- Maggiore efficacia delle molecole in cellule in coltura
- Meccanismo d'azione mediato da RISC

