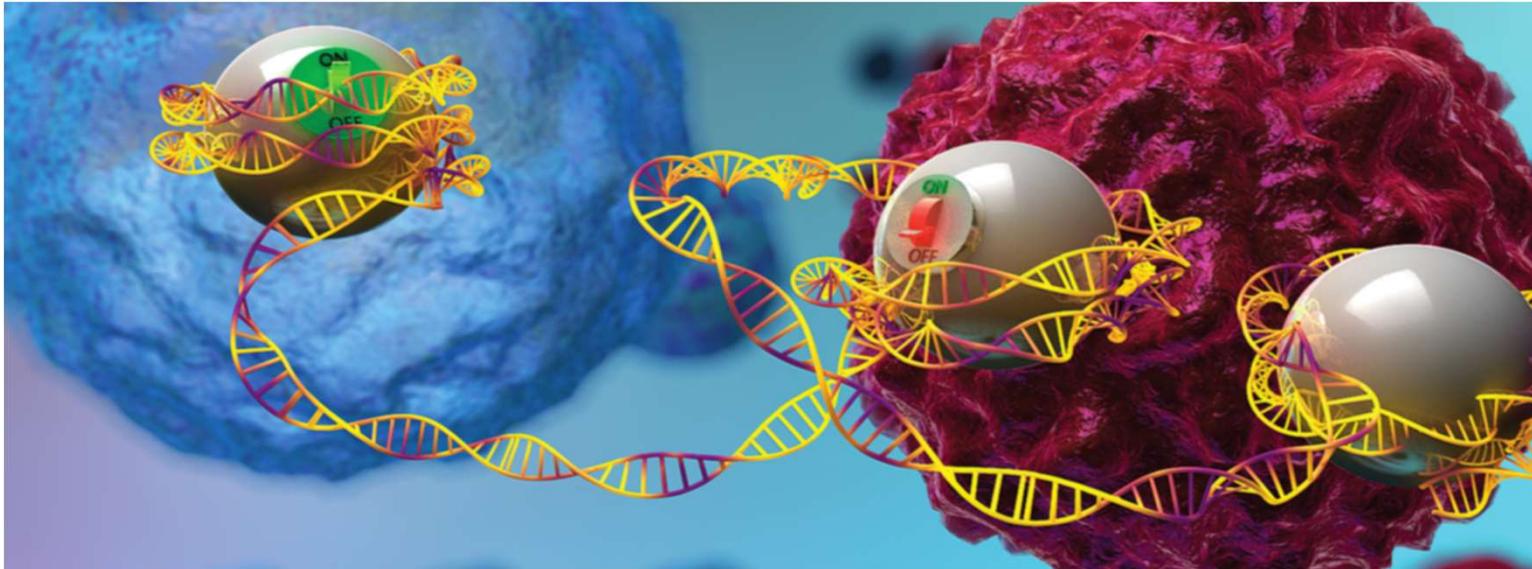




**U.T.E.F.**  
UNIVERSITÀ PER L'EDUCAZIONE PERMANENTE  
Riconosciuta dall'Università degli Studi di Ferrara

# TERAPIA EPIGENETICA: una strada percorribile e le sue applicazioni



Dott.ssa Lucia Carmela Cosenza  
csnlcr@unife.it

a.a.2022-2023

## CONCETTI CHIAVE

**GENOMA:** rappresenta l'insieme del patrimonio genetico ed è specifico per ogni organismo vivente. La sua funzione più importante è quella di contenere le informazioni necessarie per far funzionare l'organismo.

**Genoma:** biblioteca

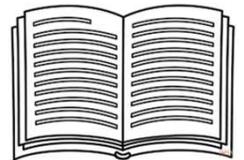


**Cromosomi:** sezione della biblioteca in cui sono organizzati i libri

**Geni:** libri



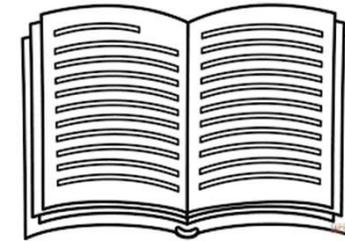
**DNA:** le lettere all'interno del libro



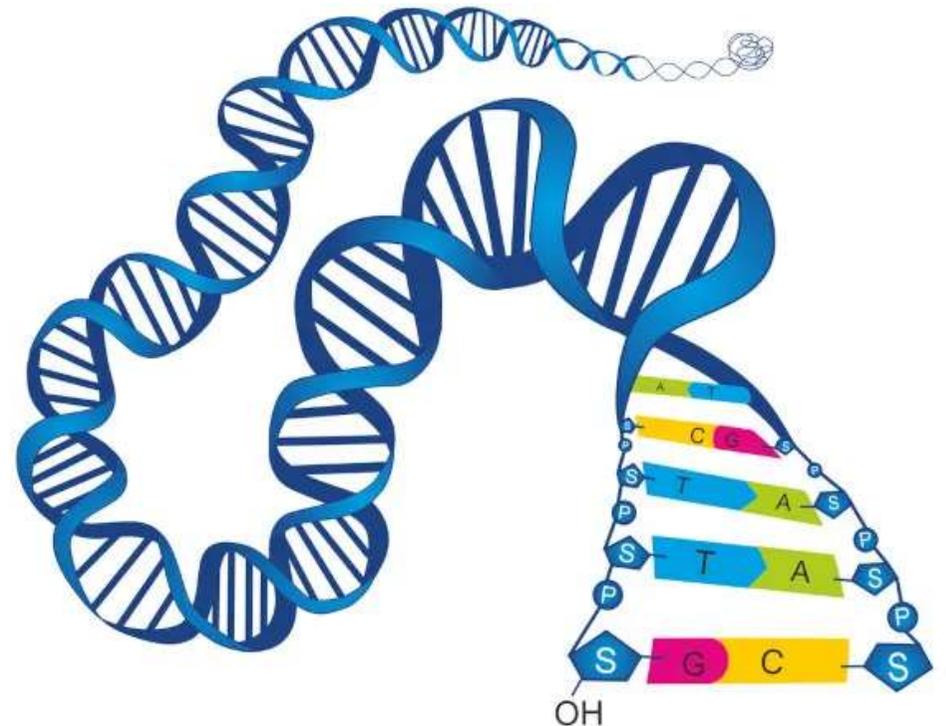
## Genoma



**DNA:** le lettere all'interno del libro



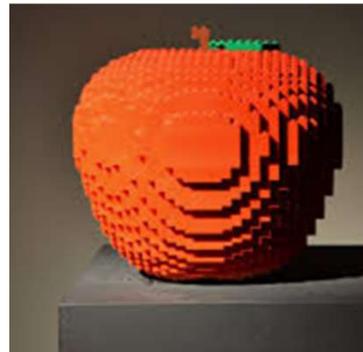
Il **DNA** ha una struttura a forma di elica, in cui i due filamenti sono uniti l'uno all'altro dalle cosiddette basi azotate o nucleotidi, i cui nomi sono adenina (**A**), citosina (**C**), guanina (**G**) e timina (**T**). Queste 4 basi costituiscono la sequenza nucleotidica, ossia l'alfabeto con cui è scritto il libro del DNA





La lettura di ogni libro produce una **proteina**

Le proteine sono anche definite come i “mattoni del corpo” perché hanno una funzione strutturale, in quanto si trovano nella struttura delle ossa, dei capelli e delle unghie, e sono direttamente coinvolte in tutte le attività che si svolgono all'interno di una cellula.

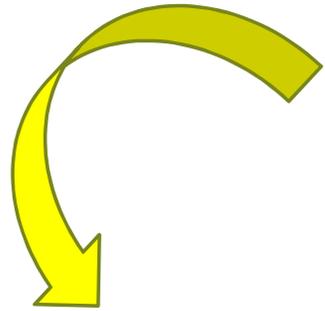


La composizione ed il funzionamento di ciascun mattoncino è definita **espressione genica**

L'insieme dei *postit* (*segnature*) presenti nel libro che ci indicano quali parti del libro devono essere lette o saltate, è definito **EPIGENOMA** dal greco «scritto sopra»

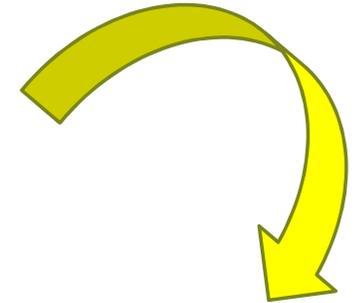


**Fenotipo:** l'insieme delle caratteristiche morfologiche e funzionali di un organismo determinate dall'interazione fra la costituzione genetica e l'ambiente.



Ricerca  
genetica

Tecnologie  
innovative



Negli ultimi 50 anni l'essere umano ha profondamente modificando le conoscenze e la visione di se stesso e dell'ambiente in cui viviamo.

---

***EPIGENETICA*** : studia i cambiamenti che influenzano il fenotipo senza alterare il genotipo e descrive tutte quelle modificazioni ereditabili che variano l'espressione genica pur non alterando la sequenza del DNA.

❑ Sequenza nucleotidica corretta

ATTGGCTCA  
TAACCGAGT



PROTEINA

❑ Mutazione genetica es.

ATTG**T**CTCA  
TAAC**A**GAGT  
ATTG - CTCA  
TAAC - GAGT

NO PROTEINA

❑ Segnale epigenetico

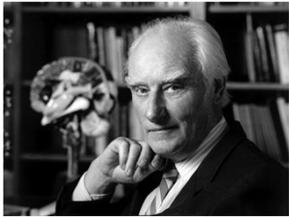
Non leggere  
ATTGGCTCA  
TAACCGAGT



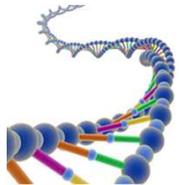
NO PROTEINA

## Cenni storici:

Modello: l'evoluzione è il risultato della comparsa di mutazioni casuali del DNA e della pressione selettiva dell'ambiente



Francis  
Crick



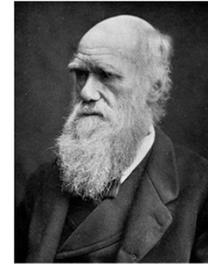
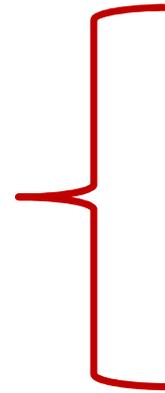
Genoma



Influenze ambientali  
ed eventi  
casuali durante lo sviluppo



***Fenotipo***



Charles  
Darwin



Gregor Mendel

**Moderno Dogma Centrale della Biologia**

Fine degli anni '90 il sequenziamento dell'intero genoma progredisce molto rapidamente, ma numerosi *gap* nella comprensione del legame **GENE-MALATTIA**.



Lamarck

*Come spiegarlo??*

Gli organismi viventi sono il risultato di un processo graduale di modificazione che avviene sotto la pressione delle condizioni ambientali. Tali adattamenti sono in grado di *interferire con il DNA determinando trasformazioni fenotipiche* spesso trasmissibili da una generazione all'altra, che *possono favorire o ostacolare l'adattamento* degli esseri viventi *ed anche generare malattie*.

## Ma cos'è l'**epigenetica**?

Epi in greco επι = sopra, **signature sovrascritte al genoma**

*«Lo studio delle modifiche genetiche stabili che danno luogo a cambiamenti nella funzione e nell'espressione genica senza un'alterazione nella sequenza del DNA corrispondente»* Aguilera et al. 2010

I segnali epigenetici (signature) determinano cambiamenti nell'espressione genica **senza modificazioni della sequenza nucleotidica del genoma.**

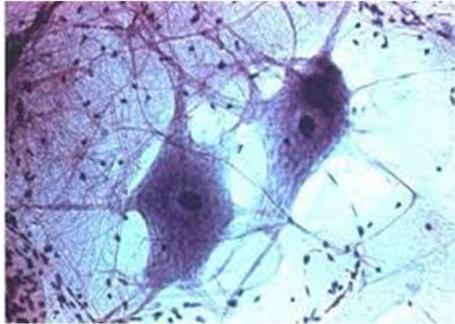
**1 genoma**



**N epigenomi**



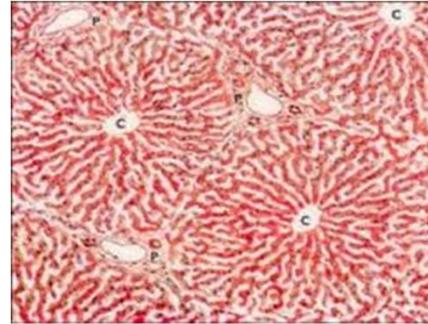
**N fenotipi**



Neuron



Cell.



Epatocit



Osteocit

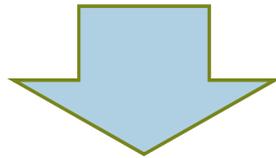
L'epigenoma decide che gene deve essere **"ON"** oppure **"OFF"** in una singola cellula, determinando un segnale di espressione genica.

La modulazione dei profili epigenetici contribuisce in modo cruciale:

- allo sviluppo embrionale, al passaggio da cellula staminale a cellula programmata
- al differenziamento cellulare
- costituisce la capacità di integrare i segnali provenienti dall'ambiente come i nutrienti, i cicli biologici e atmosferici, lo stress e gli stimoli ormonali.

**Con quali meccanismi l'epigenoma modula  
l'espressione genica??**

**Con meccanismi epigenetici**



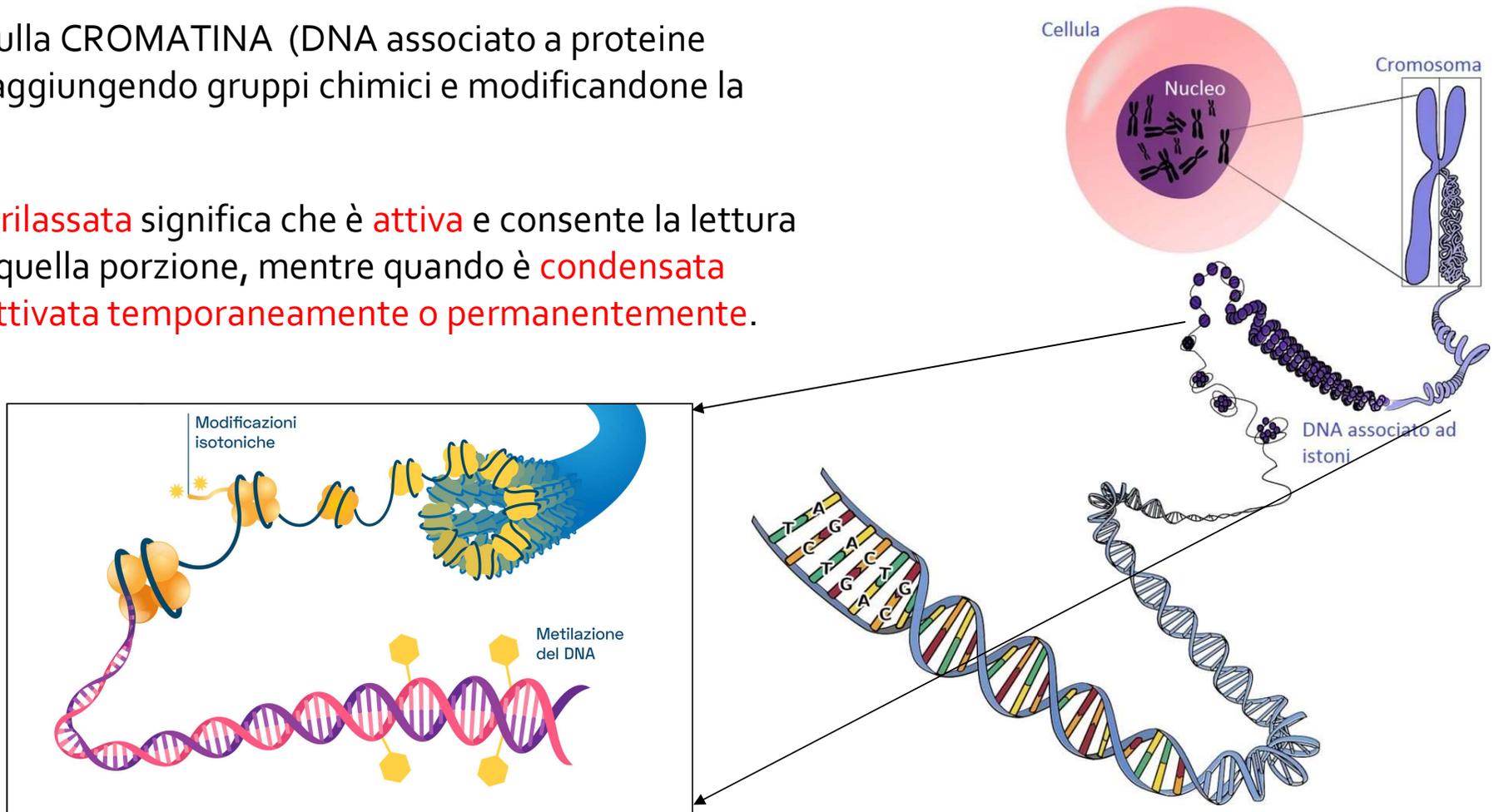
Si tratta di **processi dinamici** in grado di attivarsi in risposta a **segnali estrinseci sia di natura ambientale** (esposizione a xenobiotici) **che sociale** (es. abitudini alimentari, stili di vita), nonché a **quelli intrinseci dell'organismo**.

**Epigenetica come *software*: raccoglie diversi stimoli,  
li elabora e modula espressione genica**

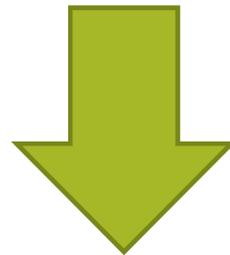
# Meccanismi epigenetici

Agiscono sulla CROMATINA (DNA associato a proteine istoniche) aggiungendo gruppi chimici e modificandone la struttura.

**Cromatina rilassata** significa che è **attiva** e consente la lettura dei geni in quella porzione, mentre quando è **condensata** risulta **disattivata temporaneamente o permanentemente**.

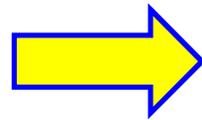


## Rimodellamento della cromatina



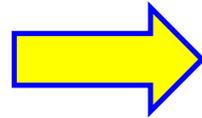
**Altera l'accessibilità fisica** alle regioni del genoma sulle quali si legano proteine e enzimi deputati all'espressione genica e quindi **alterano l'espressione del gene.**

# Modifiche epigenetiche

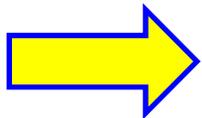


- **SUI NUCLEOSOMI o DNA:** sono segnali chimici posti sul DNA e/o su istoni

## Principali caratteristiche



- **SEGNALI DI LETTURA:** indicano alla cellula le parti di DNA da leggere o da saltare



- **REVERSIBILI:** possono essere inserite o rimosse in risposta agli stimoli ambientali

## Ricapitolando.....

- L'epigenetica regola l'espressione genica non alterando il DNA (sequenza) in modo reversibile
- Esistono molteplici tipi di regolazione come:
  - La metilazione del DNA
  - Le modificazioni istoniche
- -Meccanismi di alterazione epigenetica sono alla base di molteplici patologie fra cui le neoplasie
- *Si può riprogrammare l'epigenoma cellulare con modulatori epigenetici*

**Epigenome Editing**

**TERAPIA EPIGENETICA**

# *Genome Editing*



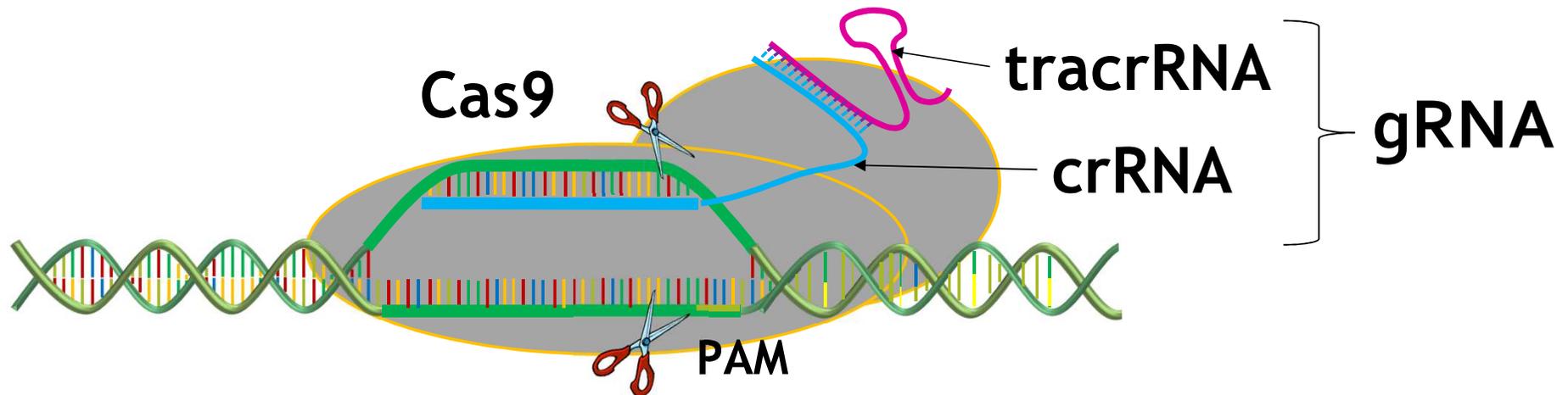
Il sistema **CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), identificato per la prima volta all'interno nei batteri, si basa sull'impiego della **proteina Cas9**, una sorta di forbice molecolare in grado di tagliare un DNA bersaglio per effettuare specifiche modifiche al genoma di una cellula.

## Genome editing CRISPR / Cas9 system

Il taglio da parte della Cas9 consente di eliminare sequenze di DNA «danneggiate» andando a correggere o sostituire delle sequenze che causano malattia.

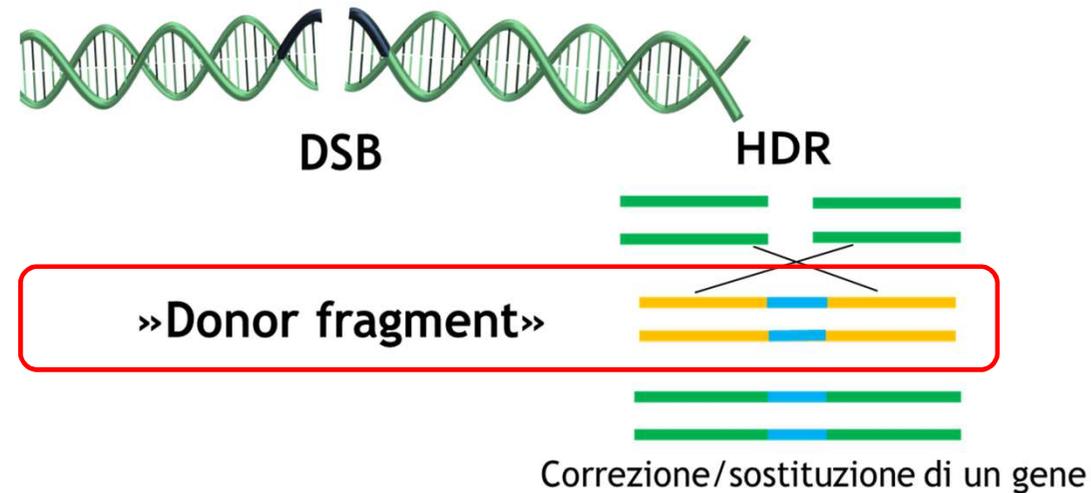
Il meccanismo d'azione prevede l'attività sinergica di diversi componenti: **Cas9**, un target-specific CRISPR RNA (**crRNA**) e un trans-attivatore del crRNA (**tracrRNA**), RNA che possono essere combinati in un'unica guide-RNA (**gRNA**) essenziale per il riconoscimento della sequenza genomica da modificare.

Per ottimizzare il funzionamento del sistema CRISPR, la sequenza genomica da modificare deve presentare al 5' una corta sequenza **PAM** (Protospacer Adjacent Motifs) **NGG**, al fine di garantire e ottimizzare il taglio da parte della Cas9.



❑ **Meccanismi di riparazione del taglio sulle due eliche del DNA generato dalla Cas9:**

- **HDR** ( Homology Directed Repair)



### HDR

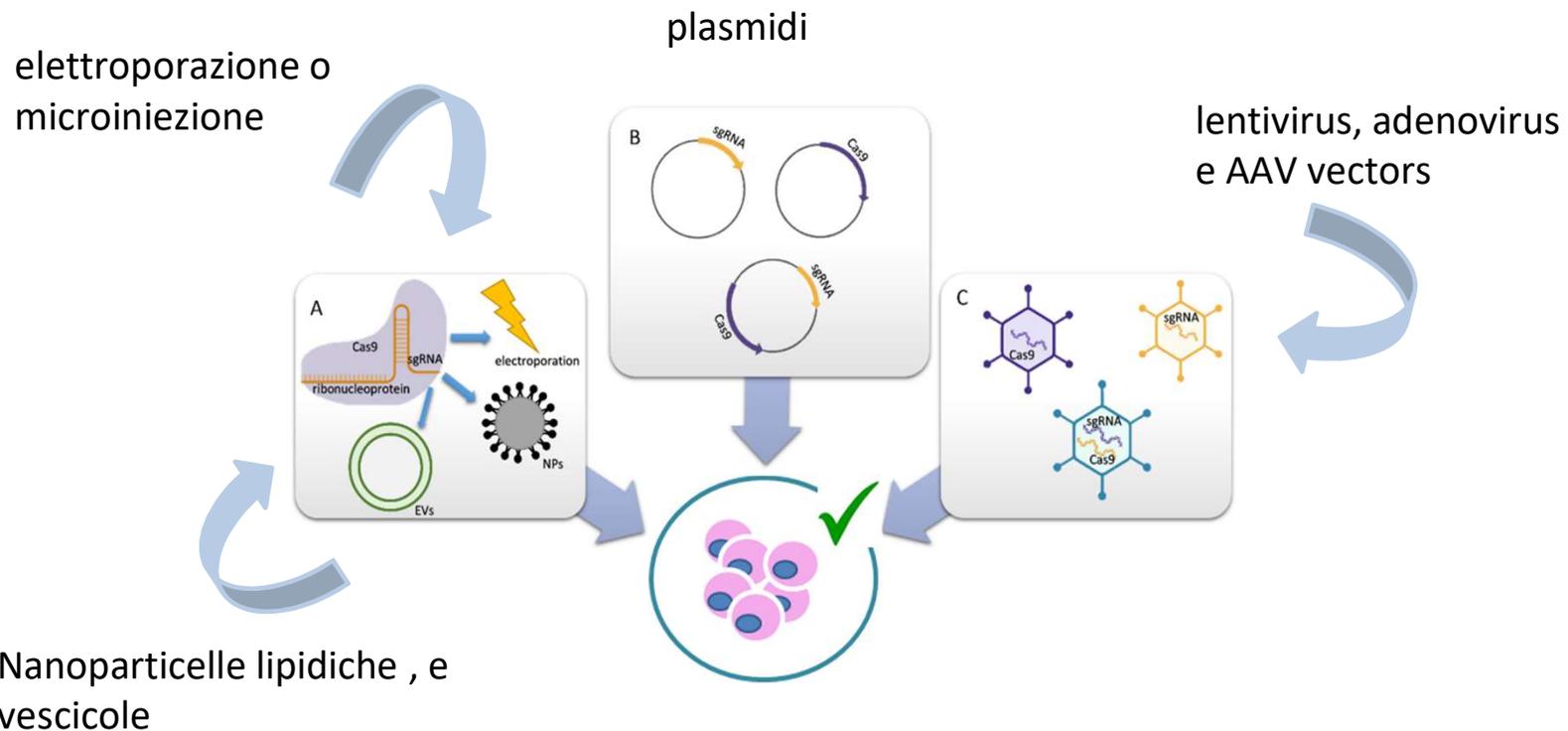
Permette di inserire una sequenza nucleotidica

Preciso

Necessita di un «donor fragment»

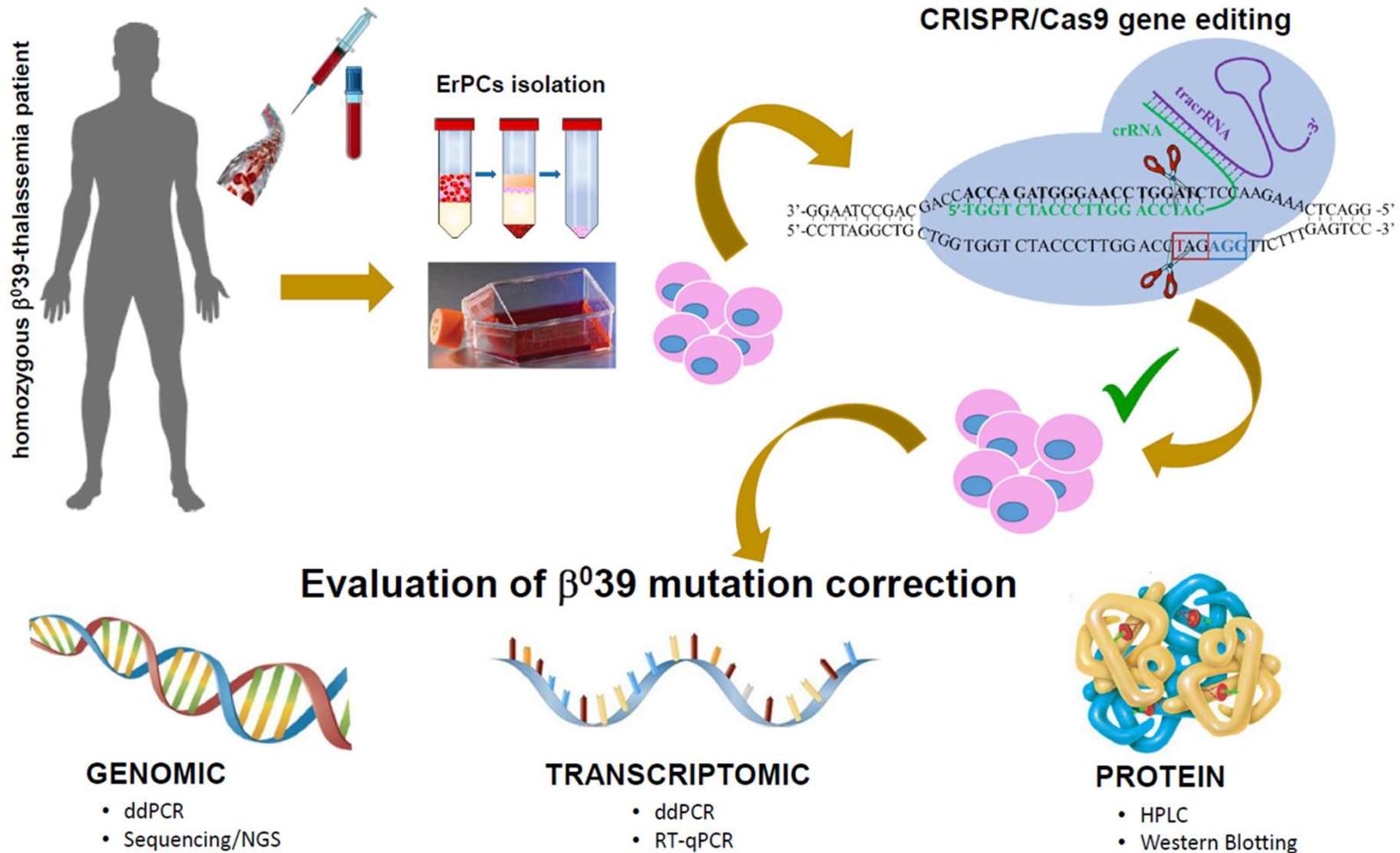
Possibile nelle fasi G2 e S del ciclo cellulare

# Genome editing CRISPR / Cas9 : assemblaggio e strategie di *delivery*

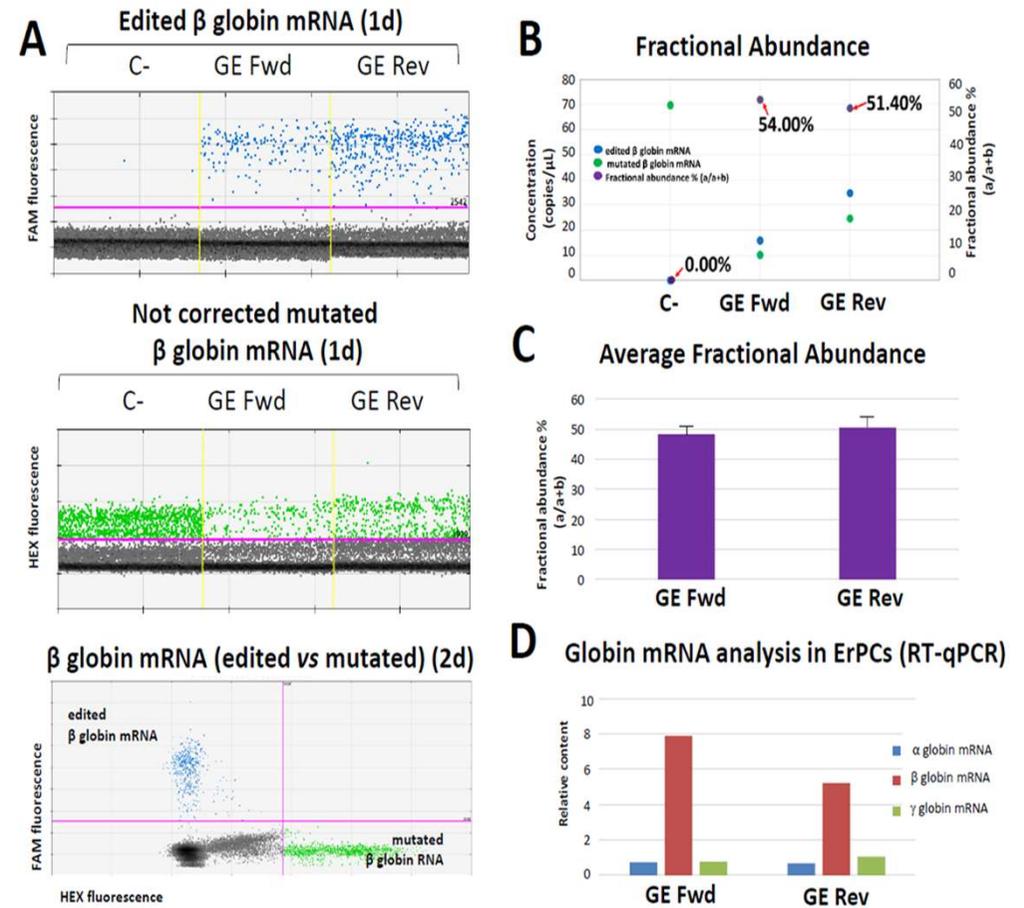
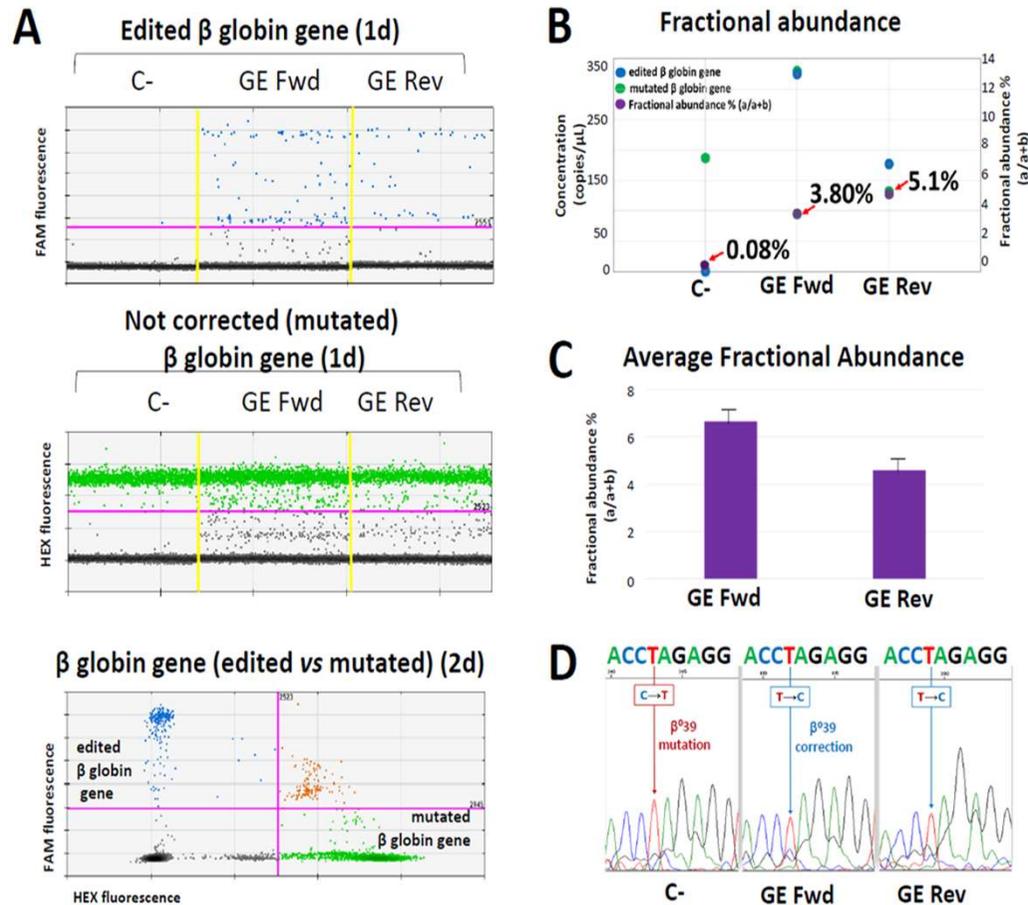


**CRISPR / Cas9:** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats /CAS9

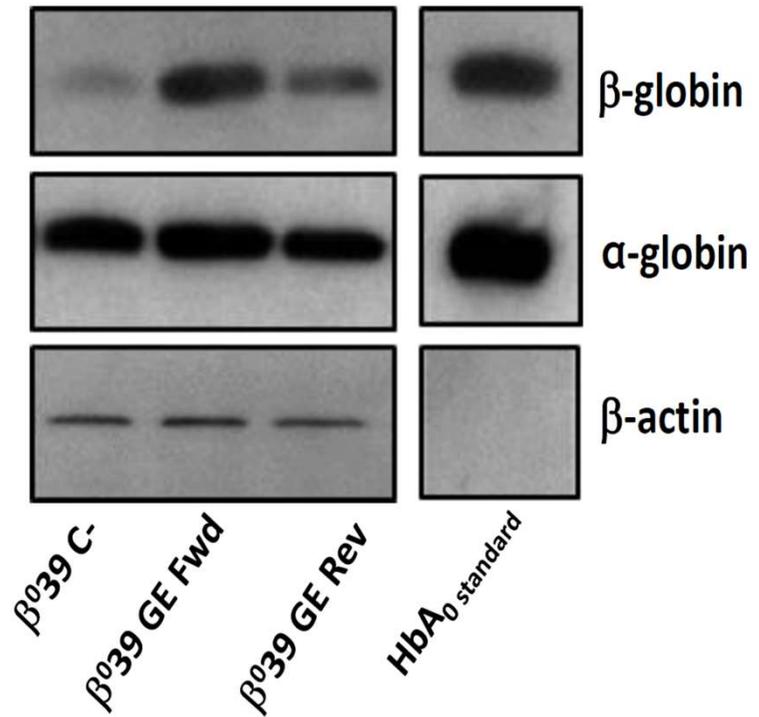
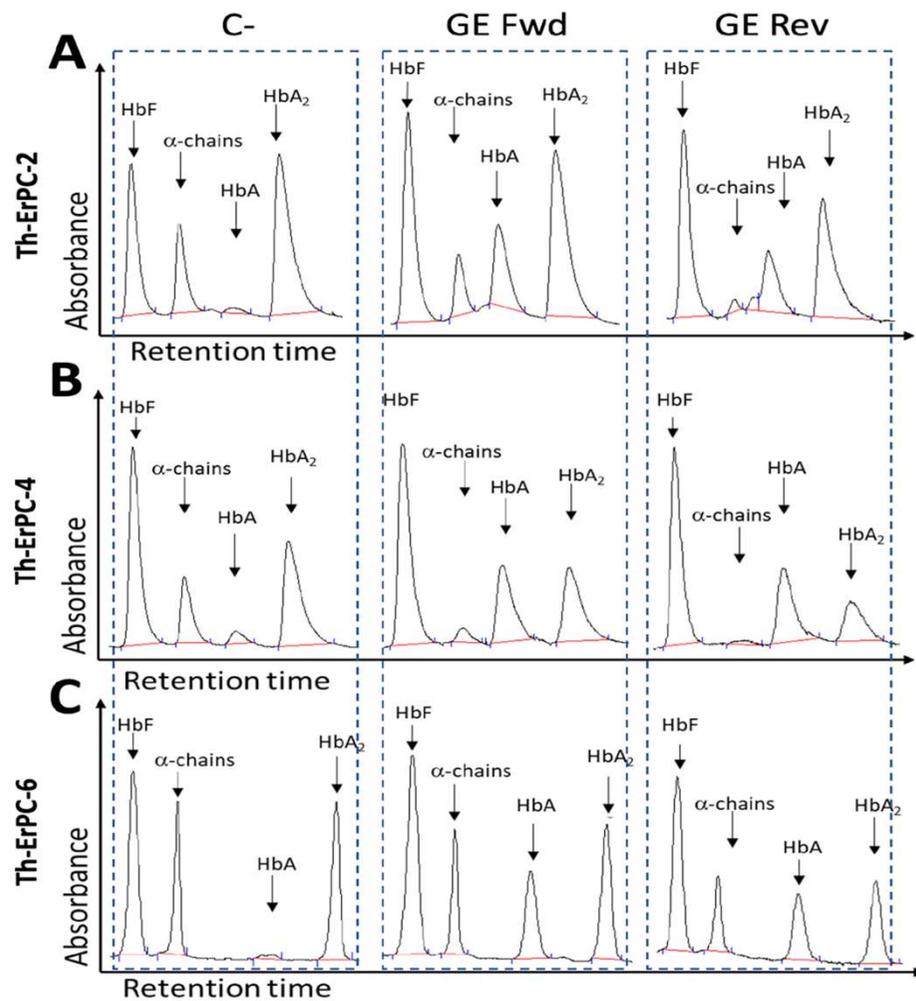
# $\beta^0$ 39-CRISPR/Cas9: esempio terapeutico in talassemia



# $\beta^{\circ}39$ -CRISPR/Cas9: esempio terapeutico in talassemia

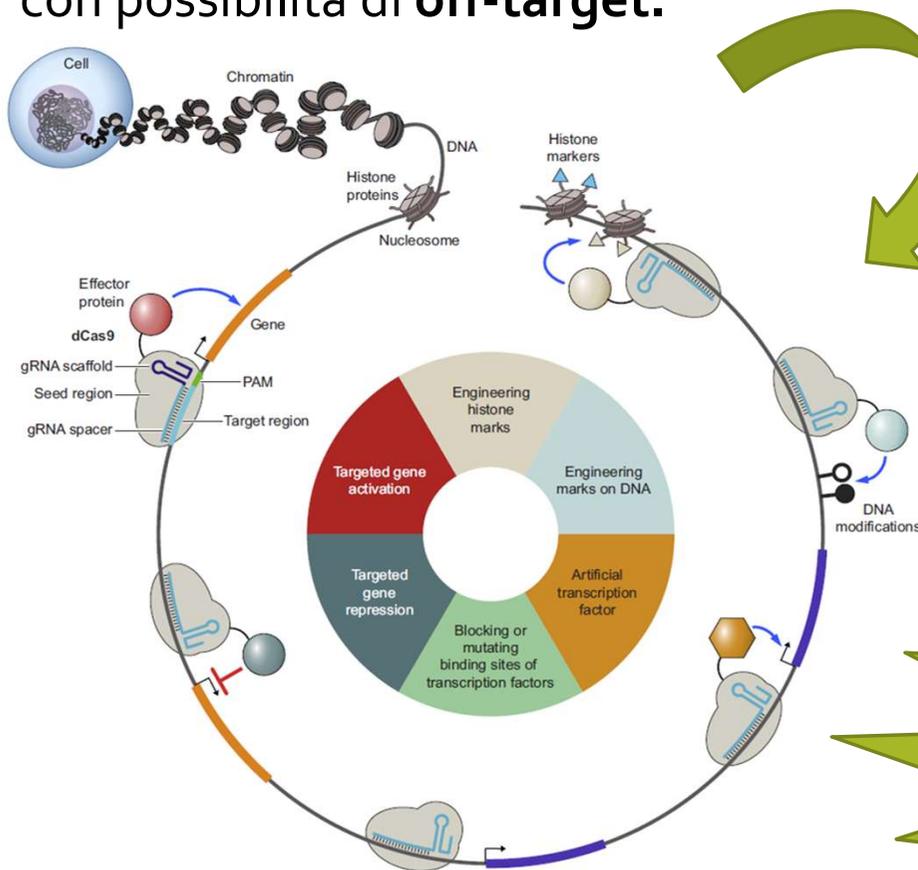


# $\beta^{\circ}39$ -CRISPR/Cas9: esempio terapeutico in talassemia



Lucia Carmela Cosenza\*. Efficient CRISPR/Cas9 based genome editing of  $\beta$ -globin gene on erythroid cells from homozygous  $\beta^039$ -thalassemia patients -Mol Ther Methods Clin Dev. 2021 Apr 3;21:507-523. doi: 10.1016/j.omtm.2021.03.025. PMID: 33997100; PMCID: PMC8091488.

Tuttavia, la complessità di questi approcci può rendere difficile il buon esito della metodica limitando il risultato della correzione a un singolo cambiamento desiderato con possibilità di **off-target**.

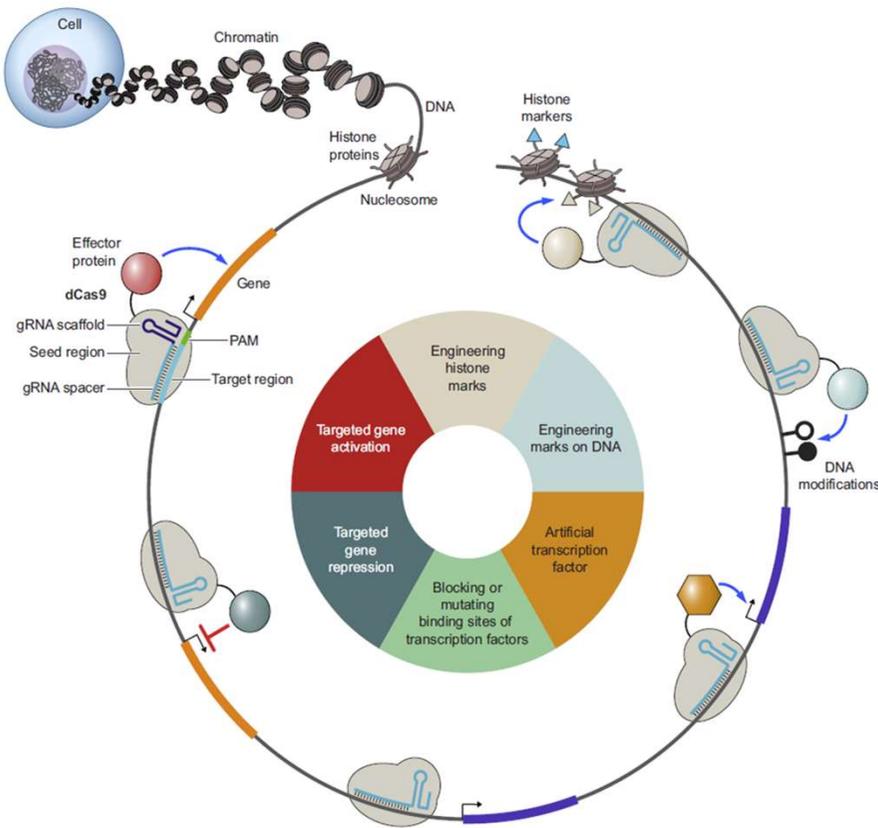


Una modalità alternativa può essere quella di **modificare l'epigenoma** per **modulare l'espressione genica senza modificare la sequenza del DNA sottostante**.

# Epigenome Editing

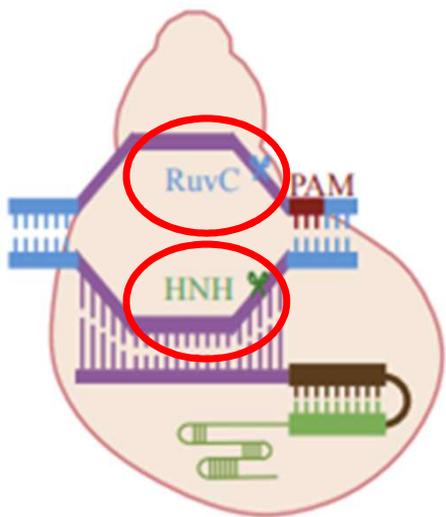
## Le strategie CRISPR applicate all'epigenoma includono:

- l'attivazione e la repressione di geni bersaglio (geni malattia)
- l'interferenza con il legame del fattore di trascrizione
- l'uso di fattori di trascrizione artificiali
- la manipolazione della compattazione della cromatina (modifiche nelle *signature*)



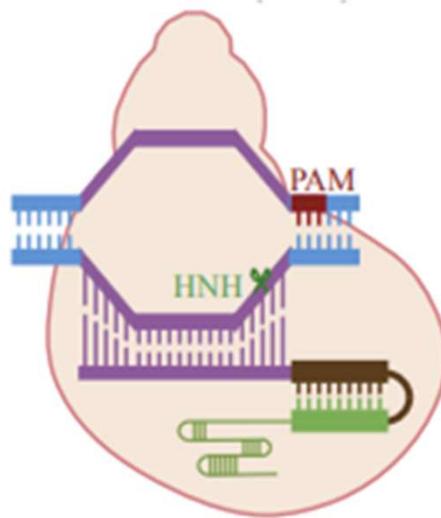
L'editing dell'epigenoma è **programmabile, reversibile e non richiede rotture del DNA**, in modo da limitare efficacemente la tossicità cellulare associata all'editing genetico.

Normal Cas9

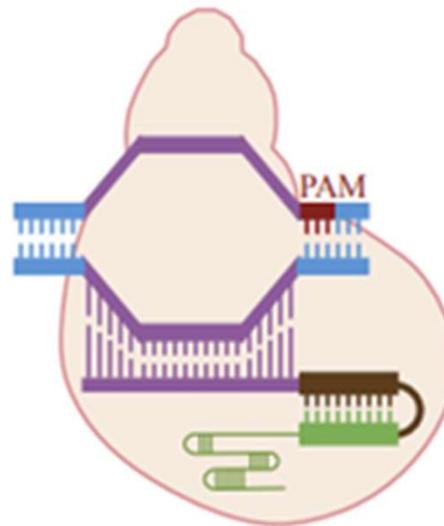


**Le tecniche attualmente disponibili si basano sulla modifica della proteina Cas9.**

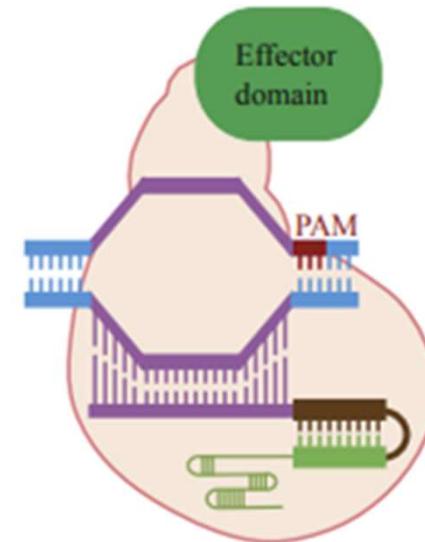
Nickase Cas9 (Cas9n)



Dead Cas9 (dCas9)

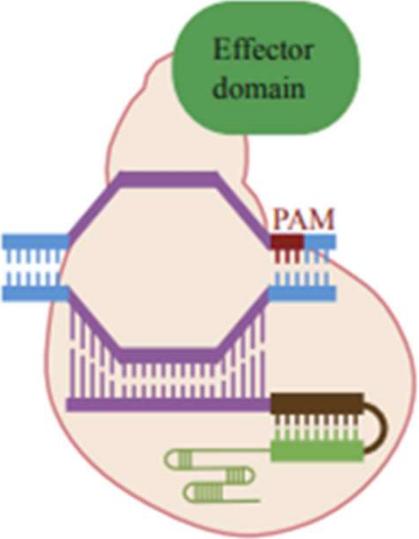


dCas9 fused effector domain



# Silenziamento della sequenza bersaglio

dCas9 fused effector domain



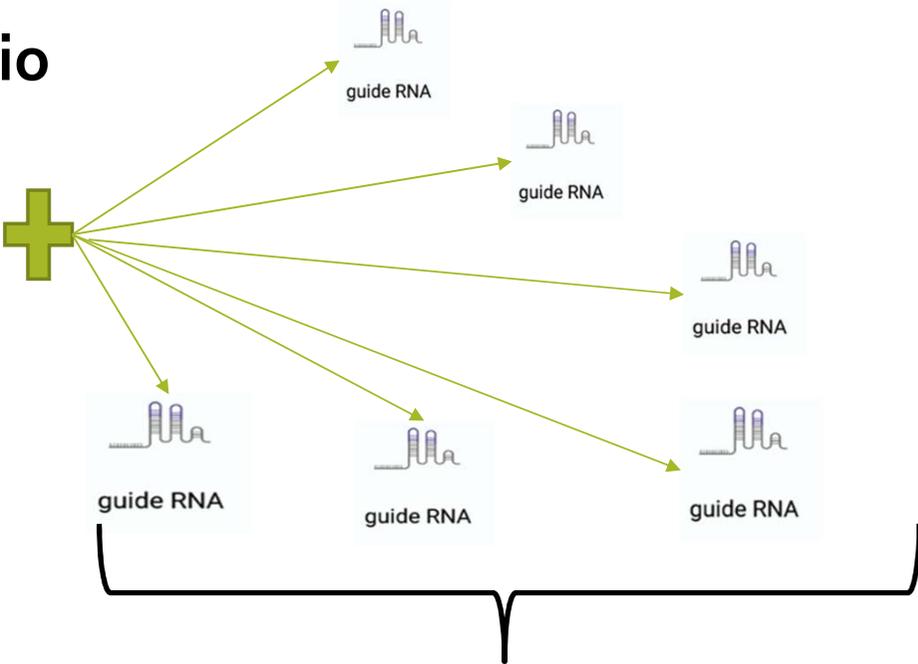
Repressore CRISPRi



Attivatore CRISPRa



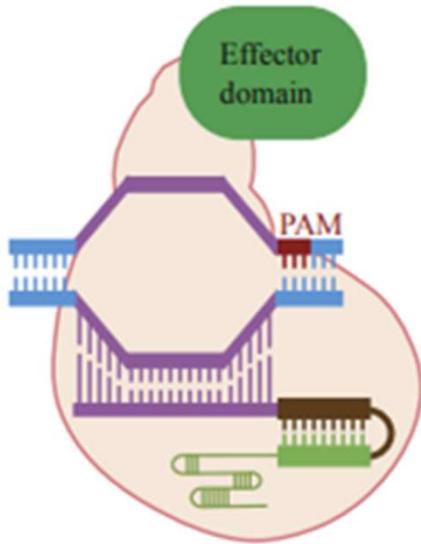
Attivazione dell'espressione della sequenza bersaglio



Può agire su molteplici target genici, portando ad una **ristrutturazione dell'espressione genica** molto importante

# Silenziamento della sequenza bersaglio

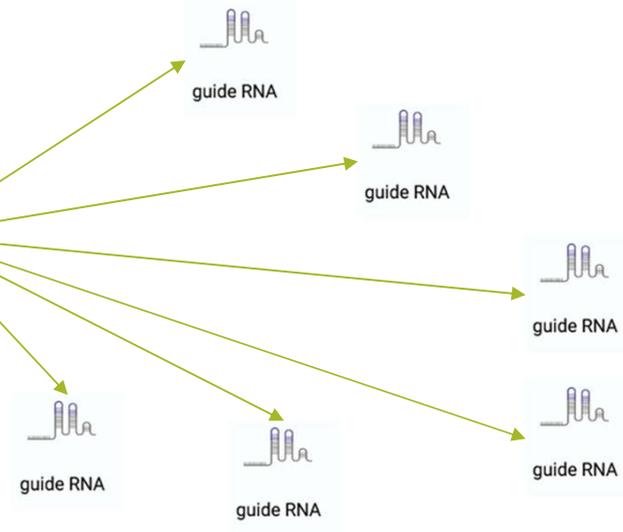
dCas9 fused effector domain



Repressore CRISPRi



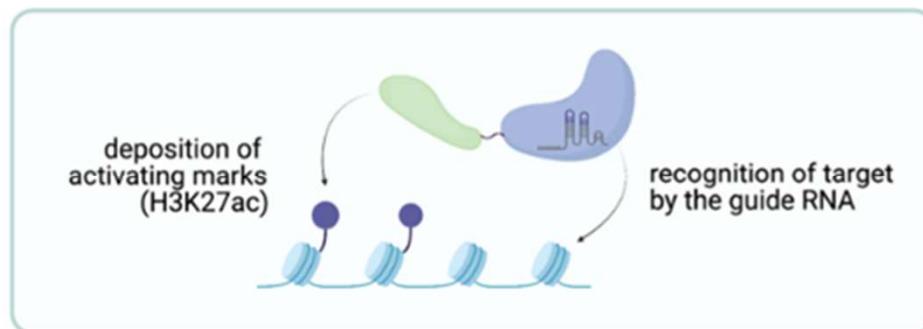
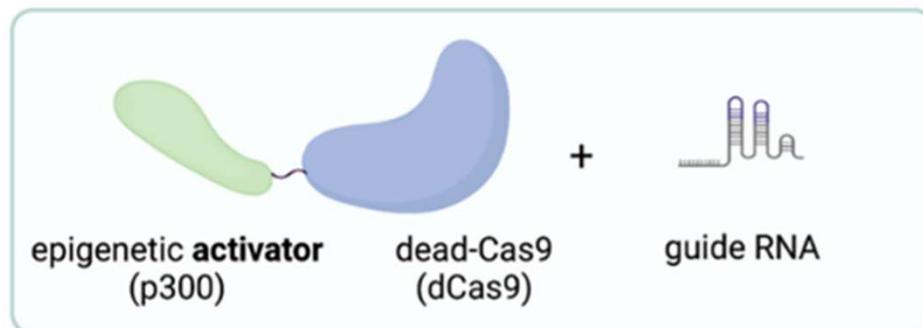
Condizioni complesse e multifattoriali



Può agire su molteplici target geni, portando ad una ristrutturazione dell'espressione genica molto importante

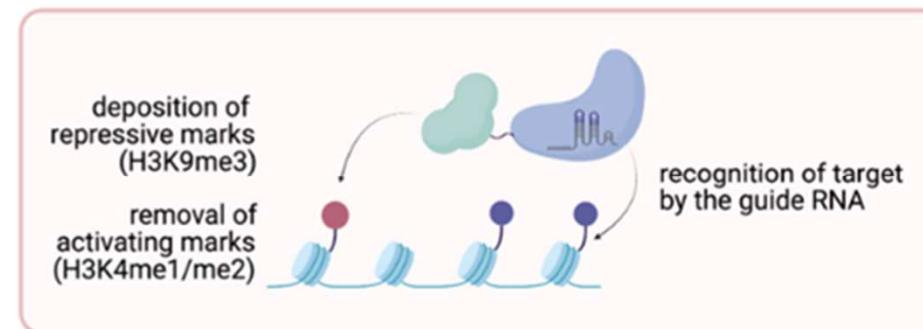
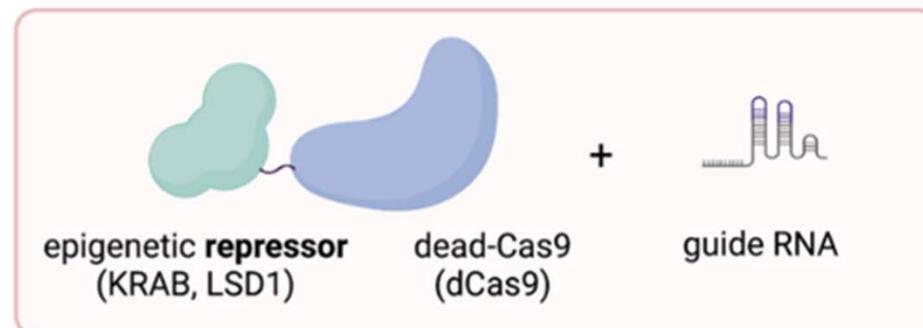
**Potenzialità per applicazioni terapeutiche come modulazione dell'epigenoma, cancro o disturbi neurologici**

## Epigenetic activation



**Increased** gene expression

## Epigenetic repression



**Decreased** gene expression

L'epigenoma è una struttura estremamente dinamica e le modifiche apportate con i sistemi di editing genomico sono in grado di modificare l'espressione genica per un tempo limitato.

**Tuttavia un lavoro recente di Amabile et al. (2016) ha dimostrato che è possibile silenziare stabilmente ed ereditariamente i geni umani mediante il reclutamento di un cocktail di DNA metiltransferasi e domini KRAB.**

Ad oggi solo un piccolo numero di loci sono stati testati per il silenziamento da parte di un sistema di editing ereditario.

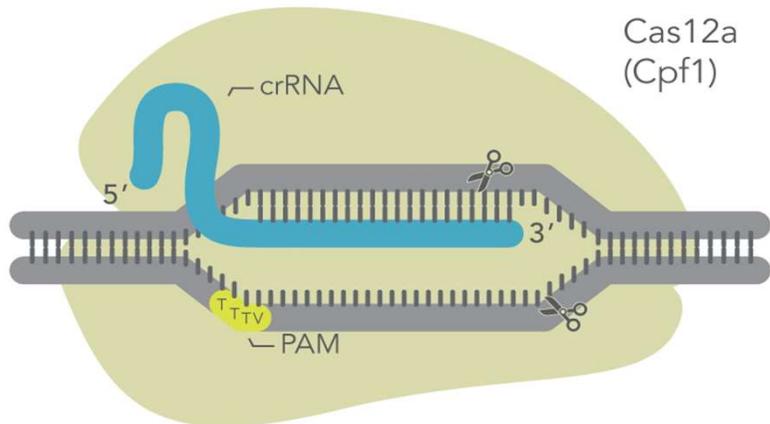
Per multiplexare il sistema di editing è fondamentale che i gRNA utilizzati siano altamente specifici. **CRISPR-dCas12a** (noto anche come **dCpf1**) ha crRNA più brevi e la capacità di elaborare più crRNA da una singola trascrizione, eludendo l'uso di più promotori. Questa caratteristica è stata sfruttata per modulare l'espressione di un massimo di **25 diversi geni umani contemporaneamente.**

## Cas12a

Nell'editing del genoma, Cas12a crea un DSB (Double Strand Breake) con **una sporgenza sfalsata in 5'** (in contrasto con il Cas9 ampiamente utilizzato, che crea un DSB con estremità piatte).

Cas12a è guidato al sito bersaglio da una breve sequenza di RNA (crRNA) è complementare al DNA bersaglio, ma a differenza di Cas9, **non è necessario tracrRNA**.

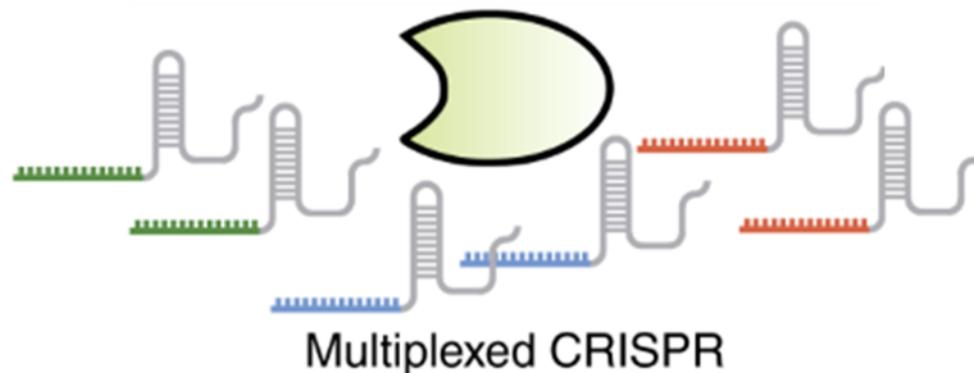
La sequenza bersaglio comprende circa 21 nucleotidi ed è adiacente a una sequenza di motivo protospacer-adiacente (PAM).



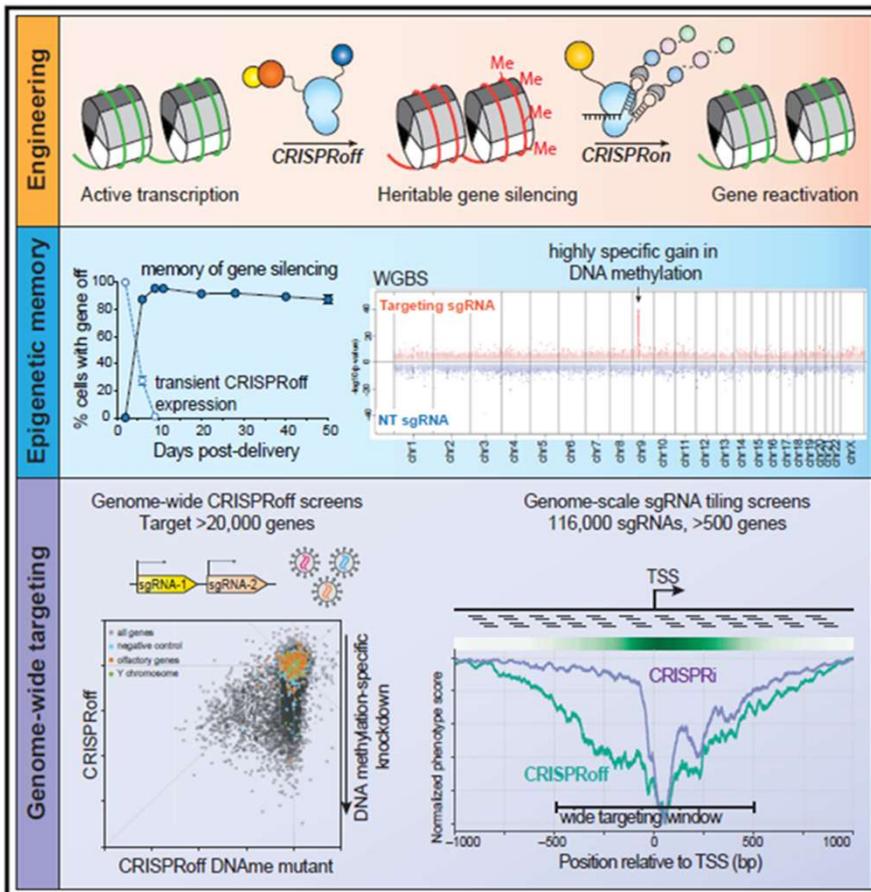
L'enzima Cas12a riconosce una sequenza **PAM unica di TTTV** (dove V è A, C o G).

Cas12a taglia il filo che contiene il PAM in una posizione 18–19 basi dall'estremità 3' del PAM. Il taglio sul filamento opposto del DNA è di 23 basi dal PAM, risultando in una sporgenza in 5' di 4-5 basi.

Poiché più *segni* epigenetici possono coesistere nello stesso locus genomico, i sistemi CRISPR/Cas suscettibili di *multiplexing* saranno estremamente utili per studi futuri e per selezionare i meccanismi regolatori epigenomici endogeni.



Le modifiche epigenetiche persistenti spesso richiedono cambiamenti in più segni epigenetici contemporaneamente e necessitano di metodi robusti per reclutare numerosi effettori di modifica dell'epigenoma in un locus bersaglio in modo da ottenere **effetti prolungati**.



**CRISPRoff:** dCas9 cataliticamente inattivo fuso con domini delle proteine **KRAB**, **Dnmt3A** (D3A), and **Dnmt3L** (D3L).

- CRISPRoff è una singola proteina di fusione che programma la memoria epigenetica ereditabile (analizzate oltre 450 divisioni cellulari).
- CRISPRoff può silenziare ereditariamente la maggior parte dei geni.
- CRISPRoff è altamente specifico
- La memoria epigenetica CRISPRoff persiste attraverso la differenziazione delle iPSC in neuroni

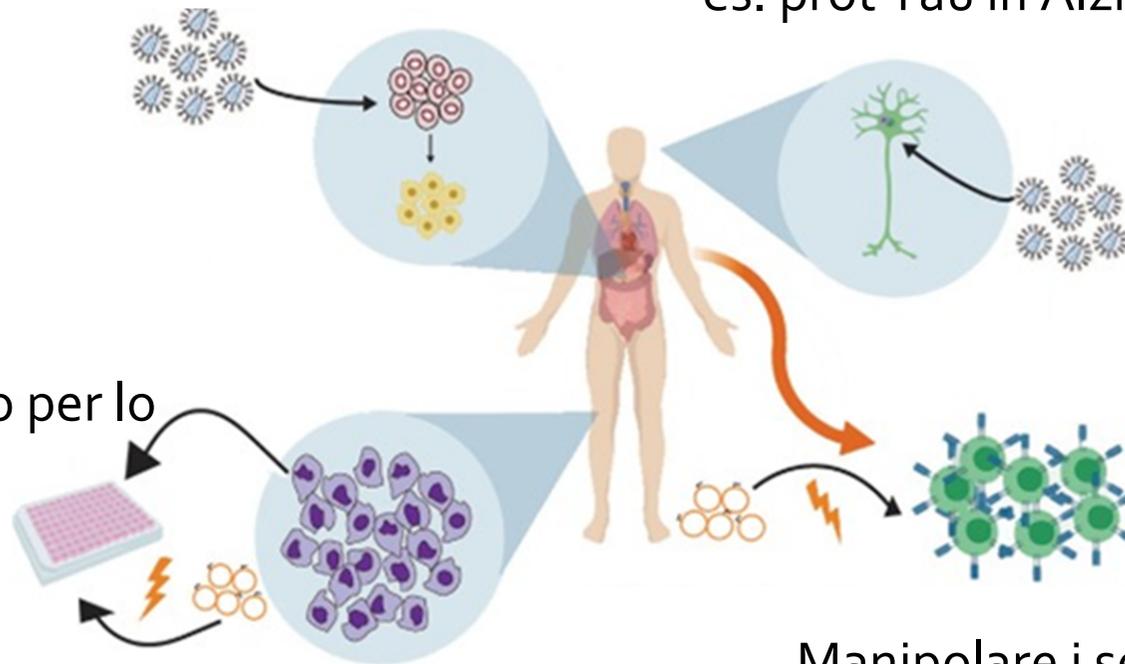
**CRISPRon:** è un sistema in grado di controbilanciare il sistema di silenziamento genico eliminando i gruppi metilici e attivando la trascrizione.

# Applicazioni dell'Epigenome Editing come approccio terapeutico.

Riprogrammare le cellule iPSc

Colpire geni specifici associati a patologie  
es. prot Tau in Alzheimer

Creare un modello per lo  
studio di malattie



Manipolare i segni epigenetici *ex vivo* e modulare espressione genica

**Grazie per l'attenzione**