



Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

19° Corso di formazione avanzata

**Editing del genoma
(e medicina genomica)**

21 - 22 - 23 Aprile 2021

A cura di CarloAlberto Redi

19° Corso di formazione avanzata

**Editing del genoma
(e medicina genomica)**



Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

19° Corso di formazione avanzata

**Editing del genoma
(e medicina genomica)**

21 - 22 - 23 Aprile 2021

A cura di Carlo Alberto Redi

© Copyright 2021  EDIMES
Edizioni Internazionali - Pavia

Edizioni Internazionali srl
Divisione EDIMES - Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

Tutti i diritti sono riservati.
Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo
(compresi i microfilm e le copie fotostatiche)
senza il permesso scritto dell'editore.

Indice

Prefazione	pag.	VI
<i>CarloAlberto Redi</i>		
1. Quando un corpo può dirsi umano: CRISPR e cellule germinali	»	1
<i>CarloAlberto Redi</i>		
2. CRISPR-Cas9 e l'evoluzione dell'editing genomico	»	5
<i>Manuela Monti</i>		
3. La piattaforma epigenetica dCas9 per l'attivazione trascrizionale rappresenta una strategia terapeutica per la cura di malattie neurologiche genetiche e sporadiche	»	10
<i>Vania Broccoli</i>		
4. Gene drive: strategie genetiche per battere la malaria aggirando Mendel	»	13
<i>Andrea Crisanti</i>		
5. The structural and functional characterization of mammalian flavin-containing monooxygenases using ancestral sequence reconstruction	»	15
<i>Callum R. Nicoll, Andrea Mattevi</i>		
6. Editing del genoma e sviluppo di nuove potenziali strategie terapeutiche per il sistema nervoso	»	18
<i>Filippo Casoni</i>		
7. Who treats patients, doctors or genetics?	»	22
<i>Giuseppe Remuzzi</i>		
8. Using genome editing to investigate the regulation of autophagy	»	24
<i>Robin Ketteler</i>		
9. Da conoscenza zero alla Precision Medicine: l'impatto della genetica nella Sindrome del QT lungo	»	26
<i>Peter J. Schwartz</i>		

10. Dalla Genetica Mendeliana al Genetic Risk Score verso una medicina di precisione	pag.	29
<i>Nicola Marziliano</i>		
11. Autologous stem-cell-based gene therapy for inherited disorders of hematopoietic system	»	32
<i>Marina Cavazzana</i>		
12. Genome editing in cellular and animal models of chronic myeloproliferative neoplasms	»	33
<i>Vittorio Rosti</i>		
13. High fidelity nucleases for gene therapy applications	»	37
<i>Anna Cereseto</i>		
14. The CRISPR / Cas9 System in Oncology: functional genomics, identification of new therapeutic targets and precision medicine	»	41
<i>Gabriele Picco</i>		
15. Medicina personalizzata in prevenzione: stato dell'arte negli screening oncologici	»	45
<i>Paolo Giorgi Rossi</i>		
16. Da Asilomar al genome editing: etica della ricerca e modelli di decisione	»	49
<i>Fabrizio Rufo, Antonella Ficorilli</i>		

Prefazione

L'assegnazione del premio Nobel per la chimica nel 2020 a Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna per il loro contributo fondamentale alla scoperta del sistema CRISPR-Cas9, attualmente il metodo più efficace e diffuso di editing genomico (di piante, animali e microrganismi), segna un'altra delle tappe storiche delle conoscenze della fisiologia degli acidi nucleici. In tempi recenti solo la PCR ha avuto un impatto così universale sull'avanzamento delle conoscenze, e sulle applicazioni tecniche di queste, nell'ambito non solo delle scienze della vita ma con la capacità di riverberarsi su tutte le discipline, da quelle del diritto sino alla filosofia passando per l'economia.

Tra le molte applicazioni che la genomica prospetta per il futuro alcune delle più rilevanti per la salute dell'uomo riguardano il settore biomedico. La "Medicina Genomica", e cioè la medicina basata su dati che riguardano i genomi e in particolare il genoma umano, permette già oggi di immaginare un futuro in cui le tecniche di prevenzione, diagnosi e cura saranno perfettamente calibrate sulle caratteristiche biologiche di ciascun individuo, aprendo così la via a una nuova medicina sempre più "personalizzata" e "di precisione" e permettono già da ora concretamente di delineare nuove prospettive di ricerca e di terapia che il Collegio Ghislieri discute nel suo XIX corso di formazione avanzata, discussione che presenta anche prospettive di selezione mirata (tramite "gene drive") al controllo/eliminazione di vettori di malattie per le quali oggi non disponiamo di soddisfacenti ausili terapeutici.

La relazione introduttiva di Manuela Monti illustra come si è giunti a disporre di questa epocale tecnologia a partire dalla scoperta della struttura a doppia elica del DNA nel 1953 ed alla prima manipolazione genetica nel 1987 nel genoma di *Escherichia coli* con l'individuazione delle *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) alle quali sono associati alcuni specifici geni (*CAS*) che codificano per proteine con importanti ruoli per il metabolismo del DNA. Si capirà poi che ci si trova dinanzi ad una sorta di sistema immunitario dei batteri in risposta all'attacco dei virus batteriofagi: ogniqualvolta un batterio è attaccato da un fago è in grado di inserire, come distanziatore in una sequenza CRISPR, una breve sequenza del genoma virale che permane a memoria dell'infezione subita. Brevi sequenze di CRISPR-RNA, prodotte dal metabolismo dei trascritti delle sequenze CRISPR, si legano poi alle proteine Cas formando così i complessi molecolari CRISPR-Cas. Di questi ultimi conosciamo diverse forme che possono però essere categorizzate in due grandi ambiti (classi), quelli propriamente deputati alla difesa antivirale (classe 1) e quelli "più semplici" che contengono una sola proteina di legame con i CRISPR-RNA (classe 2), come ad esempio la più famosa Cas9.

La manipolazione dei sistemi CRISPR-Cas permette oggi di equipaggiarli con le sequenze desiderate di RNA così da riconoscere e modificare specifiche sequenze bersaglio di DNA. Ne discende l'opportunità dell'impiego dell'editing genomico-



co nei più svariati campi, dall'agricoltura per modificare ed adattare caratteristiche fisiologiche delle piante a specifici contesti ambientali sino alle terapie sperimentali contro tumori e malattie ereditarie. Più in generale, la capacità di ingegnerizzare i complessi molecolari CRISPR-Cas e di utilizzarli per correggere, silenziare, potenziare, in una parola per modificare, qualsivoglia gene di animali e vegetali ha spalancato scenari inimmaginabili nelle biotecnologie e nello sviluppo di nuove terapie. Con CRISPR-Cas si possono modificare i genomi di tutti i viventi che così divengono "bozze" di altri possibili viventi (metafora della "correzione di bozze", *genome editing*). Già oggi il taglia-e-modifica è utilizzato per ricerche su:

- linee cellulari capaci di ricapitolare in provetta l'evolvere di una malattia per identificare bersagli terapeutici;
- nuovi farmaci;
- terapie per fegato, occhi, sangue;
- tessuti e organi sintetici di animali immunocompatibili (xenotrapianti);
- terapie antivirali per la distrofia muscolare di Duchenne e la beta-talassemia;
- modifiche genetiche di cellule germinali e precoci stadi dello sviluppo embrionale.

Quest'ultima possibilità (già approvata in Svezia, Regno Unito, Cina e Giappone) richiede un dibattito su vasta scala delle problematiche etiche (come illustrato da Fabrizio Rufo e Antonella Ficorilli) con il rifiuto di una moratoria globale sulla tecnica "CRISPR-cas for gene drive" (favorire la diffusione di un gene per la sterilità): un vasto pubblico dovrebbe accettare l'estinzione programmata di specie animali da parte dell'Uomo per rendere sterili le popolazioni di insetti vettori di malaria, dengue, zika (presentazione di Andrea Crisanti).

Alcuni colleghi (Anna Cereseto, Andrea Mattevi) presentano lavori dedicati alla conoscenza della forma/funzione di proteine ed al loro impiego per terapie geniche ad alta precisione mentre altri presentano studi relativi a specifiche patologie (Peter Schwartz, sindrome del QT lungo) o processi di base (autofagia, Robin Ketteler). Le possibili applicazioni in ambito oncologico (Vittorio Rosti, Gabriele Picco, Paolo Giorgi Rossi) ed i disordini-patologie del sistema nervoso (Vania Broccoli, Filippo Casoni) completano il corso unitamente a letture magistrali sull'uso delle cellule CAR-T (Franco Locatelli), terapia genica per malattie ereditarie del sistema ematopoietico (Marina Cavazzana) e "chi ci cura: il dottore o la genetica" (Giuseppe Remuzzi).

Di particolare rilievo la proiezione del docu-film "Human Nature" vincitore di numerosi premi internazionali ove tutte le tematiche legate all'editing del genoma sono presentate in una maniera scientificamente rigorosa e magistralmente poetica. Ciò al fine di permettere anche ai non-specialisti di essere edotti sui grandi avanzamenti delle conoscenze delle scienze della vita e di contribuire alla crescita della "cittadinanza scientifica" del "comune cittadino". Viviamo ormai in democrazie cognitive e ciascuno di noi deve potersi esprimere in autonomia per vivere appieno in un contesto di laicità sociale.

CarloAlberto Redi



Quando un corpo può dirsi umano: CRISPR e cellule germinali

CarloAlberto Redi

Accademia dei Lincei, Centro per la Ricerca e la Didattica Universitaria, Fondazione Ghislieri

A partire dalla scoperta della struttura del DNA (1953) l'indagine a livello molecolare dei fenomeni viventi ha determinato un'autentica rivoluzione scientifica e tecnologica che è coincisa con la nascita della genomica. Tra le molte applicazioni che la genomica prospetta per il futuro dell'uomo, alcune delle più importanti riguardano il settore biomedico e l'opportunità di intervenire direttamente sulla costituzione genomica dell'umano. Post-umanesimo e trans-umanesimo sono divenuti pertanto temi di pressante attualità per la riflessione non soltanto biomedica ma anche filosofica. Per definire i contorni di quest'ultima riflessione è bene però precisare che sotto il profilo biologico (e dunque per le riflessioni della filosofia della biologia) da sempre la costituzione ontologica del *farsi* umano ha visto un susseguirsi di condizioni costitutive dell'umano. Dall'incrociarsi fertilmente di *Homo sapiens* con *Homo neanderthal* (circa 1,2% dell'attuale genoma di *H. sapiens* ancora è rappresentato da sequenze di DNA neandertalense e ciò giustifica infatti la presenza del diabete in *H. sapiens*: il mantenere alti i tassi ematici del glucosio è un vantaggio adattativo per un cacciatore quale era *H. neanderthal*, è una patologia per un agricoltore quale *H. sapiens* che ha accesso costante alle risorse trofiche), allo sviluppo della tecnologia più potente mai inventata da *H. sapiens*, il linguaggio (grazie allo sviluppo dell'osso iode che permette di pronunciare le vocali e dunque un linguaggio ben più articolato e complesso di quello neandertalense) sino alle attuali condizioni di *mente estesa* di cui *H. sapiens* oggi può avvantaggiarsi grazie a protesi di intelligenza artificiale, la costituzione dell'umano è andata evolvendo. Anche per la ricerca biomedica l'era della genomica ha comportato profondi cambiamenti, rivoluzionando sia le modalità e le tecniche secondo le quali la ricerca scientifica viene condotta, sia gli attori e i siti nei quali tali processi di indagine vengono compiuti. La genomica ha, infatti, inaugurato una nuova fase nella quale ambiti disciplinari un tempo separati vengono ora percepiti come sempre più convergenti e interdipendenti. Così, tutte le scienze-omiche (genomica, epigenomica, proteomica, trascrittomica, metabolomica, per ricordarne alcune) vengono oggi declinate con il fondamentale apporto della bioinformatica, dell'ingegneria dei sistemi e dei materiali e della scienza dei modelli e della computazione, con una particolare attenzione a ciò che accade a livello di nanoscala (10^{-9} metri), ovvero alle applicazioni nanotecnologiche. Inoltre, la necessità della genomica di riuscire a isolare e analizzare sempre maggiori quantità di dati molecolari a costi sempre

più ridotti, ha determinato una vera e propria esplosione di iniziative pubbliche e di compagnie private che operano nel settore biotecnologico, con evidenti ricadute sul piano dell'innovazione tecnica. Nel corso degli ultimi 10 anni il costo per il sequenziamento di un singolo genoma è sceso da \$ 1.000.000 a circa \$ 1.000 e di questi giorni è l'offerta di alcune compagnie di sequenziare un intero genoma umano per soli \$ 100!! Le nuove tecnologie di sequenziamento di ultima generazione permettono ormai di operare analisi non più su di un singolo segmento di DNA, ma sull'intero esoma (*whole-exome sequencing*, o WES) o, addirittura, sull'intero genoma (*whole-genome analysis*, o WGA). Le profonde trasformazioni che la medicina genomica impone non solo alla pratica clinica ma anche al modello stesso secondo cui viene condotta la ricerca biomedica aprono quindi a diversi interrogativi di tipo bioetico, legislativo e biopolitico.

Uno degli strumenti più potenti oggi a disposizione di *H. sapiens* per modificare la propria costituzione genomica (e dunque fenotipica) è costituito dalle tecniche di genome editing. A partire dalle ultime decadi queste tecniche sono divenute di particolare precisione e di impiego universale promettendo applicazioni di rilevante utilità nell'ambito della biologia sintetica in campo animale e vegetale e per la medicina di precisione (Manuela Monti, questo volume). Il 19° corso del "Centro per la Ricerca e la Didattica Universitaria" del Collegio Ghislieri si propone di analizzare e discutere le tematiche legate a ciò che oggi è possibile realizzare nell'ambito dell'Editing del genoma (e per una medicina genomica sempre più avanzata).

Dinnanzi a questa realtà si impone dunque una riflessione sull'editing del genoma umano.

Oggi, la prima e forse più importante applicazione per le tecniche di editing del genoma umano riguarda la ricerca di base. L'uso di tecniche come CRISPR-Cas9 permette, infatti, di studiare alcuni meccanismi e processi biologici fondamentali nell'uomo e in altre specie viventi. In generale, esistono quattro categorie di ricerca di base che possono prevedere l'utilizzo di tecniche di editing del genoma umano:

- 1) ricerche finalizzate a comprendere meglio e raffinare la tecnica stessa;
- 2) ricerche finalizzate a impiegare tecniche di editing del genoma per comprendere aspetti fondamentali della biologia cellulare ed evolutiva umana e non umana;
- 3) ricerche finalizzate a generare dati in vista dello sviluppo di applicazioni nelle cellule somatiche umane e non;
- 4) ricerche finalizzate a generare dati in vista dello sviluppo di applicazioni per fini di riproduzione umana e non.

L'editing del genoma umano nelle cellule somatiche non presenta particolari problemi etici, li presenta di natura tecnica per portare a compimento con successo applicazioni tese a curare patologie ad oggi intrattabili (1). L'impiego di tecniche di editing del genoma in qualità di terapie genetiche per patologie gravi o fatali e per le quali non esiste oggi una cura rappresenta uno degli aspetti eticamente più importanti nel dibattito su questo tema. Esistono, infatti, ancora diverse patologie umane a base genetica – tra cui l'emofilia, l'adenocarcinoma polmonare, il sarcoma di Ewing, la distrofia miotonica, la leucemia mieloide acuta, il morbo

di Huntington, etc. – per le quali, al momento, non esistono cure o per cui esistono cure la cui efficacia e sicurezza non sono considerate ancora soddisfacenti (2). Ciò conferisce alle nuove tecniche di editing del genoma un valore etico intrinseco. Inoltre, le tecniche di editing del genoma come CRISPR-Cas9 possono essere utilizzate per comprendere meglio i meccanismi molecolari di diverse patologie, ad esempio portando alla creazione di linee cellulari con caratteristiche specifiche utili a modellare e studiare in vitro tali patologie, così come a effettuare screening preliminari per saggiare il grado di efficacia e di tossicità di farmaci sperimentali (3).

Oltre che per sviluppare interventi con finalità terapeutiche o migliorative su cellule somatiche, le tecniche di editing come CRISPR-Cas possono essere utilizzate anche per modificare il genoma di cellule staminali embrionali o di gameti (4). È infatti possibile utilizzare tali tecniche per editare il genoma nelle fasi precedenti al concepimento intervenendo sui gameti, oppure nelle prime fasi dello sviluppo embrionale per prevenire lo sviluppo di patologie a base genetica (5). Questa possibilità ha, però, aperto un acceso dibattito in merito alla liceità morale di intervenire sulle cellule della linea germinale, in quanto le possibili conseguenze delle modificazioni in esse apportate non riguarderebbero più soltanto un individuo, ma tutte le generazioni successive (6). Tale scenario solleva importanti interrogativi morali, ad esempio riguardo all'impossibilità delle generazioni future di esprimere il proprio consenso (o veto) a tali modifiche (7). La questione è complessa dato lo stato immaturo delle conoscenze scientifiche che riguardano le tecniche di editing come CRISPR-Cas9, in particolare se applicate a cellule embrionali in fase di differenziamento. Oggi non è possibile escludere con sufficiente certezza la presenza di eventi off-target e fenomeni di mosaicismo a seguito dell'utilizzo di tecniche di editing del genoma, rendendo di fatto impossibile prevedere quali potrebbero essere le conseguenze derivanti da interventi di questo tipo a livello fenotipico per lo sviluppo e la vita di un individuo e, quindi anche dei suoi discendenti. Non sussistono però ragioni etiche sufficienti per escludere l'utilizzo di tecniche di editing del genoma umano rispetto alla loro applicazione nelle cellule della linea germinale. Da un punto di vista morale, infatti, intervenire su cellule della linea germinale in modo da prevenire nelle generazioni future lo sviluppo di patologie molto gravi (i cui fenotipi comportano sofferenze acute, una grave perdita in termini di qualità della vita, o la morte prematura) potrebbe essere non solo moralmente accettabile ma anche eticamente doveroso (8), assumendo però un carattere evolutivo capace di nuove definizioni dello statuto ontologico dell'umano (9).

Bibliografia

1. Bailey S, Maus M. Gene editing for immune cell therapies. *Nature Biotechnology*. 37: 1425-1434, 2019.
2. Platt R. CRISPR tool enables precise genome editing. *Nature*. 2019; 576: 48-49.
3. Dolgin E. Finding the crispr off-switch. *Nature*. 2020; 577: 308-310.
4. Cohen J. Crossing the lane. *Science*. 2019; 366: 562-565.
5. Lea R, Niakan K. Human germline genome editing. *Nature Cell Biology*. 2019; 21: 1479-1489.



6. Kaiser J. Screening embryos for complex genetic traits called premature. *Science*. 2019; 366: 405-406.
7. Vijlbrief B. Germline genome editing: public dialogue is urgent but not self-evident. *European Journal of Human Genetics*. 2020; 28: 4-5.
8. Cyranoski D. Russian scientist edits human eggs in effort to alter deafness gene. *Nature*. 2019; 574: 465-466.
9. Sini C, Redi CA. *Lo specchio di Dioniso: quando un corpo può dirsi umano*. Jaka book, Milano. 2019.



co, in medicina umana come in quella veterinaria, in agricoltura come in produzioni biotecnologiche e molto altro ancora. È una tecnica ottimizzata dalle mani sapienti di tre ricercatori, due donne, Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier (Nobel per la Chimica 2020) e un uomo, Feng Zhang e sottolinea, ancora una volta, l'importanza della ricerca di base, come fondamento della possibile traslazionale dei risultati, dal bancone del laboratorio al letto del paziente.

Breve storia della scoperta del genome editing

I genomi degli eucarioti sono composti da miliardi di basi di DNA. La capacità di cambiare queste basi in posizioni precisamente predeterminate ha un valore enorme non solo in biologia molecolare, ma anche in medicina e nelle biotecnologie. Infatti, la possibilità di introdurre specifici e mirati cambiamenti nel genoma, è stato, per i biologi, un obiettivo molto importante da raggiungere. La scoperta degli enzimi di restrizione che normalmente proteggono i batteri dai virus è stata una svolta che ha alimentato l'era del DNA ricombinante alla fine degli anni '70, dando agli scienziati la possibilità, per la prima volta, di manipolare il DNA in provetta. Tuttavia, la capacità di modificare con precisione il DNA delle cellule eucariotiche arrivò qualche decennio più tardi. Sarà infatti un importante lavoro di Smithies e Capecchi in cellule di mammifero (1, 2) a dimostrare che le cellule possono incorporare una copia esogena del DNA nel proprio genoma attraverso un processo chiamato ricombinazione omologa che presenta, però, almeno tre limitazioni:

- 1) il tasso di spontaneo di integrazione di una copia esogena del DNA è estremamente basso;
- 2) il tasso di integrazione dipende dai diversi tipi cellulari;
- 3) l'approccio potrebbe comportare l'integrazione casuale della copia esogena in loci genomici indesiderati a una frequenza simile o superiore a quello del sito target.

Per ovviare a queste limitazioni, gli scienziati, nel corso degli anni, hanno cercato approcci alternativi. Uno di essi, la scoperta delle *zinc finger proteins*, piccoli motivi di proteine regolate da ioni zinco che si legano al DNA in modo specifico per sequenza, ha permesso di ottenere una maggiore specificità di legame al DNA ma è certamente CRISPR che, essendo molto semplice da usare ed estremamente flessibile, ha rivoluzionato questo campo in termini di efficienza di modificazione.

CRISPR, acronimo di brevi ripetizioni palindrome raggruppate e separate a intervalli regolari, è composta da una endonucleasi la cui specificità mirata al DNA e l'attività di taglio possono essere programmate da una breve guida a RNA. In particolare, CRISPR era conosciuto come un peculiare elemento di ripetizione del DNA procariotico per diversi decenni prima di essere sfruttato come un potente strumento di *gene-targeting*. Sebbene il nome CRISPR fu coniato più tardi (3), questi elementi ripetitivi furono inizialmente notati in *E. Coli* dal gruppo del Dr. Nakata della Osaka University (4). È interessante notare che, a differenza delle tipiche ripetizioni in tandem nel genoma, nelle ripetizioni CRISPR i cluster sono separati da sequenze di DNA non ripetute chiamate distanziatori (5). I ricercatori hanno impiegato più di un decennio per riconoscere la natura e l'origine di queste

sequenze che sono state svelate per la prima volta grazie al progetto genoma umano in cui i genomi di molti organismi, tra cui quelli di molti virus batteriofagi furono sequenziati. Le analisi computazionali di queste sequenze hanno permesso ai ricercatori di notare almeno tre caratteristiche chiave delle ripetizioni CRISPR e dei distanziatori: la prima, che le sequenze CRISPR sono presenti in più di 40% dei genomi batterici sequenziati e nel 90% di quelli di archaea (5); la seconda che gli elementi CRISPR sono adiacenti a geni ben conservati chiamati geni associati a CRISPR, i Cas (3); la terza che le sequenze di DNA dei distanziatori appartengono a genomi virali e ad altri elementi genici mobili (6, 7). Queste osservazioni hanno suscitato l'interesse di molti ricercatori e l'idea che il sistema CRISPR non fosse altro che un sistema usato dai batteri per sconfiggere i virus iniziò ad emergere, sebbene non ancora dimostrata. Sarà il lavoro di Horvath e colleghi del 2007 a supportare la validità di questa idea dimostrando che lo *Streptococcus thermophilus*, dopo un attacco da parte dei virus, è in grado di integrare nel suo genoma i nuovi distanziatori derivati dai virus stessi (8) e, cosa ancora più di rilievo, che le sequenze del distanziatore di CRISPR determinano la specificità di targeting degli enzimi Cas che, a loro volta, forniscono difesa contro i virus (8). Dopo questo lavoro altri ricercatori hanno dissezionato meglio il meccanismo d'azione del sistema CRISPR dimostrando che l'attività dei Cas è guidata da brevi CRISPR RNA (crRNA) trascritti dalle sequenze dei distanziatori (9) e che può bloccare il trasferimento orizzontale del DNA da plasmidi batterici (10). Tali entusiasmanti pubblicazioni hanno stimolato un ulteriore interesse volto alla comprensione del meccanismo molecolare del sistema CRISPR. Uno dei risultati chiave è stato osservare che le sequenze acquisite del distanziatore sono altamente simili tra loro in regioni chiamate PAM (*Protospacer adjacent motif*, Motivo Adiacente al Protospacer) costituite da una sequenza di 2-6 paia di basi immediatamente successive alla sequenza di DNA identificata da Cas nel sistema immunitario dei batteri mediato da CRISPR(11); inoltre è stato dimostrato che il DNA dell'enzima Cas9, tra molte Cas, era l'unico dotato di attività catalitica in *S. thermophilus* (12). Sarà infine il lavoro del gruppo guidato da Emmanuelle Charpentier a rivelare il meccanismo di biogenesi dei due brevi RNA richiesti per il funzionamento di Cas9 (13). Una ultima importante scoperta ha mostrato che il sistema CRISPR adottato da un batterio poteva essere trasferito a diversi ceppi batterici: ad esempio, da *S. thermophilus* a *E. coli* come Siksnys e colleghi hanno mostrato (14). Il lavoro però più importante che ha probabilmente segnato l'inizio dell'era CRISPR ha dimostrato che gli enzimi Cas9 possono essere riprogrammati per colpire una desiderata sequenza di DNA nei batteri (15). CRISPR, per funzionare, necessita di due RNA brevi: un crRNA maturo e un crRNA trans-attivatore (tracrRNA). Quando una copia del DNA invasore si integra all'interno del locus, CRISPR viene trascritto producendo il cosiddetto pre-crRNA. L'RNA viene reclutato da Cas9 formando un complesso attivo. Una delle vie più conosciute attraverso cui questo RNA viene attivato richiede la trans-attività del tracrRNA che è in grado di complementarsi parzialmente con il pre-crRNA formando un ibrido di RNA a doppio filamento. Tale ibrido non maturo viene tagliato dalla RNasi III che genera l'ibrido crRNA/tracrRNA. Questo RNA è incorporato in un complesso effettore con la proteina Cas9, dove

funge da RNA guida per il riconoscimento dell'acido nucleico estraneo, in seguito degradato da Cas9. La possibilità di manipolare *in vitro* tutti questi componenti del sistema CRISPR-Cas9 ha fatto sì che questa tecnologia sia oggi molto diffusa nei laboratori a livello internazionale per lo studio, ad esempio, delle funzioni dei geni e della progressione del cancro. È una tecnologia che potenzialmente può essere concepita per correggere mutazioni dannose del DNA, relative a molte malattie. Più in generale, può essere impiegata per studi del genoma legati all'azione di farmaci o per generare modelli animali di patologie umane utili nella ricerca. In piante e funghi può essere utile per ricerche che assicurino una migliore produzione quali- e quantitativa di prodotti di interesse economico (si legga a proposito l'interessante review Doudna, Charpentier pubblicata nel 2014 (16)). Come riportato da Adam Bolt, il direttore del bellissimo e toccante documentario Human Nature: *“Una svolta chiamata CRISPR ci fornisce un controllo senza precedenti sui mattoni fondamentali della vita. Apre le porte alla cura delle malattie, al rimodellamento della biosfera e alla progettazione dei nostri figli. Human Nature è un'esplorazione provocatoria delle implicazioni di vasta portata di CRISPR, attraverso gli occhi degli scienziati che l'hanno scoperto, delle famiglie che potrebbero beneficiarne e dei bioingegneri che ne stanno testando i limiti. In che modo questo nuovo potere cambierà il nostro rapporto con la natura? Cosa significherà per l'evoluzione umana? Per iniziare a rispondere a queste domande dobbiamo guardare indietro di miliardi di anni e scrutare un futuro incerto”*.

Bibliografia

1. Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*. 1985; 317: 230-234.
2. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 244, 1288-1292 (1989).
3. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 2002; 43: 1565-1575.
4. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 1987; 169: 5429-5433.
5. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* 2000; 36: 244-246.
6. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 2005; 60: 174-182.
7. Pourcel C, Salvagnol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005; 151: 653-663.



8. Barrangou R, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007; 315: 1709-1712.
9. Brouns SJ, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 2008; 321: 960-964.
10. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*. (2008; 322: 1843-1845.
11. Deveau H, et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 2008; 190: 1390-1400.
12. Garneau JE, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010; 468; 67-71.
13. Deltcheva E, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011; 471: 602-607.
14. Sapranaukas R, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39: 9275-9282.
15. Jinek M, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012; 337: 816-821.
16. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014; 346: 1258096.

La piattaforma epigenetica dCas9 per l'attivazione trascrizionale rappresenta una strategia terapeutica per la cura di malattie neurologiche genetiche e sporadiche

Vania Broccoli

Istituto di Neuroscienze - CNR; Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

La possibilità di introdurre qualsiasi modifica desiderata in siti specifici del genoma delle cellule, l'editing del genoma, è un'ambizione di lunga data nelle biotecnologie e nella medicina molecolare e sta ora rendendo la medicina di precisione una possibilità reale per il trattamento delle malattie genetiche.

La tecnologia CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated protein 9) è diventata un potente strumento per l'editing del genoma, consentendo al DNA di essere modificato con alta efficienza e specificità. Come dimostrato in diversi tipi di cellule e organismi, il complesso Cas9/sgRNA può tagliare i due filamenti del DNA, causando l'inattivazione di un gene o inducendo una modifica nella sequenza nucleotidica mediante ricombinazione omologa con un "DNA donor". Una variante del sistema CRISPR è rappresentata dalla "defective Cas9" (dCas9), che può legare il DNA senza tagliarlo, fusa a domini effettori per la regolazione genica trascrizionale. Quindi, il complesso dCas9/sgRNA funziona da piattaforma che può veicolare in regioni genomiche pre-determinate degli effettori per la manipolazione trascrizionale o epigenetica del genoma senza la necessità di tagliare il DNA. Numerosi sono i tipi di domini fusi alla dCas9 che possono modulare la trascrizione di un gene target. L'attivazione genica è stata ottenuta fondendo la dCas9 ai domini di stimolazione della trascrizione VP16, p65, RTA. Al contrario, vari domini KRAB fusi alla dCas9 inducono una forte repressione dell'attività genica. In entrambi i casi l'azione della dCas9 è quella di portare questi effettori sul promotore prossimale del gene di cui si vuole regolarne l'espressione in modo che possano interagire con il macchinario molecolare di trascrizione. Oltre a regolare l'attivazione trascrizione la piattaforma dCas9 può essere utilizzata per modifiche dello stato epigenetico del gene di interesse. Per esempio, la dCas9 fusa al dominio catalico dell'enzima acetiltransferasi p300 è capace di indurre l'acetilazione della Lisina 27 dell'istone H3 sul promotore del gene desiderato stimolandone così l'attività trascrizionale. Un'altra importante modifica epigenetica è la metilazione del DNA. La dCas9 fusa ai domini catalitici delle DNA metiltransferasi (DNMT3A-3L) è capace di indurre la metilazione delle isole di CpG sul promotore inducendo così il silenziamento genico. Questa modifi-

ca epigenetica è stabile nel tempo, per cui è sufficiente l'espressione transiente della dCas9 per reprimere la trascrizione di un gene per lungo tempo. Quindi la piattaforma dCas9 è molto versatile e sicura perché non richiede il taglio del DNA. Anche questo sistema può avere off-targets nel caso il complesso dCas9/sgRNA si leghi a promotori di altri geni rispetto al target specifico selezionato. Questo è però un evento relativamente raro per cui la sicurezza della dCas9 è molto più alta rispetto alla Cas9 nucleasi il cui taglio può avere effetti nocivi in gran parte delle regioni genomiche.

La piattaforma dCas9 ha un forte potenziale terapeutico per la cura di malattie genetiche aploinsufficienti per aumentare i livelli di espressione dell'allele sano. Il mio gruppo di ricerca ha utilizzato la dCas9 per regolare in modo significativo l'espressione di *Scn1a* e per ripristinare i livelli di proteina Nav1.1 in modelli cellulari e animali della Sindrome di Dravet (DS). DS è una grave encefalopatia epilettica che inizia nel primo anno di vita con convulsioni spesso associate a febbre che successivamente evolvono in crisi epilettiche frequenti, prolungate e raggruppate. Negli anni successivi, i pazienti spesso sviluppano ritardo psicomotorio, disturbi comportamentali e deterioramento cognitivo. La DS è una condizione genetica causata principalmente da mutazioni nel gene *SCN1A* che codifica per la subunità alfa del canale del sodio voltaggio-dipendente Nav1.1. Oltre 650 mutazioni *SCN1A* missenso e nonsense sono state descritte in pazienti con DS. Le mutazioni di *SCN1A* colpiscono solo una copia del gene che in genere porta alla perdita di funzione e indica che un meccanismo genetico aploinsufficiente è responsabile della DS. Questi dati suggeriscono che una quantità ridotta di canale Nav1.1 altera l'attività e la funzione neuronale. Noi abbiamo dimostrato che il sistema dCas9 può essere adattato per ottenere un'attivazione robusta e altamente specifica del gene *Scn1a* sia nei neuroni coltivati che nel tessuto cerebrale. Inoltre, il sistema di attivazione dCas9 può essere confezionato in AAV per stabilire un approccio di terapia genica per il trattamento dei topi DS e ottenere una protezione dalle crisi epilettiche indotte. Un approccio simile può quindi essere preso in considerazione per altre malattie genetiche aploinsufficienti in cui la stimolazione dell'allele wild-type può salvare le disfunzioni molecolari e portare a un beneficio clinico.

Bibliografia

1. Colasante G, Lignani G, Brusco S, Di Berardino C, Carpenter J, Giannelli S, Valassina N, Bido S, Ricci R, Castoldi V, Marenga S, Church T, Massimino L, Morabito G, Benfenati F, Schorge S, Leocani L, Kullmann DM, Broccoli V. dCas9-Based *Scn1a* Gene Activation Restores Inhibitory Interneuron Excitability and Attenuates Seizures in Dravet Syndrome Mice. *Mol Ther.* 2020; 28: 235-253.
2. Colasante G, Qiu Y, Massimino L, Di Berardino C, Cornford JH, Snowball A, Weston M, Jones SP, Giannelli S, Lieb A, Schorge S, Kullmann DM, Broccoli V, Lignani G. In vivo CRISPRa decreases seizures and rescues cognitive deficits in a rodent model of epilepsy. *Brain.* 2020; 143: 891-905.



3. Lubroth P, Colasante G, Lignani G. In vivo Genome Editing Therapeutic Approaches for Neurological Disorders: Where Are We in the Translational Pipeline? *Front Neurosci.* 2021; 15: 632522.
4. Nakamura M, Gao Y, Dominguez AA, Qi LS. CRISPR technologies for precise epigenome editing. *Nat Cell Biol.* 2021; 23: 11-22.
5. Matharu N, Ahituv N. Modulating gene regulation to treat genetic disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2020; 19: 757-775.
6. Thakore PI, Black JB, Hilton IB, Gersbach CA. Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nat Methods.* 2016; 13: 127-137.
7. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell.* 2013; 152: 1173-1183.
8. Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, Iyer EPR, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat. Methods.* 2015; 12: 326-328.
9. Amabile A, Migliara A, Capasso P, Biffi M, Cittaro D, Naldini L, Lombardo A. Inheritable Silencing of Endogenous Genes by Hit-and-Run Targeted Epigenetic Editing. *Cell.* 2016; 167: 219-232.e14.
10. Hilton IB, D'ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9- based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat. Biotechnol.* 2015; 33: 510-517.

Gene drive: strategie genetiche per battere la malaria aggirando Mendel

Andrea Crisanti

Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova

Ogni anno la malaria infetta oltre 200 milioni di persone, uccidendone mezzo milione. In gran parte si tratta di bambini africani. Dopo alcuni anni di progressi incoraggianti, le misure tradizionali di controllo sono tornate a mostrare i loro limiti, come documenta l'ultimo rapporto dell'Organizzazione mondiale della sanità. Non bastano i farmaci, le zanzariere, gli insetticidi, e non disponiamo di un vaccino efficace. Servono strategie innovative, che tengano conto dell'elevata variabilità del parassita responsabile (il plasmodio), della complessa biologia delle zanzare che lo veicolano (*Anopheles*) e delle difficoltà logistiche del contesto africano.

Da circa venti anni il mio gruppo di ricerca presso l'Imperial College di Londra lavora all'approccio dei "gene drive" per il controllo genetico degli insetti vettori della malaria. Il primo contributo fondamentale per la nascita di questo filone di ricerca lo abbiamo dato nel 2000, con la generazione delle prime zanzare geneticamente modificate. Nel 2003 Austin Burt ha pubblicato la prima dimostrazione teorica che è possibile accelerare la diffusione di geni di interesse sfruttando il traino di elementi genici definiti "egoisti" perché capaci di autopropagarsi. Quindi nel 2011 abbiamo firmato insieme il lavoro che ha sottoposto i concetti di base alla prova sperimentale. Questo primo modello di drive si basava su un enzima capace di tagliare il DNA ma difficile da dirigere (homing endonuclease). I drive su cui lavoriamo oggi, invece, sono basati su una piattaforma facilmente programmabile, la cui invenzione è stata premiata con il Nobel per la chimica 2020 (CRISPR-Cas9). Nel frattempo il progetto nato all'Imperial College è diventato uno sforzo internazionale finanziato dalla Bill and Melinda Gates Foundation e aperto al contributo di molte discipline, dalla biologia evolutiva, all'ecologia, dalla bioetica alle scienze sociali.

Supponiamo di voler propagare un gene chiave per bloccare la trasmissione della malaria, a partire da poche decine di esemplari ingegnerizzati in laboratorio, fino a raggiungere intere popolazioni di *Anopheles* in vaste regioni dell'Africa. I meccanismi mendeliani che regolano l'ereditarietà rappresentano un ostacolo pressoché insormontabile: ogni volta che una zanzara modificata si accoppia con una selvatica, infatti, la modificazione genetica verrà ereditata solo dalla metà dei suoi figli. Senza gene drive, dunque, sarebbe necessario il rilascio di quantità enormi di individui modificati, con ovvi problemi di costi e di logistica. Se invece la sequenza che vogliamo diffondere è ancorata a un gene drive, potrà essere ereditata dall'intera progenie, continuando a diffondersi allo stesso modo generazione dopo generazione. In pratica il meccanismo

converte gli individui eterozigoti (portatori di copie diverse del gene, una mutata e l'altra no) in individui omozigoti (con due copie uguali, entrambe mutate). Per farlo funzionare è sufficiente programmare CRISPR-Cas9 in modo che effettui un taglio mirato nella sequenza bersaglio e poi sfruttare il cromosoma contenente il gene da propagare come stampo per riparare la lesione.

Esistono tre tipologie di modificazioni genetiche potenzialmente utili per il nostro scopo. La prima consiste nel rendere le zanzare immuni alla malaria distruggendo dei geni essenziali per la trasmissione del plasmodio. La seconda mira alla riduzione della fertilità femminile, colpendo geni coinvolti nella produzione delle uova. La terza abbassa le possibilità di accoppiamento alterando il rapporto maschi/femmine fino al collasso della popolazione. All'Imperial College abbiamo scartato il primo approccio (detto di sostituzione) perché non sarebbe possibile controllare l'evoluzione delle zanzare resistenti dopo averle rilasciate. Invece con le altre strategie (dette di soppressione) possono verificarsi soltanto due scenari: se l'approccio funziona, si eliminano le zanzare dannose; se non funziona, la modificazione si perderà tornando allo stadio iniziale. Spesso si parla di estinzione programmata, ma è bene chiarire che le zanzare possono essere prima ridotte drasticamente per eliminare il parassita e poi reintrodotte in assenza di trasmissione, se lo si ritiene desiderabile per ragioni ecologiche.

Nel 2018 abbiamo ottenuto buoni risultati agendo su un interruttore (il gene *Doublesex*) che consente di ottenere maschi fertili e femmine sterili. Nel 2020 abbiamo riportato un successo ancora maggiore distruggendo l'intero cromosoma X in modo da far nascere solo individui maschi.

Dopo il primo step in laboratorio, l'efficacia, la stabilità e le dinamiche di diffusione dei gene drive vengono testate in condizioni il più realistiche possibile, utilizzando gabbie di grandi dimensioni che riproducono le condizioni climatiche tropicali. I primi rilasci sperimentali nell'ambiente, però, potranno avvenire solo dopo aver condotto adeguati studi entomologici per esaminare la distribuzione, l'eterogeneità genetica ed il flusso genico delle diverse specie di zanzare presenti nelle aree geografiche selezionate. La comunità scientifica è concorde nel ritenere necessaria un'attenta analisi di rischi e benefici su scala locale, in un contesto di trasparenza, responsabilità e democrazia partecipativa. Le comunità su cui grava il fardello della malaria sono quelle a cui spetta il diritto di decidere se e come applicare strategie innovative.

The structural and functional characterization of mammalian flavin-containing monooxygenases using ancestral sequence reconstruction

Callum R. Nicoll, Andrea Mattevi

Department of Biology and Biotechnology “Lazzaro Spallanzani”, University of Pavia

Flavin-containing monooxygenases (FMOs) are prevalent in all domains of life and epitomize integral detoxifying agents. Throughout evolution, many organisms have recruited copious xenobiotic degraders as a means to defend themselves against the vast range of toxins and foreign material that threaten the host. As such, the last 120 million years has resulted in an explosion in the number of FMOs in mammals with humans possessing five different isoforms, FMOs 1-5, and six pseudo genes. Extensive research has illustrated that these systems are distributed throughout the body, convey broad substrate scopes and are canonical Class B Flavin-dependent monooxygenases, accommodating a paired-Rossmann fold motif that requires cofactors Flavin adenine dinucleotide (FAD) and reduced equivalents of Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) for activity.

Intriguingly, these enzymes oxidize a plethora of pharmaceuticals, making them of great interest in the pharmaceutical sector and drug-design. However, hitherto structural information regarding these systems remained bereft and represented a significant hurdle in the field of research. Using Ancestral Sequence Reconstruction (ASR), we sought out to expand our evolutionary understanding of the FMOs: delineating the emergence of the different isoforms throughout the Gnathostomata (jawed vertebrates) and gaining a deeper appreciation into the various substrate profiles that formed within different isoforms. Additionally, with several articles documenting the thermostability enhancement associated with ASR, we exploited this technique with the hope of generating more thermostable FMOs that may possess a greater tendency to crystallize.

Our Argentinian collaborator, Dr. Maria Laura Mascotti, reconstructed four FMO ancestral sequences that represent the mammalian ancestors of FMOs 1, 2, 3 and 6 collectively (FMO6 being a pseudo gene), and 5, denoted as AncFMO1, AncFMO2, AncFMO3-6 and AncFMO5, respectively. We were able to successfully clone and express each of the proteins in *E. coli* and furthermore, purify them and measure enzymatic activity. Remarkably, each of the four constructs were successfully crystallized and conveyed resolutions from 2.7-3.2 Å, respectively. Among the family of FMOs there were many conserved features integral

for function including: a paired-Rossman fold motif accommodating FAD and NADPH molecules, a large C-terminal helix that drills into the membrane and a large unprecedented 80-residue length insertion that facilitates membrane binding and orchestrates substrate transit.

Each AncFMO isoform possessed a well conserved active site core with a key tunnel that was orientated towards the membrane for substrate passage. Intriguingly however, each of the enzymes possessed minor residue discrepancies that resulted in the formation of different substrate tunnels and routes. Despite their almost identical active sites, these new passages likely justify the different substrate profiles exhibited by each isoform as they dictate and govern which substrates can gain access to the active site. However, close inspection of these tunnels alone could not rationalise the preferences each enzyme has for different substrates. Nevertheless, the structural information was able to portray the key residues in the active site that are imperative for activity and the stabilization of the various Flavin intermediates that are well conserved among bacteria and fungi.

Furthermore, these structures have provided key insights into how the Baeyer-Villiger activity may have developed in FMO5. A key switch between a Histidine and a Glutamate residue, lying on the periphery of the active site, may represent one of the key changes that promoted the partitioning of the underlining activities. Incorporating the Histidine residue into other Ancestral isoforms did indeed promote Baeyer-Villiger monooxygenation, whilst adding the Glutamate residue in the FMO5 isoform abolished activity, implying that a series of residues are required to promote activity and that epistasis plays an integral role that dictates the switch.

To evaluate the evolutionary emergence of the differing enzymatic activities, in-depth phylogenetic analysis of the FMO family was conducted on vertebrates. We were able to document that, in line with previous findings, FMO5 was the first FMO to appear after a gene duplication, whilst the other gene product then underwent multiple gene duplication events that produced first FMO4, then FMO2, FMO1 and FMO3, with FMO3 then undergoing a mammalian-specific gene duplication to produce FMO6. Using this phylogenetic tree, we performed ancestral sequence reconstruction and generated several different FMO ancestral states that can now be evaluated biochemically and structurally. This will allow us to pinpoint the key residues needed to change their respective mode of actions and also demonstrate whether the first FMO was exhibiting canonical FMO or BVMO activity.

Bibliografia

1. Bailleul G, Callum RN, Mascotti ML, Mattevi A, Fraaije MW. Ancestral reconstruction of mammalian FMO1 enables structural determination, revealing unique features that explain its catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 2021; 296: 100221-100228.
2. Cashman JR. Some distinctions between flavin-containing and cytochrome P450 monooxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 338: 599-604.



3. Cruciani G, et al. Flavin monooxygenase metabolism: Why medicinal chemists should matter. *J. Med. Chem.* 2014; 57: 6183-6196.
4. Dolphin CT, Janmohamed A, Smith RL, Shephard EA, Phillips IR. Missense mutation in flavin-containing mono-oxygenase 3 gene, FMO3, underlies fish-odour syndrome. *Nat. Genet.* 1997; 17: 491-494.
5. Dolphin CT, Janmohamed A, Smith RL, Shephard EA, Phillips IR. Compound heterozygosity for missense mutations in the flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) gene in patients with fish-odour syndrome. *Pharmacogenetics.* 2000; 10: 799-807.
6. Fiorentini F, et al. Baeyer-Villiger Monooxygenase FMO5 as Entry Point in Drug Metabolism. *ACS Chem. Biol.* 2017; 12: 2379-2387.
7. Hernandez D, et al. Trimethylaminuria and a human FMO3 mutation database. *Hum. Mutat.* 2003; 22: 209-213.
8. Jakoby WB, Ziegler DM. The enzymes of detoxication. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 20715-20718.
9. Krueger SK, Williams DE. Mammalian flavin-containing monooxygenases: Structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* 2005; 106: 357-387.
10. Nicoll CR, Bailleul G, Fiorentini F, Mascotti ML, Fraaije MW, Mattevi A. Ancestral sequence reconstruction unveils the structural basis of function in mammalian FMOs. *Nature Struct. Mol. Biol.* 2020; 27: 14-24.
11. Phillips IR, Shephard EA. Flavin-containing monooxygenases: mutations, disease and drug response. *Trends Pharmacol. Sci.* 2008; 29: 294-301.
12. Veeravalli S, et al. Effect of flavin-containing monooxygenase genotype, mouse strain, and gender on trimethylamine N-oxide production, plasma cholesterol concentration, and an index of atherosclerosis. *Drug Metab. Dispos.* 2018; 46: 20-25.
13. Ziegler DM. Flavin-containing monooxygenases: enzymes adapted for multisubstrate specificity. *Trends Pharmacol. Sci.* 1990; 11: 321-324.

Editing del genoma e sviluppo di nuove potenziali strategie terapeutiche per il sistema nervoso

Filippo Casoni

Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

Jesse Gelsinger era un giovane volontario di un clinical trial volto a valutare l'efficacia di una nuova strategia di terapia genica, allo scopo di curare la malattia di cui era affetto in forma molto lieve. Il giovane tuttavia morì, più di 20 anni fa, in seguito ad una devastante risposta immunitaria al vettore virale utilizzato per trasportare il gene necessario a curare la sua malattia (1). Negli anni successivi a questo tragico evento l'opinione pubblica si è mobilitata contro la terapia genica, vi sono state alcune riforme normative e anche all'interno della comunità scientifica si sono formati schieramenti più o meno scettici nei confronti di questa rivoluzionaria forma di cura. Il lavoro scientifico nel settore continuò, e furono sviluppate strategie capaci di rendere questo tipo di terapia molto più sicura e limitare perciò, tra gli altri possibili eventi avversi, l'attivazione della risposta immunitaria indotte da vettori virali, che in definitiva tolsero la vita a Jesse.

La terapia genica è una complessa tecnica molecolare che permette di cambiare, correggere o rimuovere un gene o una porzione di un gene che causa un problema medico.

Vi sono stati notevoli progressi nello sviluppo delle due componenti chiave della terapia genica:

- lo strumento molecolare che permette di correggere il DNA o l'RNA che porta l'alterazione causa di malattia;
- il sistema che permettere di “trasportare” lo strumento di correzione alle cellule che la necessitano in maniera mirata, precisa e sicura (2).

Il successo dello sviluppo di un medicinale si basa su:

- l'identificazione del bersaglio;
- sul corretto sviluppo dell'intervento che intende modificare la malattia;
- l'utilizzo di un efficace meccanismo di trasporto del farmaco al bersaglio stesso; e le terapie geniche non fanno eccezione a queste regole fondamentali.

Una delle proprietà che definiscono una terapia genica è proprio la capacità di “trasportare” diversi tipi di strumenti molecolari capaci di modificare il gene bersaglio. I metodi di trasporto sono oggi diversi e numerosi (2), ma diversi studi hanno dimostrato che lo strumento più efficace per tentare di correggere e curare malattie del sistema nervoso centrale sono gli Adeno Virus Associati (AAV) (3, 4).

Molte malattie umane sono piuttosto complesse e la componente ambientale

può giocare un ruolo importante. Vi sono, altresì, molte malattie che originano da mutazioni a carico di un singolo gene. Il sequenziamento genico delle famiglie colpite da queste malattie hanno fornito informazioni preziose circa le mutazioni che causano i disordini e la correlazione con il genotipo e la severità della malattia stessa. La correzione di un singolo gene responsabile della malattia è la tipica visione della terapia genica, tuttavia la sua efficacia rimane ancora fortemente limitata in malattie più complesse o le cui cause sono ancora in gran parte sconosciute, quali molte malattie neurologiche. Nonostante le basi molecolari di molte malattie neurologiche siano scarsamente conosciute, quasi tutte le strategie terapeutiche si focalizzano su un singolo bersaglio, come, per esempio, le strategie rivolte a curare il morbo di Alzheimer, che vedono come bersaglio le proteine β -amiloide o la proteina Tau (5) o il Parkinson (6). Queste strategie non possono essere definite cure, tuttavia sono in grado di alleviare i sintomi e migliorare la qualità della vita dei pazienti per molti anni.

Modulando i livelli genici o proteici, o altre proprietà fisiologiche delle proteine endogene, le terapie a base genica vengono applicate a malattie neurodegenerative sporadiche.

Tuttavia, bisogna considerare i possibili effetti indesiderati di questo tipo di terapie, che se da una parte possono portare vantaggi terapeutici rivoluzionari, dall'altra possono causare anche rischi importanti. Sono da valutare con cautela e con estrema attenzione i possibili effetti "off target", ovvero quelle correzioni che il tool molecolare scelto, quale per esempio CRISPR-Cas9, possono effettuare su sequenze geniche sane, causando così l'insorgenza di diverse malattie quali per esempio il cancro (7-9). L'attenta considerazione del rischio-beneficio di ogni singolo intervento sarà quindi necessaria per verificare la loro applicazione in clinica, come per altro già avviene con altri interventi relativamente permanenti come le procedure chirurgiche.

Una dei vantaggi più importanti della terapia genica è che una volta installate le modifiche genomiche nel DNA, queste saranno irreversibili, in particolare nei neuroni post-mitotici (10) (11). Questo tipo di approccio, quindi, può rendere la somministrazione di queste terapie definitiva ed una singola dose dovrebbe idealmente essere sufficiente a correggere il difetto genetico, assicurando quindi una cura del paziente.

Tra i maggiori ostacoli alle cure delle malattie che colpiscono il sistema nervoso è proprio il poter raggiungere in maniera efficace e specifica i neuroni malati. Il sistema nervoso, infatti, è completamente isolato da una barriera naturale chiamata barriera ematoencefalica (BEE). Essa è costituita da cellule endoteliali di derivazione mesodermale altamente specializzate, che vanno a formare un epitelio pavimentoso squamoso costituendo una parete di capillari non fenestrati. Queste cellule possiedono delle "tight junction" o giunzioni occludenti estremamente forti ed impermeabili, probabilmente perché le proteine che le compongono, quali ZO-1, ZO-2, le Claudine e molte altre, hanno delle connessioni uniche con adattatori citoplasmatici (12-14).

Molte compagnie farmaceutiche hanno ridotto negli anni i finanziamenti per la ricerca farmaceutica delle malattie neurodegenerative proprio per la difficoltà



di penetrare questa BBE, che tuttavia rimane un ostacolo anche per molti vettori adenovirali utilizzati per la terapia genica. Recenti studi hanno dimostrato che nuove generazioni di AAV, in particolare l'AAV9, almeno in alcuni ceppi di topo sembrano essere in grado di infettare il sistema nervoso centrale passando la barriera emato-encefalica (15, 16).

Un altro ostacolo alla possibile efficacia di questo tipo di terapie sulle malattie del sistema nervoso nasce proprio dalla complessità del sistema nervoso stesso. Vi sono infatti malattie che colpiscono specifiche cellule neuronali o specifici distretti nervosi, come per esempio l'Atrofia Muscolare Spinale (AMS) o la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) (16-18). La specificità di queste malattie, le rende un bersaglio relativamente semplice per le strategie di terapia genica attualmente conosciute. Vi sono altri tipi di patologie che causano danni a livello globale e sistemico, che rappresentano una sfida molto più complessa e dove il tipo di strategia per le terapie geniche è molto più difficile da sviluppare, come, per esempio, malattie del neurosviluppo quali la sindrome di Angelman o l'autismo e disordini dello spettro autistico (19, 20).

Bibliografia

1. Somanathan S, Calcedo R, Wilson JM, Adenovirus-Antibody Complexes Contributed to Lethal Systemic Inflammation in a Gene Therapy Trial. *Mol Ther.* 2020; 28: 784-793.
2. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature.* 2020; 578: 229-236.
3. Sun J, Roy S. Gene-based therapies for neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci.* 2021; 24: 297-311.
4. Weinberg MS, Samulski RJ, McCown TJ. Adeno-associated virus (AAV) gene therapy for neurological disease. *Neuropharmacology.* 2013; 69: 82-88.
5. Hudry E, Vandenberghe LH. Therapeutic AAV Gene Transfer to the Nervous System: A Clinical Reality. *Neuron.* 2019; 102: 263.
6. Ntetsika T, Papathoma PE, Markaki I. Novel targeted therapies for Parkinson's disease. *Mol Med.* 2021; 27: 17.
7. Salsman J, Dellaire G. Precision genome editing in the CRISPR era. *Biochem Cell Biol.* 2017; 95: 187-201.
8. Grunewald J, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. *Nature.* 2019; 569: 433-437.
9. Zuo E, et al. A rationally engineered cytosine base editor retains high on-target activity while reducing both DNA and RNA off-target effects. *Nat Methods.* 2020; 17: 600-604.
10. Shin JW, et al. Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet.* 2016; 25: 4566-4576.
11. Zhou M. et al. Seamless Genetic Conversion of SMN2 to SMN1 via CRISPR/Cpf1 and Single-Stranded Oligodeoxynucleotides in Spinal Muscular Atrophy Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Hum Gene Ther.* 2018; 29: 1252-1263.



12. Daneman R, et al. The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One*. 2010; 5: e13741.
13. Daneman R, et al. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*. 2010; 468: 562-566.
14. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015; 7: a020412.
15. Zincarelli C, et al. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther*. 2008; 16: 1073-80.
16. Mendell JR, et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*. 2017; 377: 1713-1722.
17. Al-Zaidy S, et al. Health outcomes in spinal muscular atrophy type 1 following AVXS-101 gene replacement therapy. *Pediatr Pulmonol*. 2019; 54: 179-185.
18. Foust KD, et al. Therapeutic AAV9-mediated suppression of mutant SOD1 slows disease progression and extends survival in models of inherited ALS. *Mol Ther*. 2013; 21: 2148-2159.
19. Schmid RS, et al. CRISPR/Cas9 directed to the Ube3a antisense transcript improves Angelman syndrome phenotype in mice. *J Clin Invest*. 2021; 131 (5).
20. Jin X, et al. In vivo Perturb-Seq reveals neuronal and glial abnormalities associated with autism risk genes. *Science*. 2020; 370 (6520).

Who treats patients, doctors or genetics?

Giuseppe Remuzzi

Direttore Scientifico, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, Milano

Adopting personalised medicine approaches in healthcare requires moving practices towards close integration between clinical and genetic data, as treatment options become more diversified and complex, and the amount of information to process to support decision-making increases.

Primary Membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN) is an excellent example of a prototypical disease for which an approach based on personalised medicine is strongly needed. I will use the results of the study on MPGN to answer the question of whether it is doctors or genetics that play a major role in the patient's treatment. Let's start with some definitions: MPGN encompasses a group of rare (immune-complex-mediated MPGN, IC-MPGN, and C3 glomerulonephritis, C3GN) and ultrarare (dense deposit disease, DDD) diseases. MPGN is caused by hyperactivation of the complement system, an important component of the immune response to infections, due to genetic and acquired abnormalities in complement components and regulators. Consequently, complement activation products deposit in kidney glomeruli, promoting inflammation and damage that result in loss of blood and protein in the urine and the progressive deterioration of renal function.

There is no specific cure for MPGN. Drugs that are currently used in other immune-mediated renal diseases, such as corticosteroids and immunosuppressants, are frequently ineffective and burden patients with severe side effects. Thus, about half of patients, mostly children, develop end-stage renal disease and need dialysis within 10 years of onset. Currently the only possible alternative to dialysis is to undergo a renal transplant. This requires life-long immunosuppressive therapies, which however do not prevent the risk of disease recurrence on the graft, which occurs in about 70% of cases.

The recent success of treating other complement-mediated rare diseases, such as atypical haemolytic uremic syndrome and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria, with the anti-C5 monoclonal antibody eculizumab has opened new therapeutic perspectives and boosted the pharmaceutical industry's interest in the clinical development of several inhibitors that target different molecules of the complement cascade.

We recently completed a phase 2 pilot prospective study with eculizumab involving 10 patients with IC-MPGN or C3GN with severe proteinuria. However, the response was variable and only 30% of patients achieved partial remission. These results may reflect the fact that these diseases are complex and different patients have abnormal activation at different levels of the complement cascade.

There is an urgent clinical need to precisely characterise the underlying pathogenetic mechanisms in each patient to identify the target molecule within the complex complement cascade and a suitable inhibitor from among those in the clinical pipeline. The current classification of MPGN into IC-MPGN, C3GN and DDD, based on composition and ultrastructural localisation, and the appearance of glomerular deposits, failed to identify groups of patients with common underlying causes. Through sophisticated cluster analyses and by integrating histological, genetic, biochemical and clinical data from 173 patients with IC-MPGN/C3GN and DDD, we identified 4 homogeneous groups of patients with specific complement activation profiles, histological alterations and clinical features. Clusters 1 and 2 include patients with fluid-phase alternative pathway of complement activation at both the C3 and C5 levels. Cluster 2 includes patients with the additional activation of the classical pathway with glomerular deposits of IgG and C1q. Patients in cluster 3 have fluid-phase activation of the alternative pathway, mainly at the C3 level. Finally, cluster 4 is characterised by solid-phase restricted complement activation with intense glomerular C3 deposits, with a normal complement profile in the blood. Complement gene mutations and/or acquired abnormalities were identified frequently in clusters 1-3 and rarely in cluster 4. Most importantly, patients in cluster 4 had the highest risk of end-stage renal disease during follow-up, which demonstrates that clusters, identified using parameters measured at onset, may have prognostic relevance. These results provide the basis for a new method of classification, more accurate prognosis and the development of targeted therapies, with the goal of managing each patient with personalised therapy by targeting their individual complement abnormality.

Using genome editing to investigate the regulation of autophagy

Robin Ketteler

MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London, Gower Street, London, United Kingdom

Autophagy is a cellular stress response that is tightly regulated by the controlled activity of AuTophagy (ATG) genes. A key step in the formation of an autophagosome is the conjugation of LC3/GABARAP proteins to phosphatidyl-ethanolamine on the membrane of autophagosomes to allow cargo selection and fusion with the lysosome. LC3/GABARAPs undergo two processing steps, the proteolytic cleavage of pro-LC3 and the de-lipidation of LC3-PE from autophagosomes, both executed by cysteine proteases of the ATG4 family.

We hypothesized that ATG4B activity is regulated by post-translational modifications. In order to identify regulators of ATG4B activity, we performed functional genomics screening using cDNA, siRNA and CRISPR/guideRNA libraries targeting the human kinome. We identified that the autophagy kinase ULK1 can bind to and phosphorylate ATG4B, leading to phosphorylation of Serine 316 in proximity to the active substrate recognition site. Phosphorylation at this residue results in inhibition of its catalytic activity *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, phosphatase PP2A-PP2R3B can remove this inhibitory phosphorylation. We propose that the opposing activities of ULK1-mediated phosphorylation and PP2A-mediated de-phosphorylation provide a phospho-switch that regulates the cellular activity of ATG4B to control LC3 processing and de-lipidation.

Next, we investigated the role of the four ATG4 isoforms (ATG4A-D) with regards to LC3/GABARAP processing. We generated HeLa knockout cells by CRISPR/Cas9 genome editing and investigated the redundancy of ATG4 family members in autophagy. Cells lacking ATG4B exhibit a severe but incomplete defect in LC3/GABARAP processing and autophagy. By further genetic depletion of ATG4 isoforms we uncover that ATG4A, ATG4C and ATGD all contribute to residual proteolytic activity, which is sufficient to enable lipidation of GABARAP1 on autophagosomes. Furthermore, we demonstrate that protein conjugates tagged with LC3/GABARAP accumulate in ATG4 knockout cells, which constitutes a novel type of ubiquitin-like post-translational modification of proteins.

Biography

Prof. Dr. Robin Ketteler

Is Professor of Translational Cell Biology and the manager of the High-Content Screening Core Facility at the Laboratory for Molecular Cell Biology (LMCB), University College London. Dr. Ketteler has been recognized as a leader in autophagy, high-content biology and CRISPR genome editing by invitations to international conferences, >60 publications in peer-reviewed journals (including Nature Communications, Nature Reviews Drug Discovery, Cancer Cell and Nature Chemical Biology). Prof. Dr. Ketteler is member of The Royal Society Newton Fellowship grant review panel, the BBSRC Pool of Experts grant panel. Further, he has been advisor to industry partners including Eisai Co Ltd., Samsara Therapeutics, DSC Inc. and AstraZeneca. Prof. Dr. Ketteler was involved in collaborations with Merck/Sigma and ThermoFisher Scientific to develop arrayed CRISPR/Cas9 screening technology and a collaboration with PerkinElmer to develop super-resolution high-content screening platforms (with previous funding from BBSRC). In recognition for his contributions, Prof. Ketteler has been awarded the 2014 Award for Outstanding Contribution from Spandidos Publications (Athens, Greece) and the UCL Dragons Den Award in 2018. Dr. Ketteler has been studying the regulation of autophagy for over 10 years.

Key contributions were the development of cell-based ATG4B activity sensors (Ketteler & Seed, 2008; Ketteler et al., 2008), autophagy gene profiling in cancer (Costa et al., 2016), the regulation of ATG4B activity by redox mechanisms (Heintze et al., 2016), the regulation of ATG4B activity by protein kinases (Pengo et al. Nature Comm 2017) and investigations into the redundancy of mammalian ATG4 family members in autophagy (Agrotis et al. Autophagy 2019; J Biol Chem 2019).

Prof. Ketteler will present novel insights into the regulation of autophagy by CRISPR/Cas9 genome editing at the Advanced Training course “Genome Editing and Genomic Medicine”.



Da conoscenza zero alla Precision Medicine: l'impatto della Genetica nella Sindrome del QT lungo

Peter J. Schwartz

Istituto Auxologico Italiano, IRCCS - Centro per lo Studio e la Cura delle Aritmie Cardiache di Origine Genetica, Milano

Questa lettura coprirà quattro periodi del mio lavoro clinico e di ricerca sulla sindrome del QT lungo (LQTS), partendo dal 1970 e dalla mia prima paziente, finendo poi sulla *Precision Medicine*, con i nostri dati più recenti (1).

Nel primo periodo le conoscenze sulla LQTS erano essenzialmente ... zero. Fu la ricerca sperimentale su cani e gatti a fornire le prime indicazioni sui meccanismi scatenanti le tachiaritmie che di frequente producono la morte improvvisa di questi pazienti, spesso bambini o adolescenti, e ad aprire così le porte alle terapie che ora salvano la vita di quasi tutti loro. Le prime informazioni sulla storia naturale della malattia e sulle risposte alla terapia vennero da contatti personali che si formalizzarono alla fine degli anni '70 nel Registro Internazionale della LQTS (2-6).

Il secondo periodo è quello della identificazione dei geni coinvolti nella LQTS e della nascita delle prime terapie gene-specifiche (7-9).

Il terzo periodo è quello degli studi sui *modifier genes* (10-19).

Il quarto periodo nasce con la scoperta, che ha portato al premio Nobel il giapponese Shinya Yamanaka, della possibilità di trasformare cellule somatiche in cellule pluripotenti indotte (iPS). La metodologia delle iPS e la possibilità di studiare *in vitro*, con le tecniche di elettrofisiologia cellulare, le cellule del cuore dei pazienti – con tutto il loro corredo genetico – ha aperto possibilità inimmaginabili fino a pochi anni fa (20-23).

Toccherò velocemente il secondo e terzo periodo perché sono quelli più noti e le cui pubblicazioni sono familiari a chi si interessa alla LQTS e alle malattie aritmogene di origine genetica. Mi soffermerò più a lungo sul primo periodo mostrando documenti e raccontando eventi noti a pochi e di potenziale particolare interesse per giovani ricercatori, e poi sul quarto perché questa fase – più complessa – è quella che sta aprendo nuove ed eccitanti possibilità sia per la comprensione scientifica della malattia sia per una migliore e più personalizzata cura dei nostri pazienti (24).

Bibliografia

1. Schwartz PJ. 1970-2020: 50 years of research on the Long QT Syndrome. From almost zero knowledge to precision medicine. *Eur Heart J.* 2020 Oct

- 15: ehaa769. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa769. Online ahead of print. PMID: 33057695.
2. Schwartz PJ, Malliani A. Electrical alternation of the T wave: Clinical and experimental evidence of its relationship with the sympathetic nervous system and with the long QT syndrome. *Am Heart J.* 1975; 89: 45-50.
 3. Schwartz PJ, Periti M, Malliani A. The long QT syndrome. *Am Heart J.* 1975; 89: 378-390.
 4. Moss AJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Locati E, Carleen E. The long QT syndrome: A prospective international study. *Circulation.* 1985; 71: 17-21.
 5. Moss AJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Tzivoni D, Locati EH, MacCluer J, Hall WJ, Weitkamp L, Vincent GM, Garson A Jr, Robinson JL, Benhorin J, Choi S. The long QT syndrome: prospective longitudinal study of 328 families. *Circulation.* 1991; 84: 1136-1144.
 6. Moss AJ, Schwartz PJ. 25th Anniversary of the international Long QT Syndrome Registry: an ongoing quest to uncover the secrets of LQTS. *Circulation-* 2005; 111: 1199-1201.
 7. Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. *SCN5A* mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell.* 1995; 80: 805-811.
 8. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincen GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: *HERG* mutations cause long QT syndrome. *Cell.* 1995; 80: 795-803.
 9. Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, Van Raay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Towbin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT. Positional cloning of a novel potassium channel gene: *KVLQT1* mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet.* 1996; 12: 17-23.
 10. Schwartz PJ, Priori SG, Locati EH, Napolitano C, Cantù F, Towbin AJ, Keating MT, Hammoude H, Brown AM, Chen LK, Colatsky TJ. Long QT syndrome patients with mutations of the *SCN5A* and *HERG* genes have differential responses to Na⁺ channel blockade and to increases in heart rate. Implications for gene-specific therapy. *Circulation.* 1995; 92: 3381-3386.
 11. Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R, Napolitano C, Antzelevitch C, Stramba-Badiale M, Richard TA, Berti MR, Bloise R: A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long QT syndrome. *N Engl J Med.* 2000; 343: 262-267.
 12. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AAM, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R. Genotype-phenotype correlation in the long QT syndrome. Gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation.* 2001; 103: 89-95.
 13. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, Vicentini A, Spazzolini C, Nastoli J, Bottelli G, Folli R, Cappelletti D: Risk

- stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med*. 2003; 348: 1866-1874.
14. Crotti L, Lundquist AL, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C, De Ferrari GM, Vicentini A, Yang P, Roden DM, George AL Jr, Schwartz PJ: KCNH2-K897T is a genetic modifier of latent congenital long QT syndrome. *Circulation*. 2005; 112: 1251-1258. Corrections *Circulation*. 2005; 112: e295.
 15. Crotti L, Spazzolini C, Schwartz PJ, Shimizu W, Denjoy I, Schulze-Bahr E, Zaklyazminskaya EV, Swan H, Ackerman MJ, Moss AJ, Wilde AA, Horie M, Brink PA, Insolia R, De Ferrari GM, Crimi G. The common Long QT Syndrome mutation KCNQ1/A341V causes unusually severe clinical manifestations in patients with different ethnic backgrounds: toward a mutation-specific risk stratification. *Circulation*. 2007; 116: 2366-2375.
 16. Crotti L, Monti MC, Insolia R, Peljto A, Goosen A, Brink PA, Greenberg DA, Schwartz PJ, George AL Jr. NOS1AP is a genetic modifier of the long-QT syndrome. *Circulation*. 2009; 120: 1657-1663.
 17. Duchatelet S, Crotti L, Peat R, Denjoy I, Itoh H, Berthet M, Ohno S, Fressart V, Monti MC, Crocarno C, Pedrazzini M, Dagradi F, Vicentini A, Klug D, Brink PA, Goosen A, Swan H, Toivonen L, Lahtinen A, Kontula K, Shimizu W, Horie M, George AL, Tréguët DA, Guicheney P, Schwartz PJ. Identification of a KCNQ1 polymorphism acting as a protective modifier against arrhythmic risk in the long QT syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013; 6: 354-361.
 18. de Villiers CP, van der Merwe L, Crotti L, Goosen A, George AL Jr., Schwartz PJ, Brink PA, Moolman-Smook JC, Corfield VA. AKAP9 is a genetic modifier of congenital long-QT syndrome type 1. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014; 7: 599-606.
 19. Schwartz PJ, Crotti L, George AL Jr: Modifier genes for sudden cardiac death. *Eur Heart J*. 2018; 39: 3925-3931.
 20. Mehta A, Ramachandra CJA, Singh P, Chitre A, Lua C-H, Mura M, Crotti L, Wong P, Schwartz PJ, Gneccchi M, Shim W. Identification of a targeted and testable antiarrhythmic therapy for LQT2 using a patient-specific cellular model. *Eur Heart J*. 2018; 39: 1446-1455.
 21. Schwartz PJ, Gneccchi M, Dagradi F, Castelletti S, Parati G, Spazzolini C, Sala L, Crotti L. From patient-specific induced pluripotent stem cells to clinical translation in long QT syndrome type 2. *Eur Heart J*. 2019; 40: 1832-1836.
 22. Sala L, Gneccchi M, Schwartz PJ. Long QT Syndrome modelling with cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Arrhythm Electrophysiol Rev*. 2019; 8: 105-110.
 23. Lee YK, Sala L, Mura M, Rocchetti M, Pedrazzini M, Ran K, Mak T, Crotti L, Sham PC, Wu JC, Zaza A, Schwartz PJ, Tse HF, Gneccchi M. MTMR4 SNPs modulate ion channel degradation and clinical severity in congenital Long QT Syndrome: insights in the mechanism of action of protective modifier genes. *Cardiovasc Res*. 2020; 16: cvaa019.
 24. Gneccchi M, Sala L, Schwartz PJ. Precision medicine and cardiac channelopathies: when dreams meet reality. *Eur Heart J*. doi: 10.1093/eurheartj/ehab007 (In press).

Dalla Genetica Mendeliana al Genetic Risk Score verso una medicina di precisione

Nicola Marziliano

Dipartimento di Medicina e di Scienze della Salute “Vincenzo Tiberio”, Università degli Studi del Molise, Campobasso

Abstract

La generazione di dati sulla variazione dell'intero genoma mediante tecniche quali il Whole Genome Sequencing (WGS) pone un problema potenziale per l'interpretazione e l'applicazione di questi dati soprattutto per fini clinici e terapeutici. Per molte malattie sia monofattoriali che complesse ora sono in studio dei modelli che combinano il rischio dei varianti associato ai singoli loci di “rischio” (locus risk) in modo da convertire in maniera intuitiva (ma con significatività statistica) i dati genetici in una misura predittiva della suscettibilità alla malattia: il cosiddetto Risk Score genetico. Durante l'esposizione verranno trattati alcuni campi applicativi di tale approccio innovativo.

Definizione

Un punteggio di rischio genetico (Genetic Risk Score o GRS) è una stima del contributo cumulativo di fattori genetici per un evento-specifico di interesse del paziente (es infarto del miocardio) che tiene conto degli alleli di rischio noti. I singoli alleli sono pesati per l'effetto con cui contribuiscono al fenotipo e per la loro frequenza allelica nella popolazione. Vengono generate delle curve ROC (Receiver Operating Characteristic; le classiche curve decisionali per classificatori binari) in cui la misura dell'area sotto la curva (AUC) rappresenta la capacità predittiva generata in base a punteggi di rischio genetico per un campione di individui.

I Punteggi di Rischio Genetico (GRS)

Lo scopo dei punteggi di rischio è duplice:

- 1) prevedere la probabilità che un individuo sviluppi una malattia (o un particolare aspetto di questa) in base alla quantità disponibile di informazioni, generalmente genetiche, cliniche, demografiche, o una combinazione di tutte queste e
- 2) per stimare il livello di potere predittivo per ciascuna variante associata al rischio.

L'approccio più comune per valutare l'effetto cumulativo di molti fattori genetici con piccolo effetto sul fenotipo è per mezzo di punteggi di rischio genetico (GRS).

Un GRS può stimare il rischio complessivo per persona di sviluppare un risultato di interesse in base all'assetto genotipico di ciascuna variante che. Perché la genetica di un individuo è fissata alla nascita e, quindi, il rischio di malattia teoricamente potrebbe essere determinato prima delle esposizioni ambientali è stata riposta una grande speranza nello sviluppare questi modelli come un avanzamento della medicina di precisione. Tuttavia, per molte malattie complesse o multifattoriali è tutt'ora in discussione l'utilizzo di questo approccio per l'uso clinico. La storia familiare è generalmente di aiuto per il rischio genetico poiché riflette la genetica condivisa tra gli individui di una stessa famiglia indipendentemente dai fattori ambientali e quindi è incorporata nella storia clinica - quando possibile - per malattie genetiche monofattoriali o mendeliane semplici. Il potere della storia familiare è limitato dalle dimensioni della famiglia, dalla prevalenza della malattia, dalle informazioni disponibili presso i parenti; inoltre una storia familiare positiva riflette un certo livello di rischio di malattia, mentre una negatività per storia familiare non implica il contrario. Un obiettivo di implementazione per il GRS consiste nel migliorare questi fattori per una valutazione più completa e accurata del rischio di malattia oltre quello che la storia familiare può fare. Il GRS consente la valutazione dei contributi da molteplici fattori allo sviluppo della malattia, alla sua progressione e risposta al trattamento farmacologico/terapeutico. Il GRS può essere basato esclusivamente su dati genetici disponibili o può incorporare varianti ambientale, fenotipiche e/o demografiche.

Come esempio verrà trattato l'utilizzo del GRS nelle malattie cardiovascolari ed in particolare nella cardiopatia ischemica. In particolare verrà, mostrato come gli effetti cumulativi delle varianti genetiche comuni associate a colesterolo totale (TC), colesterolo LDL (LDL-C), colesterolo HDL (HDL-C) e trigliceridi (TG) sono associate a esiti subclinici, come la placca carotidea. I punteggi di rischio genetico per TC e LDL-C sono anche associati all'incidenza della malattia coronarica (CHD). Sebbene i punteggi di rischio genetico non abbiano migliorato le AUC dal punto di vista clinico, numerosi studi forniscono prove del valore aggiunto dei punteggi di rischio genetico per la stadiazione di casi subclinici e CHD. Con l'aumentare della nostra conoscenza sull'effetto delle varianti genetiche e degli strumenti di analisi genetiche, la traslazione dei GRS a livello clinico nel breve periodo per la previsione e la prevenzione di eventi clinici e senza dubbio nella dimensione di un futuro già attuale.

Bibliografia

1. Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, et al. ENGAGE Consortium. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet.* 2009; 41: 47-55.
2. Beck T, Hastings RK, Gollapudi S, Free RC, Brookes AJ. GWAS Central: A comprehensive resource for the comparison and interrogation of genome-wide association studies. *Eur. J. Hum. Genet.* 2014; 22: 949-952.
3. Burdett T, Hall PN, Hastings E, Hindorff LA, Junkins HA, Klemm AK, MacArthur J, Manolio TA, Morales J, Parkinson, H., and Welter, D. 2016. The NHGRI-



- EBI catalog of published genome-wide association studies. <http://www.ebi.ac.uk/gwas/>
4. Bush WS, Haines J. Overview of linkage analysis in complex traits. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2010; 64: 1.9.1-1.9.18.
 5. Bustamante CD, Burchard EG, De la Vega FM. Genomics for the world. *Nature.* 2011; 475: 163-165.
 6. Cooke Bailey JN, Igo RP Jr. Genetic risk scores. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2016; 91: 1.29.1.
 7. Cooke JN, Palmer ND, An SS, Hester JM, Freedman BI, Langefeld CD, Bowden, D.W. 2012. Genetic risk assessment of type 2 diabetes-associated polymorphisms in African Americans. *Diabetes Care.* 35: 287-292.
 8. Patel RS, Marziliano, et al. Subsequent Event Risk in Individuals With Established Coronary Heart Disease. *Circ Genom Precis Med.* 2019; 12: e002470.
 9. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet.* 2008; 40: 161-169.
 10. World Health Organization. Media centre, Fact Sheets: Cardiovascular diseases (CVDs). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>. Accessed August 2012.

Autologous stem-cell-based gene therapy for inherited disorders of hematopoietic system

Marina Cavazzana

Biotherapy Department and Clinical Investigation Center, Assistance Publique Hopitaux de Paris, Inserm, Paris, France, Université de Paris; Institut Imagine, Paris, France

Gene therapy refers to the introduction of nucleic acids (DNA or RNA) into target cells for therapeutic purposes. The objective is to either add a new copy of the “healthy” gene (additive gene therapy) or correct the mutated gene (gene editing). In principle, autologous gene therapy using hematopoietic stem cells (HSCs) as target cells provides an attractive alternative to allogeneic stem cell transplantation, since the gene therapy procedure will not trigger adverse events like graft-vs.-host disease or other immune complications.

Autologous HSC-based gene therapy encompasses and broadens the indications for allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HSCT); in addition to blood-specific diseases [e.g., primary immunodeficiencies (PIDs), hemoglobinopathies, congenital forms of cytopenia, and stem cell defects], metabolic diseases can also benefit from the cross-correction mechanism once the missing or aberrant protein is overproduced by circulating or tissue-resident mature blood cells. In the latter case, gene therapy can potentially work even better than allo-HSCT because the above-physiological levels of therapeutic gene expression can provide an often ubiquitous protein to the affected non-hematopoietic cells and tissues (as for mucopolysaccharidosis and Fabry disease, for example).

Autologous HSC gene therapy leverages more than 30 years of experience in bone marrow manipulation, and basic scientific knowledge about autologous and allo-HSCT, including the ease of isolating HSCs and hematopoietic stem progenitor cells (HSPCs) using CD34+ selection, and the important knowledge that HSCs home easily to their niches after intravenous (re)infusion. A large number of clinical trials have now provided robust evidence of multilineage engraftment and safe, stable transgene expression.

Nevertheless, it remains to be seen whether truly permanent disease correction and long-term safety (i.e., beyond the current 20 years of hindsight) have been achieved. Moreover, the gene therapy approach may be limited by the high costs of vector manufacturing and cell transduction, and/or complex regulatory requirements. Precision approaches (based on gene editing with an endonuclease) are now entering the clinical arena.

During the conference will be underlined the issues and the progress after 30 years of worldwide efforts accomplished.

Genome editing in cellular and animal models of chronic myeloproliferative neoplasms

Vittorio Rosti

Centro per lo Studio e la Cura della Mielofibrosi, Laboratorio di Biochimica, Biotecnologie e Diagnostica Avanzata, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Centro Studio Mielofibrosi; Laboratorio di Biochimica, Biotecnologie e Diagnostica Avanzata; Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms (Ph-neg MPNs) are acquired clonal disorders of the hematopoietic stem/progenitor cells (1). They include polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF). It is known since the '50s that these three diseases are clinically correlated: as it was described by W. Dameshek (2) these diseases share some clinical and laboratory features and the possibility exists that PV and ET can, along their clinical course, transform into myelofibrosis (so called post-PV or post-ET myelofibrosis, or secondary myelofibrosis). This observation was confirmed at the genetic level in the first years of the new century by the finding that patients with PV, ET or PMF share the same acquired mutations of the hematopoietic stem/progenitor cell. In fact, a gain of function, point mutation in the JAK2 gene, a G to T resulting in the substitution of a phenyl alanine with a glutamine at position 617 of the JAK protein (JAK2V617F mutation), is detectable in 95% of patients with PV, and 60% of both patients with ET and PMF (3-6). In addition, 30% of patients with either ET or PMF, who are negative for the JAK2V617F mutation, displays either a deletion of 52 bp or an insertion of 5 bp of the CALR gene (7, 8). Finally, 3-5% of patients with either ET or PMF share a mutation of the MPL gene, which codifies for the receptor of thrombopoietin (9, 10). Thus, this common genetic landscape confirms the Damashek's original clinical observation that the three diseases belong, although with different phenotype, clinical course, and prognosis to the same nosological entity (11). The phenotypic diversity that characterizes MPNs can depend on many factors, such as co-existence of genetic polymorphisms (12), additional acquired mutations (13), variable degrees of disease-associated inflammation (14), and environmental factors (15). On the other side, PV, ET and PMF share during the course of disease a high rate of myeloid cells proliferation, that depends on the presence of the "driver mutations", and mainly, but not exclusively, affects the erythroid lineage in PV (resulting in peripheral erythrocytosis), the megakaryocyte lineage in ET (resulting in peripheral thrombocytosis), and either erythroid, and/or megakaryocyte, and/or leukocyte lineages in PMF (16).

Although recent discoveries of the genetic and epigenetic events that contribute to their onset and development has much increased our knowledge, a full understanding of MPN pathogenesis has not yet been reached. In this regard, most of our current knowledge stems from *in vitro* experiments and from the design of animal models in which the effects deriving from the introduction of the driver mutations have been extensively investigated. Zebrafish and mouse models have been widely used for such investigations. MPN modeling in zebrafish introduced the ortholog of human JAK2V617F mutation, *jak2a* V581F, resulting in a PV-similar phenotype (17). On the other side, when zebrafish expressed *calr* mutants a *mpl*-dependent thrombocytosis occurred (18). Finally, the disruption of the *asxl* gene (which is sometimes mutated, in addition to driver mutations, in MPN patients (13)) resulted in an increased numbers of myelomonocytes (19). These models illustrate that the signaling machinery related to the MPN phenotype is conserved between human and zebrafish and potentially offer the opportunity to gain deep insights in the unique mechanisms underlying MPN. A valuable contribution to the role played by driver mutations, in particular the JAK2V617F mutation, has come also from murine models. Both retroviral transduction, and knock in and transgenic approach were used to generate animals in which the effect on the hematopoietic system of a mutant JAK2 were investigated. In some cases, a co-transduction of V617FJAK2 together with other mutations was used in order to generate mice that could recapitulate the onset and progression of the disease (20). Based on the observation that the JAK2V617F mutation can be detected not only in hematopoietic cells but also in endothelial cells (21), mice expressing the mutation in their vascular endothelium have been generated: these animal models represent powerful tools for understanding the pathological process underpinning the increased risk of thrombotic events that contribute to morbidity and mortality in MPN patients (22).

Besides animal models, *in vitro* experiments that take advantage from induced pluripotent stem cells (iPSCs) contributed to a deeper understanding of the cellular and molecular events underlying the different steps of the pathogenesis of MPNs (23-25). Moreover, advanced genome editing techniques, such as CRISPR/*Cas9*, allow the generation of disease- and clone-specific cell lines that display a genetic identity that perfectly reproduces the genetic landscape of single patients. This approach seems very promising, considering that the efficacy of the CRISPR/*Cas9* technique in targeting the JAK2V617F allele in iPSCs is currently around 80%.²⁶ Such an approach will allow to study *in vitro* not only the pathogenesis of MPNs but also mechanisms of disease progression and the activity and efficacy of new drugs.

Although a great progress in understanding the pathogenesis of MPN has been done in the last 20 years, the molecular mechanisms underlying the onset and the progression of these disease have not been fully elucidated yet. The generation of animal models that can resemble the human disease more precisely, as well as the generation of patient-derived iPSCs and CRISPR/*Cas9* gene editing offer a powerful armamentarium for a deep investigation of these mechanisms, that can result both in the elucidation of the disease pathogenesis and in the designing and testing of new therapeutic approaches.

Bibliografia

1. Skoda R. The genetic basis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007; 1: 1-10.
2. Dameshek W. Some speculations on myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951; 6: 372-375.
3. James C, Ugo V, Le Couedic J, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature*. 2005; 434: 1144-1148.
4. Levine R, Waldleight M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and in myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005; 7: 387-397.
5. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365: 1054-1061.
6. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1779-1790.
7. Klampfl, Gisslinger, Ashot S, et al. Somatic mutations of Calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013; 369: 2379-2390.
8. Nangalja J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *Engl J Med*. 2013; 369: 2391-2405.
9. Pikman J, Lee BH, Merker T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006; 3e: 270.
10. Pardanani AD, Leviine RI, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006; 108: 3472-3476.
11. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017; 129: 667-679.
12. Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram A, et al. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009; 41: 455-459.
13. Vainchenker W. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011; 118: 1723-1735.
14. Heromouet S, Bigot Corbel E, Gardie B. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms: role and mechanisms of chronic inflammation. *Mediat Inflamm*. 2015; 2015: 145293.
15. Zhan H, Kaushanski K. The Hematopoietic Microenvironment in Myeloproliferative Neoplasms: The Interplay Between Nature (Stem Cells) and Nurture (the Niche). *Adv Exp Med Biol*. 2020; 1273: 135-145.
16. Grinfeld J, Nangalia J, Gree A. Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2017; 102: 7-17.
17. Ma, A.; Fan, A.; Ward, A, et al. A novel zebrafish jak2aV581F model shared features of human JAK2V617F polycythemia vera. *Exp. Hematol*. 2009; 37: 1379-1386.
18. Lim K, Chang YC, Chiang YA, et al. Expression of CALR mutants causes mpl-dependent thrombocytosis in zebrafish. *Blood Cancer J*. 2016; 6: e481.

19. Gjini E, Jing C-B, Nguyen A, et al. Disruption of *asx11* results in myeloproliferative neoplasms in zebrafish. *Dis. Models Mech.* 2019; 12: dmm035790.
20. Dunbar A, Nazir, A, Levine R. Overview of Transgenic Mouse Models of Myeloproliferative Neoplasms (MPNs). *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2017; 77: 11-19.
21. Rosti V, Villani L, Riboni R, et al. Spleen endothelial cells from patients with myelofibrosis harbor the JAK2V617F mutation. *Blood.* 2012; 121: 360-368.
22. Falanga A, Marchetti M. Thrombosis in Myeloproliferative Neoplasms. *Semin. Thromb. Hemost.* 2014; 40: 348-358.
23. Tian L, Piterkova L, Wang L, et al. Whole Genome Sequencing of Four CD34+-Derived iPSC Polycythemia Vera Clones from a Single Female. *Blood.* 2012; 120: 1755.24.
24. Saliba J, Hamidi S, Lenglet G, et al. Heterozygous and Homozygous JAK2V617F States Modeled by Induced Pluripotent Stem Cells from Myeloproliferative Neoplasm Patients. *PLoS One* 2013; 8: e74257.
25. Senquan L, Williams D, Moliterno A, Spivak, et al. Generation, Characterization and Genetic Modification of Human iPSCs Containing *Calr*, *MPL* and *JAK2* Mutations Found in MPN Patients. *Blood.* 2016; 128: 3139.
26. Smith C, Abalde-Atristain L, He C, et al. Efficient and Allele-Specific Genome Editing of Disease Loci in Human iPSCs. *Mol. Ther.* 2014; 23: 570-577.

High fidelity nucleases for gene therapy applications

Anna Cereseto

Department CBIO, University of Trento

Genome manipulation in living cells has always been a crucial procedure in biological research and for the development of therapies of genetic diseases. Soon after the discovery of DNA and its structure it became clear that a key step to modify the genome is the generation of DNA double strand breaks (DSB) at sites where the modification has to be introduced (1, 2). As a result of DSB cells respond with two DNA repair mechanisms to prevent cell death: non-homologous end joining (NHEJ) and homology-directed repair (HDR). NHEJ results in variable lengths of insertion and deletion mutations (indels) and thus can be used to knockout genes while HDR produces the introduction of specific sequences, homologous donor templates (either endogenous or exogenous), which recombine with the target locus. Thus while by NHEJ unpredicted modifications are obtained, HDR allows introducing desired modifications (3). Nevertheless, HDR is not an efficient process in mammalian cells generating at best one desired modified cell out of a million (4, 5). A turning point in genome modification technology occurred when experiments using rare-cutting meganucleases (e.g., I-SceI) demonstrated that homologous donor sequences recombine efficiently by inducing DSB at the genomic target site (1, 2). However, even if these experiments represented a major breakthrough for the advancement of genome editing technologies, yet the limited number of I-SceI recognition sites in mammalian DNA severely limited the editing operating space in the genome. Following the discovery of natural nucleases subsequent tools were generated by either engineering nucleases with extended DNA recognition sequences or by developing artificial nucleases mainly Zinc Finger Nucleases (ZFN) (6) and transcription activator-like effector nucleases (TALEN) (7). These targeting DSB - inducing nucleases rely on protein-based systems with customizable DNA - binding specificities thus generating difficulties of protein design and validation with consequent barrier to their widespread acquisition for research use or gene therapy tools development. The discovery of CRISPR systems in microbes followed by the derived technology, produced a major revolution in the biology fields mainly due to the unprecedented simplicity and flexibility owing to its dependence on RNA as the element tethering the nuclease to a desired DNA sequence. The development of CRISPR technology gave the opportunity to easily manipulate genomes of diverse organisms, animal and plants, resulting in a steep increase of genome editing applications using CRISPR

based tools (8). Soon after the initial excitement it became clear that at least two major hurdles would have delayed the transferring of the technology to the clinic for the treatment of genetic diseases:

- 1) specificity of DNA cleavages sites (off-target effects);
- 2) *in vivo* cellular deliverability.

The off - target activity has been analyzed in depth showing that non - specific cleavages at unpredicted sites were not directly correlated with the binding of Cas systems to the substrate DNA. Indeed DNA binding analyzed by CHIP seq analyses is far more promiscuous than DNA cleavage, thus indicating that improved specificity cannot be obtained simply by reducing Cas binding affinity to DNA (9). Crystal structure as well as intramolecular Förster resonance energy transfer (FRET) analyses suggested that rather than affinity to the target DNA the precise cleavage is determined by proper sensing of sgRNA/target by the REC3-Cas9 domain which enables the docking of the catalytic domain, HNH, at the active site¹⁰. Based on this molecular mechanism a proper match between the sgRNA and the target DNA allows conformational change of Cas9 leading to DNA cleavage through the HNH domain; conversely no conformational change and cleavage occur when mismatches are located between the sgRNA and target DNA. This model explains the increased fidelity obtained through rationale designed variants (SpCas9-HF1 (11) and HypaCas9 (10) or through direct evolution approach (evoCas9 (12) where the primary domain modified for increased precision is REC3 upstream to secondary modification leading to catalytic activity. In addition to novel variants with improved fidelity, various approaches have been developed to increase genome editing precision including sgRNA modifications or Cas nickases which work in tandem to generate DSB through recognition of pair sgRNAs to produce genetic modifications. Various studies demonstrated that off-target activity strongly correlate with time and amounts of Cas9 expression in target cells: high concentrations of the nucleases and long-term expression generate more cleavages at non-specific sequences. Accordingly, transient SpCas9 expression,

obtained through direct delivery of Cas9 and single guide RNA (sgRNA) ribonucleoprotein (RNPs) complexes is sufficient to permanently modify the target genomic locus with decreased off-target activity. However, the delivery of RNPs by electroporation is highly inefficient and unsuitable for *in vivo* approaches. So far, the best delivery tools for *in vivo* application are vectors derived from viruses which however are not strictly suitable for CRISPR applications since they generate high and permanent expression of the nuclease. A compromise between the requirement of efficient delivery *in vivo* and transient expression of Cas9 derives from self- limiting systems or pseudoviral delivery tools. Self-limiting systems are designed to switch off Cas9 following its delivery and editing through self-cleavage of the Cas9 element (16, 17). Transient expression is also obtained through pseudoviral systems allowing efficient delivery of the RNP in the absence of an encoding nucleic acids typically used in viral vectors systems (18, 19).

The quick advancement of the technology both in terms of precision and deliverability is increasing the possibility to see clinical results in the near future. Prelim-

inary data emerging from initial clinical applications derive from the treatment of hematopoietic disorders (Sickle cell anemia) and Cancer treatments (CAR-T cells manipulation) showing preliminary absence of adverse events and encouraging results (20). We expect to see more technology development paralleled by clinical advancement in the near future.

Bibliografia

1. Rouet P, Smih F, Jasin M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91: 6064-6068.
2. Lukacsovich T, Yang D, Waldman AS. Repair of a specific double-strand break generated within a mammalian chromosome by yeast endonuclease I-SceI. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 5649-5657.
3. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32: 347-355.
4. Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature.* 1988; 336: 348-352.
5. Capecchi, M. R. Altering the genome by homologous recombination. *Science.* 1989; 244: 1288-1292.
6. Carroll, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics.* 2011; 188: 773-782.
7. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013; 14: 49-55.
8. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.* 2018; 9: 1-13.
9. Wu X, et al. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32: 670-676.
10. Chen JS, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature.* 2017; 550: 407- 410.
11. Kleinstiver BP, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off- target effects. *Nature.* 2016; 529: 490-495.
12. Casini A, et al. A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. *Nat. Biotechnol.* 2018; 36: 265-271.
13. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim J-S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 2014; 24: 1012-1019.
14. Ramakrishna S, et al. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res.* 2014; 24: 1020-1027.
15. Zuris JA, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.* 2015; 33: 73-80.
16. Merienne N, et al. The Self-Inactivating KamiCas9 System for the Editing of CNS Disease Genes. *Cell Rep.* 2017; 20: 2980-2991.

17. Petris G, et al. Hit and go CAS9 delivered through a lentiviral based self-limiting circuit. *Nat. Commun.* 2017; 8: 1-9.
18. Mangeot PE, et al. Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Nat. Commun.* 2019; 10: 1-15.
19. Montagna C, et al. VSV-G-Enveloped Vesicles for Traceless Delivery of CRISPR-Cas9. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2018; 12: 453-462.
20. Stadtmauer EA, et al. CRISPR engineered T-cells in patients with refractory cancer. *Science.* 10.1126/science.aba7365 (2020).



The CRISPR/Cas9 System in Oncology: functional genomics, identification of new therapeutic targets and precision medicine

Gabriele Picco

Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, United Kingdom

The molecular features of a patient's tumour influence clinical responses and can be used to guide therapy, leading to more effective treatments and reduced toxicity (1). However, most patients do not benefit from such targeted therapies in part owing to limited knowledge of candidate targets. Lack of efficacy is a leading cause of the 90% attrition rate in the development of cancer drugs, and fewer molecular entities to new targets are being developed. Unbiased strategies that effectively identify and prioritize targets in tumours could expand the range of targets, improve success rates and accelerate the development of new cancer therapies.

At the Sanger Institute, we are using large-scale systematic approaches to understand how somatic variation in cancer genomes creates therapeutic vulnerabilities and impacts therapy response. Toward this goal, we have developed a pre-clinical eco-system combining, cell model generation, genome analysis, functional perturbation, analytics and detailed mechanistic studies to identify new therapeutic strategies. We have launched the Cancer Dependency Map initiative (<https://depmap.sanger.ac.uk/>) (2), aiming to use large-scale functional genomics in heterogeneous cancer cell models to identify vulnerabilities - so-called dependencies - in every cancer cell. A map of cancer dependencies and the biomarkers that predict them could help accelerate the development of precision cancer medicines.

To create a cancer dependency map, we are using large panels of cancer cell models for genetic and functional studies. This large collection of cancer models to have a representation of different cancer molecular subtypes that occur in patient populations and underpin differential therapy response (3). Our efforts to use genetic screens to identify cancer dependencies and new oncology targets is called Project Score (<https://score.depmap.sanger.ac.uk/>).

CRISPR-Cas9 screens that use libraries of single-guide RNAs (sgRNAs) have been used to study gene function and their role in cellular fitness. To identify new targets, we performed genome-wide CRISPR-Cas9 knockout screens in hundreds of cancer cell lines (4-6). All of the cell lines have been extensively genomically characterized through DNA sequencing and RNA sequencing. We used these

data to uncover gene fusions critical for cancer growth and to identify key cancer genes by developing a systematic approach to nominate and prioritise new oncology targets. We selected over 600 candidate priority targets and identified the Werner syndrome ATP-dependent helicase (WRN) as a target for tumours with microsatellite instability (MSI) (5).

DNA mismatch repair (MMR) is an evolutionarily conserved process involved in recognizing and repairing spontaneously mis-incorporated bases during DNA replication. MMR deficiency results in an inability to repair mis-incorporated bases, the accumulation of errors, and the formation of characteristic repeated sequences of one to six base pairs called microsatellite (MSI) repeats (7). Inherited defects in MMR are implicated in human cancer, such as hereditary nonpolyposis colorectal cancers (HNPCC or Lynch syndrome) (8). In somatic cancers, MSI is a common feature observed in >20 different tumour types, with hundreds of thousands of estimated cancer diagnoses worldwide each year. MSI tumors are sensitive to immunotherapy and the PD-1 inhibitor Keytruda® (pembrolizumab) was recently approved to treat patients with MSI tumours with an overall response rate of 50% (9).

Werner helicase (WRN) encodes one of five members of the RecQ subfamily of DNA helicase proteins, including RECQL1, BLM, WRN, RECQL4 and RECQL5 (10). Defects in WRN are the cause of Werner syndrome, an autosomal recessive disorder characterized by accelerated ageing and an elevated risk for certain cancers (OMIM: 2777000). WRN has essential but poorly understood roles in maintaining genome stability, DNA repair, replication, transcription and telomere maintenance (11).

Using CRISPR-Cas9 genome-wide screens in 324 human cancer cell lines, we showed that WRN is synthetic-lethal in MSI cancers and confirmed that WRN is required to sustain *in vivo* growth of MSI colorectal cancer (CRC) cells. Additionally, we and others demonstrated that WRN inhibition in MSI CRC cell lines induces double-stranded DNA breaks that cause widespread genome instability, promoting apoptosis both *in vitro* and *in vivo* (5, 12). More recently, we demonstrated the efficacy of targeting WRN in an extensive collection of preclinical models of dMMR CRC, including in models of acquired resistance to targeted therapies, chemotherapy and immunotherapy (Picco et al., *Cancer Discovery* 2021, in press). These results collectively establish a previously unrecognized selective dependency on WRN in MSI cancers and create a new opportunity to develop targeted therapies.

A previously unappreciated genetic feature of dMMR/MSI cancer cells, DNA (TA)_n-dinucleotide repeat expansions, has recently been reported to cause selective vulnerability WRN depletion (13). Moreover, MUS81 endonuclease has been proposed to induce toxic chromosome breakage and promote cell death when WRN is depleted from MSI cells. Additional investigations are required to evaluate these findings and TA-repeats length as a robust biomarker of WRN dependency with practical clinical utility. We recently reported that a rare subgroup of dMMR CRC models (~7% of the total) were WRN independent (Picco et al., *Cancer Discovery* 2021, in press). In these outlier cases, functional expression of MSH2 and MLH1

was retained, and TA-repeats were differentially altered compared to MSI WRN dependent lines, suggesting that loss of MSH2 or MLH1 might be of particular importance to generate TA-dinucleotide repeat expansions reported to confer WRN addiction.

Many targeted agents and immunotherapies are approved to treat MSI tumours. Nonetheless, for patients in advanced disease stages or refractory to immunotherapy, the prognosis is poor, and few treatment options are available. In this setting, translational efforts are needed to evaluate WRN inhibition's efficacy as monotherapy or in combination. Moreover, mechanistically, further studies are required to fully elaborate the association between MMR deficiency, TA-dinucleotide repeat expansions and WRN addiction and, more generally, to fully unveil the critical role of WRN in maintaining genomic stability in human cancers.

The identification of the WRN helicase as a therapeutic target for MSI tumors illustrates how functional genomics and genome editing can be used to identify and develop new therapeutic strategies for precision cancer medicine.

Bibliografia

1. Francies HE, McDermott U, Garnett MJ. Genomics-guided pre-clinical development of cancer therapies. *Nature Cancer*. Nature Publishing Group. 2020; 1: 482-92.
2. Boehm JS, Garnett MJ, Adams DJ, Francies HE, Golub TR, Hahn WC, et al. Cancer research needs a better map. *Nature*. 2021; 589: 514-6.
3. Garnett MJ, Edelman EJ, Heidorn SJ, Greenman CD, Dastur A, Lau KW, et al. Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature*. 2012; 483: 570-5.
4. Picco G, Chen ED, Alonso LG, Behan FM, Gonçalves E, Bignell G, et al. Functional linkage of gene fusions to cancer cell fitness assessed by pharmacological and CRISPR-Cas9 screening. *Nat Commun*. 2019; 10: 2198.
5. Behan FM, Iorio F, Picco G, Gonçalves E, Beaver CM, Migliardi G, et al. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens. *Nature*. 2019; 568: 511-6.
6. Gonçalves E, Segura-Cabrera A, Pacini C, Picco G, Behan FM, Jaaks P, et al. Drug mechanism-of-action discovery through the integration of pharmacological and CRISPR screens. *Mol Syst Biol*. 2020; 16: e9405.
7. Kim T-M, Laird PW, Park PJ. The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. *Cell*. 2013; 155: 858-68.
8. Latham A, Srinivasan P, Kemel Y, Shia J, Bandlamudi C, Mandelker D, et al. Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer. *J Clin Oncol*. 2019; 37: 286-95.
9. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015; 372: 2509-20.
10. Brosh RM Jr. DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13: 542-58.



11. Lu H, Davis AJ. Human RecQ Helicases in DNA Double-Strand Break Repair. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 640755.
12. Chan EM, Shibue T, McFarland JM, Gaeta B, Ghandi M, Dumont N, et al. WRN helicase is a synthetic lethal target in microsatellite unstable cancers. *Nature.* 2019; 568: 551-6.
13. van Wietmarschen N, Sridharan S, Nathan WJ, Tubbs A, Chan EM, Callen E, et al. Repeat expansions confer WRN dependence in microsatellite-unstable cancers. *Nature [Internet].* 2020; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2769-8>.



Medicina personalizzata in prevenzione: stato dell'arte negli screening oncologici

Paolo Giorgi Rossi

Servizio di Epidemiologia, AUSL - IRCCS di Reggio Emilia

Nel corso della presentazione:

- verranno presentate le basi teoriche dello screening oncologico;
- verrà introdotto il concetto di personalizzazione dello screening, nella prevenzione del cancro della cervice uterina, del colon retto e della mammella;
- si approfondirà il caso dello screening mammografico, analizzando il ruolo della densità mammografica come fattore di rischio e come modificatore dell'accuratezza del test di screening;
- verranno presentati alcuni studi in corso per la valutazione di efficacia dello screening personalizzato, in particolare il Tailored Breast Screening Trial (TBST) e il My Personalized Screening trial (MyPeBS);
- infine, quanto presentato dovrebbe permettere alcune riflessioni sul legame conoscenza e tecnologia in medicina.

Lo screening è un intervento che mira a ridurre gli effetti sulla salute di una malattia attraverso l'anticipazione della diagnosi, applicando sistematicamente un test a un gruppo di popolazione. Perché uno screening funzioni è necessario che la storia naturale della malattia sia tale per cui una diagnosi precoce possa portare a un reale miglioramento della prognosi, dunque dobbiamo disporre di terapie che siano decisamente più efficaci se somministrate nella fase precoce della malattia; che esista un test, poco invasivo ed accettabile da parte della popolazione sana, in grado di identificare le fasi precoci della malattia senza dare troppi falsi positivi; un programma in grado di assicurare il percorso di approfondimenti ed eventuali trattamenti in modo appropriato e tempestivo.

Anche la presenza di queste tre condizioni non garantisce che uno screening possa portare più benefici che danni. Infatti l'anticipazione diagnostica, anche se in grado di migliorare la prognosi di alcuni casi, non sempre porterà a un beneficio. Infatti attraverso il test di screening potremmo individuare dei tumori, istologicamente maligni, ma che, per le loro caratteristiche (sono indolenti o crescono lentamente e metastatizzano poco o in sedi che non danno sintomi) o per la storia di vita dell'individuo (muore per altre cause prima che il tumore possa dare sintomi), non avrebbero mai dato problemi e dunque non sarebbero mai emersi in assenza di screening. Questo fenomeno si chiama sovra-diagnosi ed è, fra i possibili danni dello screening, il più insidioso e difficile da quantificare.

Nonostante intuitivamente il paradigma dell'anticipazione diagnostica per

migliorare la prognosi sembra applicabile a tutte le patologie oncologiche, abbiamo evidenze solide che lo screening porti più vantaggi che svantaggi solo per tre sedi: cervice uterina, colonretto e mammella. Vi sono inoltre evidenze di riduzione di mortalità anche per lo screening del polmone con TAC a bassa dose in forti fumatori e per il tumore della prostata con test PSA, ma per il primo esistono ancora molte incertezze su come definire la popolazione target, sull'intervallo di screening e sui criteri e modalità di esecuzione degli accertamenti, mentre per il secondo il rapporto danni benefici deve essere valutato alla luce della enorme sovradiagnosi causata.

Si deve notare come i potenziali benefici dello screening (riduzione della mortalità) siano applicabili solo a chi ha la malattia o almeno precursori neoplastici del cancro, dunque sono proporzionali al rischio di ammalarsi. Al contrario, gran parte dei danni, falsi positivi, effetti collaterali del test, sono quasi del tutto indipendenti dal rischio di malattia. Dunque l'idea di modulare l'intensità dello screening sulla base del rischio individuale sembra un'ottima soluzione per ottimizzare il rapporto danni benefici. La capacità di sfruttare informazioni per predire il rischio di sviluppare uno di questi cancri è enormemente cresciuta negli ultimi decenni aprendo la reale possibilità di uno screening personalizzato.

Al momento le linee guida internazionali non propongono degli screening personalizzati, ma individuano, con pochissime eccezioni, le popolazioni target solo sulla base dell'età.

Nel caso della cervice uterina, il passaggio dal Pap test al test con HPV si può già interpretare come uno screening basato sul rischio, infatti con il test HPV distinguiamo la popolazione in due gruppi, le donne negative all'infezione che hanno una probabilità di sviluppare un cancro nei successivi 5-10 anni bassissima, e le positive che invece hanno una probabilità bassa ma non trascurabile e che dunque meritano una sorveglianza. Nelle donne positive, si possono aggiungere altri e più sofisticati modi per stratificare il rischio, come il tipo virale e l'espressione di oncogeni. Nella popolazione generale e nelle donne negative abbiamo altre informazioni che possono stratificare il rischio: lo stato vaccinale e i precedenti test HPV.

Nel caso del colonretto, la strategia di screening più diffusa in Europa è il test immunochimico per la ricerca del sangue occulto nelle feci. Al momento la popolazione di 50-70 anni viene invitata a fare un test ogni due anni e se l'emoglobina umana nelle feci supera una certa soglia, si effettua una colonoscopia. Recenti evidenze mostrano che usando l'informazione sull'emoglobina nelle feci in modo quantitativo e tenendo conto dei risultati ottenuti anche nei test precedenti, dell'età e del sesso, si può predire con molta precisione il rischio individuale di avere una lesione precancerosa o un cancro oggi, ma soprattutto il rischio di sviluppare un cancro nei prossimi 5 anni. Questo apre le porte a una personalizzazione dello screening.

Nel caso dello screening mammografico i fattori di rischio considerati per predire il rischio individuale fino ad ora, oltre all'età, sono: la densità mammografica, il body mass index, la familiarità, i precedenti risultati di screening e la predisposizione genetica. Il caso della densità è particolare, perché il seno denso, oltre ad essere un fattore di rischio per il cancro della mammella riduce la sensibilità e la specificità della mammografia. Dunque le ipotesi per rispondere sono sia di intensificare

lo screening, sia di cambiare il test di screening per uno che non sia influenzato dalla densità, come l'ecografia o la risonanza. Il rischio genetico nel cancro della mammella ha due differenti aspetti: i geni ad alta penetranza come BRCA1 e 2, Tp53, dove mutazioni deleterie individuano donne che hanno un altissimo rischio e meritano interventi di profilassi e sorveglianza completamente differenti dalla popolazione generale, ma sono una piccolissima parte della popolazione e rappresentano una quota marginale del carico di malattia totale; l'analisi dei polimorfismi (SNPs) genetici che singolarmente hanno una bassissima associazione, ma quando sono valutati nel loro insieme nella popolazione generale possono delineare dei profili di rischio altamente predittivi.

Questi due fattori di rischio, densità e polimorfismi, sono alla base della classificazione del rischio nei trial TBST e MyPeBS. TBST ha reclutato donne di 45 anni randomizzandole a uno screening standard, con intervallo annuale, o a uno screening tailored sulla base della densità, in cui le donne con seno denso effettuano la mammografia annualmente e quelle con seno adiposo ogni due anni. Lo studio continuerà il reclutamento con un protocollo leggermente rivisto fino ad includere circa 60000 donne. Lo studio MyPeBS ha l'obiettivo di reclutare 85000 donne fra i 40 e i 70 anni in sei paesi (Francia, Italia, Belgio, UK, Israele e Spagna) randomizzandole allo screening standard (per lo più mammografia biennale) o a uno screening stratificato sulla base del rischio, valutato con più di 300 SNPs, densità, età, familiarità. Le donne a bassissimo (<1% in 5 anni) rischio saranno re-screenate dopo 4 anni, quelle a rischio intermedio (da 1 a <1,7%) ogni due anni con mammografia e mammo più ecografia se con seno denso, quelle alto (1,7% a 6%) annualmente con mammografia e mammografia più ecografia se con seno denso, infine le donne ad altissimo rischio con mammografia più risonanza annuali. I risultati sono attesi fra circa 8 anni.

Il quadro che emerge è quello di una estrema distanza fra le aspettative generate dalla ricerca di base, che ha prodotto enormi progressi nelle conoscenze sui meccanismi genetici e molecolari alla base delle patologie oncologiche, e i modesti sviluppi che queste conoscenze hanno dato agli strumenti che possiamo realmente utilizzare, soprattutto in prevenzione. Capire quali siano le cause di questa distanza potrebbe essere la chiave per riallineare, se non i risultati, almeno le aspettative: è solo un problema dato dai tempi estremamente lunghi necessari per produrre evidenze di efficacia o è anche una incapacità di tradurre la conoscenza in una tecnologia che abbia una reale utilità clinica e di prevenzione?

Conflitti d'interesse

Ho partecipato al disegno di TBST e sono nello steering Committee di MyPeBS. Non ho conflitti d'interesse economici.

Bibliografia

1. Burton H, Chowdhury S, Dent T, Hall A, Pashayan N, Pharoah P. Public health implications from COGS and potential for risk stratification and screening. *Nature Genetics*. 2013; 45: 349-351.



2. Easton DF, Pharoah PD, Antonio AC, et al. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *N Engl J Med*. 2015; 372: 2243-2257.
3. Giorgi Rossi P, Carozzi F, Federici A, Ronco G, Zappa M, Franceschi S, The Italian Screening in HPV vaccinated girls Consensus Conference group. Cervical cancer screening in women vaccinated against human papillomavirus infection: Recommendations from a consensus conference. *Prev Med*. 2017; 98: 21-30.
4. Ministero della Salute (2005). Direzione Generale della Prevenzione. Raccomandazioni per la pianificazione e l'esecuzione degli screening di popolazione per la prevenzione del cancro della mammella, del cancro della cervice uterina e del cancro del colon retto. Ministero della Salute. Roma.
5. National Institute for Health and Care Excellence. Familial breast cancer: classification and care of people at risk of familial breast cancer and management of breast cancer and related risks in people with a family history of breast cancer (CG164) 2013 <https://www.nice.org.uk/guidance/cg164> (Last accessed on 29 August 2019).
6. Paci E, Giorgi Rossi P. Tailored screening for breast cancer in premenopausal women: not just looking at sensitivity, but aiming to reduce burden. *Women's Health (Lond Engl)*. 2010; 6: 477-479.
7. Pashayan N, Morris S, Gilbert FJ, Pharoah PDP. Cost-effectiveness and benefit-to-harm ratio of risk-stratified screening for breast cancer: A life table model. *JAMA Oncol*. 2018; 4: 1504-1510.
8. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJF, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJLM and the International HPV screening working group. Efficacy of HPV-based Screening for Preventing Invasive Cervical Cancer: follow-up of European randomised controlled trials. *Lancet*. 2014; 383: 524-532.
9. Rychetnik L, Frommer M, Hawe P, et al. Criteria for evaluating evidence on public health interventions. *J Epidemiol Community Health*. 2002; 56: 119-127.
10. Senore C, Zappa M, Campari C, Crotta S, Armaroli P, Arrigoni A, Cassoni P, Colla R, Fracchia M, Gili F, Grazzini G, Lolli R, Menozzi P, Orione L, Polizzi S, Rapi S, Riggi E, Rubeca T, Sassatelli R, Visioli C, Segnan N. Faecal haemoglobin concentration among subjects with negative FIT results is associated with the detection rate of neoplasia at subsequent rounds: a prospective study in the context of population based screening programmes in Italy. *Gut*. 2020; 69: 523-530.
11. TBST Working Group. Il Tailored Breast Screening Trial (TBST): uno studio di non inferiorità finalizzato a ridurre l'impatto negativo e i costi dello screening mammografico in donne di 45-49 anni. *Epidemiol Prev*. 2013; 37: 317-327.
12. UNICANCER. My personalised breast screening (MyPeBS). Clinical trials.gov. 2018. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03672331> (Last accessed on 14 September 2019).
13. Vachon CM, Pankratz VS, Scott CG, Haeberle L, Ziv E, Jensen MR, et al. The contributions of breast density and common genetic variation to breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*. 2015; 107: 397-400.

Da Asilomar al genome editing: etica della ricerca e modelli di decisione

Fabrizio Rufo¹, Antonella Ficorilli²

¹Dipartimento di Biologia Ambientale, Sapienza Università di Roma

²Società per l'epidemiologia e la prevenzione "Giulio A. Maccacaro", Impresa sociale srl, Milano

Negli ultimi decenni gli scienziati hanno sviluppato una serie di nuovi approcci sperimentali. Alcuni di essi hanno sfidato i confini comunemente accettati tra la vita umana ed animale, tra i concetti di naturale e artificiale e infine ridotto il limite preesistente tra riparazione e ricreazione della vita biologica. In modo particolare, i progressi tecnici nel campo dell'ingegneria genetica hanno dato luogo sin dall'inizio a polemiche e dibattiti sostanziali. A partire dalla prima conferenza di Asilomar nel 1973, gli scienziati si sono trovati sempre più frequentemente implicati in discussioni che sono andate oltre la mera deontologia professionale toccando questioni politiche specifiche come: il diritto alla libertà di ricerca; la responsabilità per le conseguenze della ricerca; i limiti tra la ricerca di base e le applicazioni; il diritto del pubblico a partecipare alla valutazione delle finalità e dei metodi della ricerca; il rapporto tra costi e benefici e la possibile ricaduta sociale; la crescente influenza dell'industria nella ricerca biologica. Un vero e proprio coagulo di problemi di ordine politico che i ricercatori all'inizio non avevano minimamente previsto e che sono al centro dell'attuale riflessione sul rapporto tra scienza e società.

Il fulcro di queste discussioni, innescate da sorprendenti progressi sperimentali, riguarda la capacità della biologia contemporanea e in particolare delle biotecnologie di spingersi oltre la tradizionale acquisizione di conoscenze riguardanti il funzionamento dei sistemi viventi. L'ingegneria genetica, infatti, permette, interferendo in modo programmato con la componente genetica della vita biologica, di modificare l'informazione del DNA e di cambiare i programmi di sviluppo che esso controlla, rendendoci artefici di noi stessi e degli altri organismi. Questa crescente capacità di intervento ha oggi a disposizione mezzi tecnici estremamente potenti e raffinati come nel caso relativo all'utilizzo del sistema CRISPR-Cas9. Progressivamente è diventata più chiara la necessità di costruire uno sfondo teorico frutto di uno sforzo concorde e di una collaborazione fattiva tra esperti di diversa matrice culturale e professionale e di una convergenza inedita tra esperti e pubblica opinione, tutti aspetti che sono alla base del dibattito generato in questi anni dall'impiego del *genome editing* sulle cellule umane di linea germinale.

La presentazione affronterà questi aspetti focalizzandosi sulle differenze tra due contesti scientifici: il contesto dell'ingegneria genetica degli anni '70, con particolare attenzione rivolta all'uso della tecnica del DNA ricombinante per generare molecole geneticamente modificate, e l'attuale contesto di *editing* del genoma,

con particolare attenzione all'uso della tecnologia CRISPR-Cas9 per modificare geneticamente le cellule della linea germinale umana. Il confronto tra questi due contesti scientifici suggerisce alcune considerazioni sulla necessità di gestire le questioni emerse definendo procedure che rispondano ai criteri di democrazia e di responsabilità nei confronti della società. L'obiettivo di fondo dovrebbe essere quello di dare effettivo avvio ad azioni e interventi basati su una concezione non più gerarchica ma reticolare della conoscenza, ovvero passare da un modello di conoscenza *top-down* verso forme di dibattito pubblico e modelli di co-produzione della conoscenza.

Sarà avanzata la tesi secondo cui il confronto tra il modello di gestione della valutazione del rischio nel caso del DNA ricombinante e nel caso del sistema CRISPR-Cas9 applicato agli embrioni umani è utile non tanto, come da più parti sostenuto, per richiamare l'attenzione sulla continuità di forme di autoregolamentazione da parte della comunità scientifica, ma piuttosto per fare alcune considerazioni sulla necessità di definire procedure che rispondano ai criteri di democrazia e di responsabilità nei confronti della società. Questo confronto mostra come nel corso degli anni si sia avuto un allargamento delle questioni di *policy* che i ricercatori devono considerare per avere una condotta non solo scientificamente responsabile - allo scopo di produrre una conoscenza solida e sicura - ma anche socialmente accettabile. Sebbene la complessità degli aspetti implicati nella valutazione del rischio di tecnologie emergenti si sia accresciuta nel tempo, già da Asilomar erano presenti tutte le sfide con cui ancora oggi gli scienziati, gli altri esperti e la società si trovano a confrontarsi per ridefinire il rapporto tra scienza e società. Le soluzioni individuate per far fronte a tali sfide ancora non trovano un punto di arrivo definitivo. Alcuni esempi sono costituiti da approcci come il coinvolgimento dei pazienti e del pubblico (PPI) nella salute e nella ricerca; da forme di *citizen science* nelle indagini ambientali e di salute pubblica; e da altri processi decisionali sociali e partecipativi. In questi approcci, tutte le parti interessate, non solo la comunità scientifica, hanno l'opportunità di discutere i potenziali rischi e benefici degli obiettivi e delle modalità di indagine prima che essi siano sviluppati e implementati. Si tratta di una concezione reticolare della conoscenza in cui tutti gli *stakeholder* hanno la possibilità di interagire e far valere il proprio punto di vista durante il processo decisionale. Tuttavia, realizzare percorsi di questa natura non è facile.

Si comprende il bisogno di individuare forme democratiche del processo decisionale che consentano di far emergere e di far pesare nella valutazione le prospettive di tutti i soggetti coinvolti, o almeno della gran parte, siano essi individui, gruppi o nazioni, ma allo stesso tempo non si comprende ancora chiaramente come delineare un simile percorso senza il quale le grandi dichiarazioni e normative rischiano di restare lettera morta.

Da più direzioni, Unione Europea inclusa, arriva l'invito a che la ricerca scientifica collabori con i più ampi gruppi sociali: la partecipazione diffusa e il profondo radicamento dell'innovazione influenzano infatti positivamente il progresso scientifico e lo sviluppo sociale. Come si sottolinea nel rapporto del 2017 della National Academy of Sciences, la partecipazione del pubblico su questo tema dovrebbe essere inserita nel "processo decisionale generale e dovrebbe includere un monito-



raggio continuo degli atteggiamenti pubblici, dei deficit informativi e delle preoccupazioni emergenti nell'opinione pubblica" (p. 137). Il diritto all'accesso, alla comprensione, alla valutazione dei risultati della ricerca scientifica e alle modalità del suo utilizzo si configura sempre di più come una frontiera dell'equità sociale che può e deve essere inserita in un più generale ampliamento della sfera dei diritti di cittadinanza. Sheila Jasanoff ha recentemente coniato il termine bio-costituzionalismo per indicare quelle fasi nella storia politica in cui la legge cerca di dare un senso e una collocazione giuridica alla presenza di nuovi oggetti e nuove conoscenze scientifiche. In altre parole, l'integrazione tra scienza e democrazia, implicita nella prospettiva che si delinea nella presentazione, si basa sull'idea che in una società tecnologicamente avanzata, questi due fattori si intrecciano, dando luogo a nuovi diritti, nuove aspettative e nuovi valori, volti a garantire a tutti i cittadini il diritto di accesso alla conoscenza che li riguarda come membri di una società democratica. In ogni caso, le linee che andranno a comporre e definire questi nuovi diritti sono ancora in buona parte da tracciare.

Bibliografia

1. Academy of Sciences of Hong Kong, Royal Society of the United Kingdom, U.S. National Academy of Sciences, U.S. National Academy of Medicine (2018) Statement by the organizing committee of the second international summit on human genome editing. <https://royalsociety.org/~media/news/2018/human-genome-editing-statement-29-11-2018.pdf>.
2. Addison C, Taylor-Alexander S (2015) Gene editing and germ-line intervention: the need for novel responses to novel technologies. *Mol Ther* 23:1678–1680
3. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, Corn JE, Daley GQ, Doudna JA, Fenner M, Greely HT, Jinek M, Martin GS, Penhoet E, Puck J, Sternberg SH, Weissman JS, Yamamoto KR. A prudent path forward for genomic engineering and germile gene modification. *Science*. 2015; 348: 36-38
4. Berg P, et al. Letters, Potential biohazards of recombinant dna molecules. *Science*. 1974, 185: 303.
5. Berg P. Recombinant DNA research can be safe. *Trends Biochem Sci*. 1977; 2: 25-27.
6. Berg P. Genetic engineering: challenge and responsibility. *Ambio*. 1977; 6: 253-261.
7. Berg P, Baltimore D, Brenner S, Roblin RO 3rd, Singer MF. Asilomar conference on recombinant DNA molecules. *Science*. 1975; 188: 991-994.
8. Berg P. Asilomar 1975: DNA modification secured. *Nature*. 2008; 455: 290-291.
9. Blasimme A. Governare il genoma: sapere e sovranità nei recenti sviluppi dell'ingegneria genetica. *Notizie di Politeia*. 2017; 126: 92-102.
10. Buyx A, Del Salvio L, Prainsack B, Völzke H. Every participant is a PI. Citizen science and participatory governance in population studies. *Int J Epidemiol*. 2017. <https://doi.org/10.1093/ije/dyw204>
11. Callon M. The role of lay people in the production and dissemination of scientific knowledge. *Sci Technol Soc*. 1999; 4: 81-94.



12. Capron AM, Schapiro R. Remember Asilomar? Reexamining science's ethical and social responsibility. *Perspect Biol Med*. 2001; 44: 162-169.
13. Committee on Science, Technology, and Law; Policy and Global Affairs; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Olson S, editor (2016) International summit on human gene editing: a global discussion. Meeting in Brief. National Academies Press (US), Washington, DC.
14. De Marchi B, Biggeri A, Cervino M, Mangia C, et al. A participatory project in environmental epidemiology: lessons from the Manfredonia case study (Italy 2015-2016). *Public Health Panorama*. 2017; 3: 321-327.
15. Douglas HE. The moral responsibilities of scientists (tensions between autonomy and responsibility). *Am Philos Q*. 2003; 40: 59-68.
16. European Group on Ethics in Science and New Technologies (2021) Ethics of Genome Editing. Opinion no. 32, Brussels 19 March.
17. Gignac F, Froeling FEM, Hoek G, Vermeulen R, Nieuwenhuijsen M, Ficorilli A, De Marchi B, Biggeri A, Kocman D, Robinson JA, Grazuleviciene R, Andrusaityte S, Righi V, Basagaña X. Narrative Review of Citizen Science in Environmental Epidemiology: Setting the stage for co-created research projects in environmental epidemiology, in «Environment International». 2021; 152. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106470>
18. Greely HT. *CRISPR People: The Science and Ethics of Editing Humans*. The MIT Press. 2021.
19. Gregorowius D, Biller-Andorno N, Deplazes-Zemp A. The role of scientific self-regulation for the control of genome editing in the human germline. *EMBO Rep*. 2017; 18: 355-358.
20. Hellman A, Oxman M. N, Pollack R. Biohazards in biological research. Proceedings of a Conference Held at the Asilomar Conference Center, Pacific Grove, California, 1973; January 22-24. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
21. Hurlbut JB. Limits of responsibility: genome editing, Asilomar, and the politics of deliberation. *Hast Cent Rep*. 2015; 45: 11-14.
22. Hurlbut JB, Jasanoff S, Saha K. Building capacity for a global editing observatory: conceptual challenges. *Trends Biotechnol*. 2018; 36: 639-641.
23. Imperial College Health Partners (2016) Patient and public participation tool. <https://imperialcollegehealthpartners.com/wp-content/uploads/2015/01/PPI-Tool-V2.pdf>.
24. Isaacson W. *The Code Breaker: Jennifer Doudna, Gene Editing, and the Future of the Human Race*. Simon & Schuster. 2021.
25. Jasanoff S. *Design on nature*. Princeton University Press, Princeton. 2005.
26. Jasanoff S. Rewriting life, reframing rights. In: Jasanoff S (ed) *Reframing rights: bioconstitutionalism in the genetic age*. MIT Press, Cambridge (MA). 2011; 1-27.
27. Jasanoff S, Hurlbut JB, Saha K. CRISPR democracy: gene editing and the need for inclusive deliberation. *Issues Sci Technol*. 2015; 32: 25-32.
28. Jasanoff S, Hurlbut JB. A global observatory for gene editing. *Nature*. 2018; 555: 435-437.
29. Lander E, Baylis F, Zhang F, Charpentier E, Berg P, et al. Adopt a moratorium on heritable genome editing. *Nature*. 2019; 567: 166-168.

30. Liang PP, Xu YW, Zhang XY, Ding CH, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y, Sun Y, Bai Y, Songyang Z, Ma W, Zhou C, Huang J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein & Cell*. 2015; 6: 363-372.
31. National Academy of Sciences, Engineering, and Medicine. Human genome editing: science, ethics, and governance. The National Academies Press, Washington, DC. 2017.
32. National Institute of Health. Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules. *Fed Regist*. 1976; 41: 27911.
33. Nuffield Council on Bioethics. Genome editing and human reproduction: social and ethical issues. Nuffield Council on Bioethics, London. 2018.
34. Parthasarathy S. Governance lessons for CRISPR/Cas9 from the missed opportunities of Asilomar. *Ethics Biology Eng Med*. 2015; 6: 3-4.
35. Rogers M. The Pandora's box congress. *Rolling Ston*. 1975; 139: 34-78.
36. Sarewitz D. Science can't solve it. *Nature*. 2015; 522: 413-414.
37. Singer M, Solli D. Guidelines for DNA Hybrid Molecules. *Science*. 1973; 181: 1114.
38. Swazey JP, Sorenson JR, Wong CB. Risks and benefits, rights and responsibilities: A history of the recombinant DNA research controversy. *So Cal L Rev*. 1978; 51: 1019-1078.
39. Turney J. *Frankenstein's footsteps: science, genetics and popular culture*. Yale University Press, Yale. 1998.
40. U.S. National Academy of Sciences, U.S. National Academy of Medicine, The Royal Society, Chinese Academy of Sciences. International summit on human gene editing, a global discussion. Commissioned Paper, December 1-3 2015. Washington, DC.
41. Wade N. Microbiology: hazardous profession faces new uncertainties. *Science*. 1973; 182: 566-567.