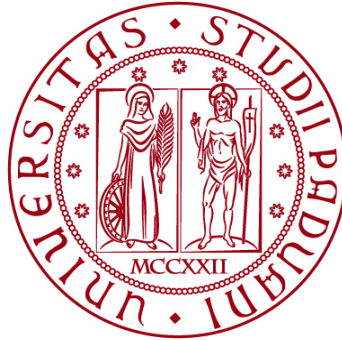


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



**ELABORATO DI LAUREA**

**I PROBIOTICI INGEGNERIZZATI COME POSSIBILE  
STRATEGIA TERAPEUTICA PER LA CURA DELLE MALATTIE  
INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI**

**Tutor: Prof.ssa Maria Cecilia Giron  
Dipartimento di Scienze del Farmaco**

**Laureanda: Alessia Tiepolo**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**

## SOMMARIO

ABSTRACT .....	2
INTRODUZIONE.....	3
Il microbiota .....	3
Malattie infiammatorie croniche intestinali .....	3
Fattori di rischio.....	4
Incidenza .....	4
Patogenesi.....	5
Trattamenti attualmente disponibili .....	6
PROBIOTICI .....	7
PROBIOTICI INGEGNERIZZATI .....	9
Strumenti di ingegnerizzazione .....	10
Plasmidi.....	10
CRISPR-Cas9.....	12
Cre-loxP .....	12
Approccio top-down o approccio bottom-up?.....	12
Prebiotici .....	14
SPECIE INGEGNERIZZATE .....	15
<i>Lactococcus lactis</i> .....	15
<i>Escherichia coli</i> .....	15
<i>Bifidobacterium longum</i> .....	17
<i>Bacteroides ovatus</i> .....	17
<i>Lactobacillus paracasei</i> .....	17
<i>Lactobacillus lactis</i> .....	18
CONCLUSIONI .....	19
BIBLIOGRAFIA .....	20

## **ABSTRACT**

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI), quali morbo di Crohn e colite ulcerosa, sono patologie con eziologia complessa caratterizzate da un'inflammatione cronica della mucosa intestinale associata ad un'anomala attività immunitaria anche verso antigeni del microbiota intestinale con conseguente disbiosi. Negli ultimi 30 anni la prevalenza globale di MICI è aumentata marcatamente (+85%), con un numero di soggetti ammalati pari a oltre 7 milioni a livello mondiale. Scopo di questa tesi è stata un'analisi della letteratura su efficacia e sicurezza di probiotici geneticamente ingegnerizzati come possibile terapia per le MICI. L'ingegnerizzazione di batteri commensali intestinali con diversi strumenti di editing permette la creazione di specie batteriche utili per veicolare sostanze farmacologiche potenzialmente utili al ripristino di un microbiota sano e/o alla correzione di anomalie immunomediate. Fino ad oggi sono stati messi a punto diversi batteri ingegnerizzati clinicamente promettenti, che, pur necessitando di ulteriori conferme, offrono comunque una nuova e interessante terapia contro le MICI.

# INTRODUZIONE

## Il microbiota

La popolazione di microrganismi presente nel tratto gastrointestinale umano è chiamata microbiota intestinale. Il microbiota intestinale è composto da batteri, virus, funghi, protozoi e archea, e può arrivare a pesare 1,5 kg.

Il termine microbiota è utilizzato per indicare principalmente la componente batterica dal momento che questa è responsabile del metabolismo dei prodotti della digestione, in particolare di quelli derivati dalla fermentazione di carboidrati e proteine.

Il colon è il tratto del sistema digerente con la maggiore concentrazione di microflora batterica intestinale, stimata intorno a circa  $10^{14}$  microrganismi, di cui il 90% è costituito da anaerobi obbligati. La popolazione principale è costituita da due phyla: i *Bacteroidetes* e i *Firmicutes*. Il phylum *Bacteroidetes* include batteri Gram negativi appartenenti ai generi *Bacteroides*, tra cui *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, e il genere *Prevotella*, mentre il phylum dei *Firmicutes* comprende, invece, batteri Gram positivi appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Faecalibacterium*, *Bacillus* ed *Eubacterium*. Tra le componenti minoritarie della microflora batterica intestinale rientrano specie batteriche appartenenti ai phyla *Cyanobacteria* e *Acidobacteria*.

Il termine microbioma indica il genoma collettivo della microflora intestinale, mentre il termine metaboloma si riferisce alle sequenze geniche coinvolte in diverse vie metaboliche. Il confronto del metaboloma con il genoma umano ha evidenziato che il microbiota codifica per enzimi non presenti nel genoma umano. Si tratta di enzimi coinvolti in funzioni fisiologiche fondamentali per il benessere dell'uomo, come, ad esempio, la digestione di zuccheri complessi introdotti con la dieta, che altrimenti sarebbero indigeribili, la sintesi di acidi grassi a catena corta (SCFAs, *Short Chain Fatty Acids*), molecole essenziali per la funzionalità della barriera intestinale e l'esclusione di superficie, fenomeno per cui la flora normale impedisce a un patogeno di associarsi alla mucosa intestinale (Dehò e Galli, 2018).

## Malattie infiammatorie croniche intestinali

Le malattie infiammatorie croniche intestinali includono la colite ulcerosa (UC, *Ulcerative Colitis*) e il morbo di Crohn (CD, *Crohn's Disease*). Sono malattie caratterizzate da un'eziopatogenesi complessa e comportano l'infiammazione del tratto gastrointestinale. Non sono attualmente disponibili cure risolutive, ma solo terapie ad azione antinfiammatoria e immunomediata. Alle MICI sono, inoltre, associate diverse complicazioni, come infezioni persistenti, necessità di operazioni chirurgiche e comparsa di cancro e, pertanto, è fondamentale individuare nuove

strategie terapeutiche per ridurre la gravità e progressione della patologia, o, addirittura, ridurre il rischio di insorgenza.

### **Fattori di rischio**

Analisi genomiche hanno evidenziato circa 200 geni associati all'aumento del rischio di insorgenza delle MICI: questi geni sono principalmente protagonisti di vie di segnale immunitario, come l'immunità innata, l'attivazione di linfociti e la produzione di citochine. Tuttavia, in diversi studi il tasso di concordanza, cioè il rapporto fra il numero di fratelli gemelli monozigoti che presentano la stessa complicanza (concordanti) e quelli in cui almeno uno ne risultava privo (discordante), non raggiungeva mai il 100%, per cui l'insorgenza di MICI non è attribuibile solamente a fattori genetici (Borowitz, 2023).

È stata osservata anche un'associazione tra insorgenza e industrializzazione. La migrazione da un Paese in via di sviluppo a un Paese industrializzato è legata a un aumento del rischio di sviluppo di MICI e altre malattie immuno-mediate. Il ruolo di fattori non genetici apporta un contributo patogenico non trascurabile.

L'urbanizzazione ha un'importante influenza sullo stile di vita, in particolare sull'alimentazione. È stato evidenziato che il consumo di cibi cosiddetti ultra-processati è associato all'insorgenza di MICI in maniera dose-dipendente. Agenti addensanti sintetici, come la carbossimetilcellulosa e il polisorbato, sono coinvolti nel disturbo della barriera mucosale intestinale nel topo, mentre agenti coloranti, come *Red 40* e *Yellow 6*, sono collegati alla comparsa di infiammazione in modelli animali murini, con aumentata produzione di IL-23, un'interleuchina infiammatoria (Agrawal e Jess, 2022). Anche l'utilizzo di antibiotici è legato a un aumentato rischio di IBD in maniera dose-dipendente in tutti i gruppi d'età.

L'impatto dei pazienti affetti da MICI sul sistema sanitario nazionale è notevole: si stima che i costi di cura siano approssimativamente 3 volte più ingenti di quelli di un soggetto normale (Agrawal e Jess, 2022).

### **Incidenza**

Generalmente, le MICI colpiscono prevalentemente adulti giovani: si stima che il 25% dei pazienti con MICI manifesti la malattia prima dei 20 anni. È stata osservata una graduale crescita dell'incidenza di queste patologie durante l'infanzia e l'adolescenza (Borowitz, 2023). Nel corso del '900, le MICI erano tipiche di aree industrializzate, principalmente Europa e Nord America; negli scorsi 50 anni, invece, le MICI si sono diffuse a livello globale, includendo i Paesi in via di sviluppo (Borowitz, 2023).

Osservando la distribuzione geografica della malattia, l'ipotesi per cui i fattori ambientali influiscono sull'insorgenza sembrerebbe essere avvalorata. Studi condotti su persone immigrate da zone a bassa incidenza di MICI a zone ad alta

incidenza sembrerebbero evidenziare come queste persone abbiano un' aumentata probabilità di sviluppo di queste, e viceversa (Borowitz, 2023).

In Paesi in via di "occidentalizzazione", come Cina, India, Corea del Sud, alcuni Paesi del Medio Oriente e del Nord Africa, l'incidenza di MICI sta aumentando (Guan, 2019).

### **Patogenesi**

Il morbo di Crohn è caratterizzato da ispessimento della mucosa, infiammazione transmurale, ulcere con fissurazioni e granulomi, mentre la colite ulcerosa interessa la mucosa e la sottomucosa con infiammazione delle cripte del Lieberkühn e delle ghiandole tubulari con ascessi.

La disregolazione del sistema immunitario a livello del tubo digerente si manifesta con danno epiteliale, infiltrazione di cellule del sistema immunitario nella lamina propria che, attivata, produce citochine pro-infiammatorie.

L'integrità della barriera intestinale è garantita dalle cellule epiteliali intestinali e dalle giunzioni serrate, che selezionano i nutrienti e le molecole in ingresso. Nelle MICI, la funzionalità della barriera intestinale è compromessa. Il fattore WFDC2 fondamentale per l'integrità delle giunzioni serrate viene downregolato, mentre la secrezione di citochine pro-infiammatorie come IFN- $\gamma$  e TNF aumenta la permeabilità della barriera intestinale e anomalie nella morte degli enterociti per apoptosi portano a compromissione dell'integrità della barriera (Guan, 2019).

Le cellule dendritiche immature migrano dalle placche del Peyer (tessuto linfatico della tonaca mucosa) ai linfonodi mesenterici, presentando gli antigeni ai linfociti T naive. Nei pazienti con MICI, le cellule dendritiche si accumulano nei siti di infiammazione. In particolare, nei pazienti con morbo di Crohn, le cellule dendritiche mieloidi producono alti livelli di IL-23, un'interleuchina pro-infiammatoria, a scapito di IL-10, un'interleuchina antinfiammatoria, ad indicare il ruolo fondamentale di queste cellule come regolatrici della tolleranza immunitaria alla microflora intestinale e agli antigeni introdotti con la dieta.

La disregolazione dei macrofagi è un altro aspetto importante nelle MICI. I macrofagi intestinali sono normalmente presenti nella lamina propria e possiedono diversi recettori inibitori. Tuttavia, durante l'infiammazione intestinale esprimono molecole co-stimolatorie, come CD40 e CD80, che attivano i linfociti T.

Nella lamina propria di pazienti con colite ulcerosa è stata osservata la presenza di cellule natural killer, che si attivano in presenza di citochine pro-infiammatorie. TNF è un altro mediatore dell'infiammazione presente nelle MICI: alti livelli sono stati riscontrati in campioni di mucosa intestinale, feci e sangue dei pazienti. TL1A (*TNF-like Ligand 1A*) è un importante protagonista dell'induzione

dell'infiammazione. È secreto dalle cellule presentanti l'antigene e il segnale associato a TL1A è mediato da DR3, recettore espresso principalmente sui linfociti T. TL1A agisce in sinergia con IL-12 e IL-4 amplificando i segnali di differenziazione di cellule Th1, Th2 e Th17. Nei modelli murini di colite indotta da destrano solfato, TL1A interferisce negativamente con la regolazione delle giunzioni serrate e con la funzionalità della barriera epiteliale intestinale (Guan, 2019).

È consolidato che il morbo di Crohn sia causato da una risposta immunitaria aggressiva mediata dalle cellule Th1 ed è stata constatata un'eccessiva attivazione della via IL-23/Th17 nei confronti di antigeni di origine batterica in individui geneticamente predisposti. Da ciò consegue un'infiltrazione di granulociti e macrofagi che porta al rilascio di enzimi, specie reattive dell'ossigeno e citochine pro-infiammatorie che causano ulcerazioni discontinue e infiammazione su tutto lo spessore della parete intestinale, con possibilità di comparsa di granulomi (Guan, 2019).

### **Trattamenti attualmente disponibili**

Le cure attualmente disponibili per i pazienti con MICI sono dirette al controllo dei sintomi. I farmaci più comunemente impiegati sono aminosilicilati, corticosteroidi, immunomodulatori e farmaci biologici.

L'utilizzo degli aminosilicilati include principalmente sulfasalazina, che interferisce col metabolismo dell'acido arachidonico, impedendo la produzione di prostaglandine e leucotrieni (Cai et al., 2021).

L'impiego di corticosteroidi nel trattamento delle MICI ebbe inizio negli anni '50. Essi interferiscono con fattori pro-infiammatori, impedendo la trascrizione di geni infiammatori; inoltre, recettori dei corticosteroidi attivati si possono legare a specifici *response elements* di geni antinfiammatori, promuovendone la trascrizione. Vengono utilizzati in pazienti con morbo di Crohn moderato, in particolare nel caso di pazienti con lesioni estese. Al loro impiego sono però associati diversi effetti collaterali, come infezioni opportunistiche, diabete mellito e ipertensione (Cai et al., 2021). Sono disponibili corticosteroidi di seconda generazione, come la budesonide, con migliori profili di sicurezza e tollerabilità rispetto ai corticosteroidi convenzionali.

I farmaci immunomodulatori utilizzati in pazienti con MICI sono le tiopurine, il metotrexato e inibitori della calcineurina. Le tiopurine interferiscono con la sintesi del DNA, inibendo la proliferazione linfocitica, ma tra gli effetti collaterali risultano mielotossicità e danno epatico. Anche il metotrexato interferisce con la sintesi del DNA e partecipa alla downregulation della produzione di citochine pro-infiammatorie, però non dà un contributo significativo nella remissione del paziente. Gli inibitori della calcineurina, come Ciclosporina A e Tacrolimus, interferiscono

con il fattore nucleare delle cellule T attivate, inibendo la risposta infiammatoria; tra gli effetti avversi si riscontrano danno renale e ipercalcemia (Cai et al., 2021).

#### *Trapianto di microbiota fecale*

Il trapianto di microbiota fecale è una strategia terapeutica per il trattamento delle MICI di recente introduzione. Consiste nel trapianto di materiale fecale proveniente da un individuo sano nel tratto intestinale di pazienti con MICI. Include, potenzialmente, tutte le specie batteriche che costituiscono un microbiota sano. Diversi studi hanno confermato che questa procedura favorisce lo sviluppo di una popolazione microbica sana nel tratto gastrointestinale del paziente ricevente. È stata osservata una correlazione tra la diversità microbica del donatore e la percentuale di successo della procedura.

È importante che il materiale fecale sia manipolato in condizioni anaerobiche, essendo la popolazione microbica principalmente anaerobica: pazienti in cui era stato trapiantato materiale fecale manipolato in condizioni anaerobiche avevano un maggiore tasso di remissione rispetto a pazienti in cui era stato trapiantato materiale fecale manipolato in condizioni aerobiche (Cai et al., 2021). Tuttavia, la scelta del trapianto di microbiota fecale come strategia terapeutica per le MICI presenta delle criticità. Innanzitutto, non ci sono abbastanza dati sugli effetti a lungo termine di tale procedura. La gravità di potenziali complicazioni come diarrea, perforazione intestinale e sepsi non è trascurabile (Cai et al., 2021). Inoltre, il dispendio di tempo e manodopera e la necessità di frequenti interventi impediscono che ora come ora il trapianto di microbiota fecale diventi una terapia di routine per i pazienti con MICI.

## **PROBIOTICI**

L'Associazione Scientifica Internazionale per i Probiotici e i Prebiotici definisce i probiotici come “microrganismi vivi che conferiscono benefici all'ospite se somministrati nelle giuste quantità”. L'assunzione di probiotici conferisce diversi benefici alla salute del tratto gastrointestinale: essi favoriscono una corretta ripopolazione microbica, competono con i batteri patogeni impedendone la colonizzazione del tratto gastrointestinale, partecipano alla degradazione dei composti tossici, interagiscono con le cellule del sistema immunitario modulandone l'azione e promuovono il mantenimento dell'integrità della barriera gastrointestinale.

Nel microbiota dei pazienti con MICI si riscontra una diminuzione delle specie appartenenti ai generi *Bacteroides* e *Firmicutes* e un aumento delle specie appartenenti ai generi *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. La diminuzione della quota di specie batteriche appartenenti ai generi *Bacteroides* e *Firmicutes*, che producono acidi grassi a catena corta (SCFAs, *Short Chain Fatty Acids*), molecole che agiscono



sulla barriera epiteliale intestinale regolandone la permeabilità, porta a uno sbilanciamento di questa, con un'aumentata permeabilità della barriera, con conseguente diminuzione della selettività e attivazione delle cellule del sistema immunitario. L'assunzione di probiotici costituiti dalle principali specie benefiche permette, o, perlomeno, aiuta, un ripristino della corretta composizione microbionica (Figura 1).

L'*Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), è uno dei probiotici più comunemente assunti. Fu isolato da Alfred Nissle, scienziato tedesco, dalle feci di soldati tedeschi non affetti da un'epidemia di diarrea durante la Prima guerra mondiale. EcN ha effetti immunomodulatori stimolando la produzione di citochine antiinfiammatorie, con un'ottima capacità di colonizzazione del tratto gastrointestinale e compete con batteri patogeni, evitando la proliferazione in particolare di ceppi di *Escherichia coli* enteroemorragici (EHEC). Nel periplasma di EcN, infatti, è presente una proteasi che impedisce lo sviluppo del biofilm di EHEC (Murali e Mansell et al., 2024).

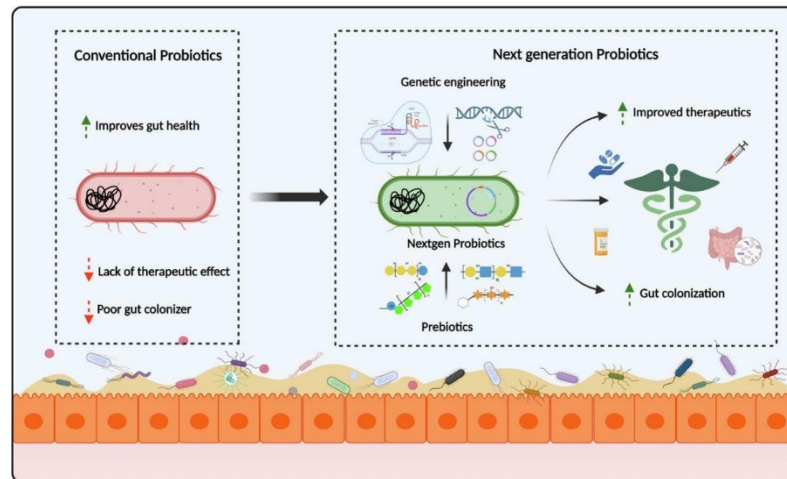
I probiotici convenzionali sono i LAB (*Lactic Acid Bacteria*), batteri Gram-positivi coinvolti nella produzione di acido lattico e di molecole energetiche attraverso processi fermentativi in assenza di ossigeno. I generi principali di probiotici sono *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* ed *Enterococcus*.

Recentemente sono stati messi in commercio i cosiddetti probiotici di nuova generazione, o non convenzionali, come *Akkermansia muciniphila*, *Eubacterium hallii*, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Bacteroides fragilis* (Murali e Mansell et al., 2024). *F. prausnitzii* è un ottimo produttore di butirato, uno degli SCFA benefici per la salute gastrointestinale perché aiutano a contrastare l'infiammazione. *E. hallii* produce il propionato, un altro SCFA che interviene nella regolazione del metabolismo dei prodotti della fermentazione del glucosio.

Probiotici di nuova generazione del genere *Bacteroides* come *B. fragilis*, *B. vulgatus* e *B. thetaiotaomicron* esprimono enzimi che permettono loro di ottenere energia da carboidrati complessi, caratteristica che li rende una presenza competitiva all'interno del microbiota (Figura 1).

La produzione di batteriocine da parte di specie appartenenti al genere *Bacteroides* e di tossine da parte di *B. fragilis* può essere prevenuta eliminando i geni responsabili, così da ottenere probiotici sicuri da somministrare a pazienti MICI. L'assunzione di probiotici, però, si limita a mitigare i sintomi di queste malattie. Il rischio di trasferimento orizzontale (cioè, tra batteri di diverse specie) di geni della resistenza agli antibiotici non è da trascurare; inoltre, la potenziale produzione di molecole antimicrobiche non-specifiche potrebbe danneggiare la popolazione microbionica benefica andando ad aggravare il quadro patologico del paziente. L'importanza di un corretto dosaggio non è trascurabile: un dosaggio troppo elevato

potrebbe comportare sepsi. I meccanismi d'azione sono spesso ceppo-specifici; infine, dati promettenti ottenuti da esperimenti *in vitro* non sempre trovano corrispondenza con i risultati ottenuti *in vivo*, sia in modelli animali che in soggetti umani.

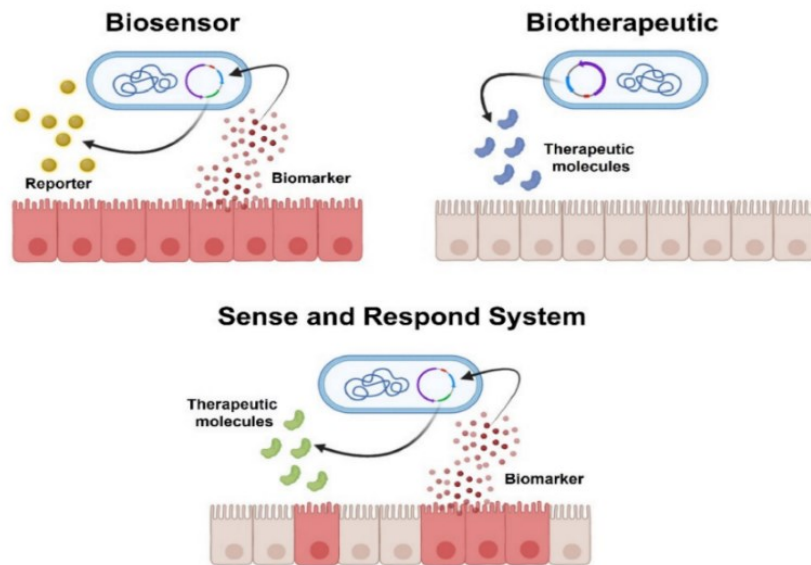


**Figura 1.** Differenze fra i probiotici convenzionali e la nuova generazione di probiotici ingegnerizzati (modificata da Murali e Mansell et al., 2024).

## PROBIOTICI INGEGNERIZZATI

Il concetto di ingegnerizzazione dei probiotici deriva dalla necessità di potenziare il loro effetto terapeutico. Grazie all'ingegneria genetica si può potenzialmente attivare o disattivare, in modo permanente oppure intermittente, la secrezione di molecole da parte delle specie microbiche in base al quadro clinico e alle necessità terapeutiche del singolo paziente. I probiotici possono essere trasformati in "biosensori" che regolano la secrezione di molecole terapeutiche in base agli stimoli che ricevono dall'ambiente circostante. Si possono far produrre citochine, enzimi e antibiotici.

L'ingegnerizzazione dei probiotici prevede la modifica del genoma batterico attraverso l'eliminazione o l'inserzione di geni oppure l'introduzione di mutazioni geniche. Nell'ultimo decennio sono stati compiuti enormi progressi nella progettazione di diversi strumenti di editing genomico. Grazie all'ingegneria genetica, i probiotici possono essere manipolati per essere trasformati in diversi tipi di agenti terapeutici e/o diagnostici (Figura 1 e 2). Possono essere trasformati in sensori, che permettono la diagnosi di una determinata condizione grazie alla produzione di un composto rivelatore dei livelli di uno specifico biomarker. Possono essere anche trasformati in bioterapeutici, che grazie alla manipolazione genetica sono in grado di rilasciare molecole terapeutiche *in situ*, permettendo di ottenere una biodisponibilità di quasi il 100%. Si possono anche creare dei sistemi *sense and respond* che liberano molecole terapeutiche in risposta alla presenza di marcatori caratteristici dell'infiammazione (Pesce et al, 2022).



**Figura 2.** Principali approcci nell'ingegneria dei probiotici utilizzati nelle MICI. I biosensori possono indurre l'espressione di un reporter (solitamente un marcatore fluorescente) in seguito al rilevamento di biomarcatori specifici dell'infiammazione. I bioterapici sono in grado di produrre, sulla superficie mucosale, una molecola terapeutica, sia in modo costitutivo che dopo l'attivazione di un substrato esogeno (sistemi inducibili). I sistemi *sense and respond* incorporano la tecnologia dei biosensori rispondendo a biomarcatori specifici dell'infiammazione con la produzione di una molecola terapeutica (modificato da Pesce et al., 2022).

Tra i criteri per la selezione delle specie da ingegnerizzare, bisogna sicuramente analizzare le caratteristiche del tratto gastrointestinale. Essendo un ambiente prevalentemente anaerobico, è vantaggioso lavorare con specie anaerobiche facoltative o anaerobiche già presenti nel microbiota, come *Bacteroides* spp. ed *Escherichia* spp.

I probiotici ingegnerizzati sono classificati come *Next Generation Probiotics* (NGP).

## Strumenti di ingegnerizzazione

### Plasmidi

I plasmidi sono molecole di DNA capaci di replicarsi indipendentemente dal DNA genomico; per questo motivo sono sfruttati per inserire nelle cellule geni che conferiscono funzioni additive. Vengono introdotti nelle cellule batteriche principalmente tramite trasformazione, ma anche con metodiche come la coniugazione e la trasduzione fagica. Il plasmide deve possedere degli elementi base:

- il *Multiple Cloning Site* (MCS), cioè un tratto di sequenza in cui vengono inseriti i geni di interesse che si vogliono far esprimere;

- l'origine di replicazione, sequenza necessaria per il legame del complesso enzimatico deputato alla replicazione del plasmide.

I plasmidi sono frequentemente impiegati in esperimenti di produzione di proteine ricombinanti ed editing genomico.

L'utilizzo dei plasmidi è, tuttavia, limitato dall'efficienza di trasformazione, cioè dal numero di batteri che acquisisce il plasmide e sopravvive all'elettroporazione. Per verificare quali cellule hanno integrato il costrutto plasmidico e lo esprimono correttamente si sfruttano i geni di selezione antibiotica inclusi nel plasmide, ossia geni che esprimono molecole che permettono alla cellula batterica di sopravvivere alla somministrazione di antibiotici.

I cosiddetti plasmidi suicidi sono plasmidi che possiedono un'origine di replicazione condizionale difettiva, ovvero che è funzionale in determinate condizioni (es. temperatura); quando queste condizioni cambiano, il plasmide non è più replicabile. Tuttavia, il loro impiego è caratterizzato da un grado di efficienza relativamente basso e da un alto tasso di falsi positivi, per cui per selezionare le cellule che li esprimono correttamente è necessario condurre diversi round di selezione antibiotica, allungando i tempi dell'esperimento.

Le cellule batteriche, però, possiedono dei naturali sistemi di difesa contro il DNA esogeno, come gli enzimi di restrizione: sono enzimi che riconoscono materiale DNA estraneo in base al pattern di metilazione ed effettuano un taglio a livello di una sequenza specifica, impedendone la replicazione. Il pattern di metilazione del materiale genetico endogeno è determinato dall'attività delle metilasi, enzimi che inseriscono un gruppo a livello di una determinata sequenza, diversa per ciascuna specie batterica. Perché il materiale genetico esogeno non sia eliminato è necessario sviluppare strategie che aggirino l'attività degli enzimi di restrizione. Poiché questi si basano esclusivamente sul pattern di metilazione per distinguere il materiale genetico esogeno da quello endogeno, l'impiego di un ospite intermedio in cui sono espresse metilasi ricombinanti che producano lo stesso pattern di metilazione dell'ospite finale è l'approccio più comune. Ad oggi la procedura più economica e rapida è quella che prevede l'incubazione *in vitro* del materiale genetico con metiltransferasi commerciali che generano il pattern di metilazione desiderato.

La produzione di proteine eterologhe, ovvero proteine non naturalmente espresse dalla specie in cui è stato inserito il plasmide, aumenta il carico metabolico della cellula, rischiando di indurre uno stato di stress con conseguente attivazione di vie di risposta allo stress che diminuiscono i livelli di espressione genica e produzione proteica. Inoltre, la pressione di selezione antibiotica potrebbe portare a mutazioni genetiche in geni di interesse presenti nel plasmide, meccanismo che si attiva per

promuovere la sopravvivenza della cellula. Per questi motivi, l'inserzione di geni di interesse direttamente nel genoma batterico risulta essere una strategia più vantaggiosa per una caratteristica di maggiore stabilità genetica.

### **CRISPR-Cas9**

Il sistema CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) è un sistema naturale di immunità acquisita dei procari. Il sistema consiste in una nucleasi Cas associata a un RNA; questo RNA viene prodotto a partire da un locus genomico in cui sono archiviate – separate da *spacer* - tutte le sequenze esogene con cui sono venuti in contatto la cellula e i suoi antenati. Nel caso di ingresso di DNA estraneo, questo è riconosciuto dall'RNA che vi si appaia, guidando la nucleasi al taglio del frammento e quindi impedendo che questo venga replicato. Sintetizzando l'RNA guida in laboratorio, è possibile creare un sistema che opera tagli a livello di precise sequenze genomiche, per permettere inserzioni o delezioni. Per compiere inserzioni genomiche si sfruttano i fenomeni di ricombinazione omologa ed è necessario fornire un plasmide che contenga la sequenza da inserire nel genoma fiancheggiata da sequenze omologhe alle sequenze che si trovano ai lati della regione genomica.

CRISPR-Cas non è presente in tutte le specie probiotiche. È presente nei generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, ma non in altri; perciò, negli esperimenti i ricercatori devono trasfettare due plasmidi esprimenti la nucleasi e l'RNA guida. Per ridurre il carico metabolico, si può ricorrere al plasmide pNZDual, che esprime contemporaneamente la nucleasi Cas e l'RNA guida. Il sistema CRISPR-Cas è spesso utilizzato per ottimizzare i ceppi di batteri lattici per l'espressione di proteine eterologhe.

### **Cre-loxP**

Il sistema di ricombinazione Cre-loxP prevede l'azione della ricombinasi Cre su siti definiti loxP, che si devono trovare alle estremità della sequenza da inserire nel genoma del probiotico. Se i siti possiedono la stessa direzione, il frammento floxato viene escisso; viceversa, se i siti loxP possiedono direzione opposta, il frammento viene invertito. Negli esperimenti di ingegneria genetica, per sostituire la sequenza da floxare con un'altra è necessario fornire un plasmide di sostituzione, così come per gli esperimenti basati sul sistema CRISPR-Cas9. Per verificare che le cellule abbiano integrato ed esprimano correttamente il costrutto, nella sequenza che viene inserita nel genoma è necessario aggiungere un gene che permetta la selezione, tipicamente un gene di resistenza antibiotica.

### **Approccio top-down o approccio bottom-up?**

Per la costruzione dello *chassis*, cioè dell'ospite cellulare di elementi genetici sintetici, è importante che le funzioni metaboliche siano ridotte al minimo al fine di

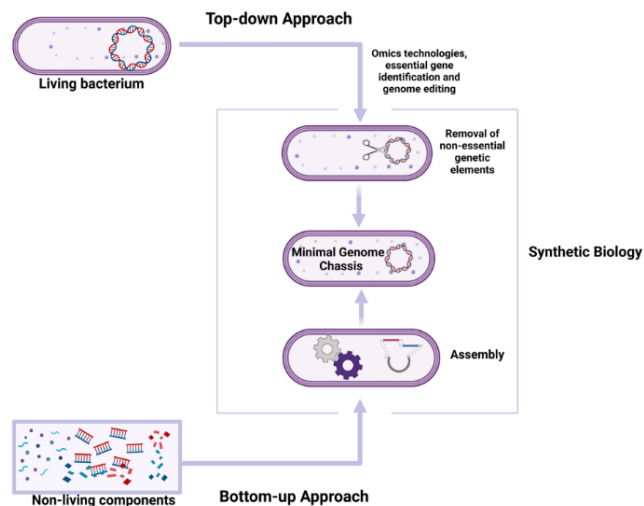
permettere l'espressione di elementi genetici esogeni evitando sovraccarichi metabolici. Si distinguono due tipi di approcci: l'approccio *top-down* e l'approccio *bottom-up* (Figura 3).

L'approccio *top-down* consiste nel rimuovere sequenze superflue per arrivare ad ottenere un genoma minimo di cui si conosca l'intera sequenza. Per applicare questo approccio è necessaria una conoscenza estremamente approfondita delle sequenze genomiche. Questo tipo di approccio si basa sulla riduzione del carico metabolico della cellula per "fare spazio" a funzioni geniche accessorie esogene. Tra i vantaggi dell'approccio *top-down* rientrano un'espressione genica più prevedibile e maggiori risorse energetiche deputate alla trascrizione e traduzione delle sequenze geniche esogene.

L'approccio *bottom-up*, invece, consiste nell'inserire oligonucleotidi sintetici in involucri cellulari. Una volta assemblati, viene promossa l'attività metabolica. Questa tecnica si basa su un'approfondita conoscenza del genoma minimo del probiotico, una procedura di sintesi *de novo*, che avvenga perfettamente, e una buona efficienza di trasformazione, cioè di inserimento degli oligonucleotidi sintetici all'interno dell'involucro cellulare.

Tra i due approcci utilizzati nella ricerca prevale l'approccio *top-down*, perché richiede meno tempo per l'ottimizzazione della procedura.

Il profilo di espressione deve essere prevedibile, perciò è da prediligere l'utilizzo di sequenze tipiche del genere o della specie in cui verrà inserito l'elemento genico esogeno.



**Figura 3.** L’approccio “top-down” prevede l’identificazione degli elementi essenziali e non essenziali e la costruzione di uno scheletro minimale del probiotico, rimuovendo o sostituendo i genomi di probiotici esistenti. Questo approccio reduce la complessità del genoma, mantenendo solo gli elementi minimi essenziali per la vitalità. Nella tecnica “bottom-up”, i componenti essenziali, non viventi, sono sintetizzati e assemblati per costruire uno scheletro probiotico minimale vivente, assemblando molecole non biologiche e/o biologiche (modificato da Mugwanda et al., 2023).

### Sistemi inducibili

Si possono sfruttare anche i sistemi inducibili, cioè sistemi che attivano l’espressione genica in risposta alla presenza di una molecola. Un esempio di sistema di espressione inducibile è il sistema basato sulla nisina (NICE system, *Nlsin Controlled Expression* system). L’istidina-chinasi NisK, localizzata sulla membrana, rileva la presenza della nisina, si autofosforila e trasferisce un gruppo fosfato alla proteina regolatrice NisR. La NisR, attivata, a sua volta attiva il promotore genico NisA, che permette la trascrizione dei geni che si trovano a valle di esso. Anche *E. coli* possiede un sistema inducibile naturale, ovvero il sistema basato su IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalattopiranoside) che è un analogo dell’allolattosio che induce l’espressione dei geni controllati dall’operone lac. Per quanto concerne l’utilizzo di sistemi di espressione inducibili, è preferibile l’impiego di sistemi nativi piuttosto che di sistemi eterologhi, per sfruttare la naturale compatibilità.

### Prebiotici

I prebiotici sono fonte di nutrienti per i probiotici e ne favoriscono la crescita permettendo la colonizzazione del tratto gastrointestinale. Si tratta principalmente di carboidrati complessi, costituiti da ripetizioni più o meno diverse di zuccheri semplici. I principali carboidrati complessi classificati come prebiotici sono gli

oligosaccaridi del latte umano (HMO), i fruttooligosaccaridi (FOS), gli xilooligosaccaridi (XOS) e i galattooligosaccaridi (GOS) (Murali e Mansell et al., 2024). Con l'ingegnerizzazione di probiotici al fine di conferire loro la capacità di ottenere nutrienti dai prebiotici è possibile facilitare la loro sopravvivenza e colonizzazione del tratto gastrointestinale, senza che questi entrino in competizione per sostanze nutrienti con la popolazione microbica già presente.

## **SPECIE INGEGNERIZZATE**

### ***Lactococcus lactis***

Il *Lactococcus lactis* è un batterio anaerobio facoltativo Gram positivo, definito *Generally Regarded As Safe* (GRAS) dall'agenzia americana *Food And Drug Administration* (FDA). Grazie ai numerosi ceppi disponibili e al completo sequenziamento del genoma è un probiotico molto versatile. È spesso utilizzato per produrre alimenti fermentati.

I fattori trifoglio (TFF, *Trefoil Factors*) sono peptidi prodotti a livello del tratto gastrointestinale coinvolti nel mantenimento e nella riparazione dei danni alla mucosa intestinale. Sono chiamati così per la loro struttura tridimensionale e ne sono stati studiati tre diversi tipi che vengono espressi diversamente in base alla zona del tratto gastrointestinale. La somministrazione di *L. lactis* ingegnerizzato per la produzione di nanocorpi legati a fattori trifoglio ha favorito la rigenerazione della mucosa intestinale in topi affetti da colite indotta da destrano solfato (Vandenbroucke et al., 2004).

*L. lactis* è anche stato ingegnerizzato per la secrezione di nanocorpi che sequestrano il TNF- $\alpha$  in pazienti affetti da colite ulcerosa e per la secrezione della molecola microbica antiinfiammatoria (MAM, *Microbial Anti-inflammatory Molecule*), che *in vitro* interferisce con la produzione di NF- $\kappa\beta$  (Vandenbroucke et al., 2010).

*L. lactis* è anche ad oggi l'unico probiotico ingegnerizzato che è stato valutato in uno studio clinico di fase II a 3 diversi dosaggi su pazienti affetti da colite ulcerosa moderata. AG011, infatti, rilascia l'interleuchina 10 umana, molecola con effetto antiinfiammatorio.

### ***Escherichia coli***

I ceppi di *E. coli* sono tra più utilizzati negli esperimenti di ingegnerizzazione probiotica grazie alle loro caratteristiche immunomodulatorie e probiotiche. Inoltre, essendo un organismo modello sono disponibili numerosi strumenti di editing. *EcN*, un ceppo di *E. coli*, possiede naturalmente i plasmidi pMUT1 e pMUT2, definiti



plasmidi criptici perché non conferiscono un particolare fenotipo al ceppo batterico (Murali e Mansell et al., 2024). La non trasferibilità di questi due plasmidi e la sua elevata stabilità genetica rendono *EcN* particolarmente vantaggioso negli esperimenti di editing genetico.

In un esperimento di editing genetico, *EcN* è stato ingegnerizzato per la produzione di 3'-idrossibutirrato (3'-HB), utile a ripristinare il corretto equilibrio tra linfociti T regolatori e linfociti T effettori, contrastando l'eccessiva risposta immunitaria caratteristica delle MICI. Gli effetti benefici ottenuti dalla somministrazione orale di *EcN* ingegnerizzato per la produzione di 3'-HB sono risultati migliori rispetto a quelli apportati dalla semplice somministrazione orale di 3'-HB.

*EcN* è stato ingegnerizzato per produrre proteine *Probiotic-Associated Therapeutic Curli Hybrids* (PATCH) (Praveschotinunt et al., 2019). Le proteine curli sono fibre extracellulari naturalmente prodotte da enterobatteri, che partecipano alla formazione di biofilm batterici. Nel plasmide i geni PATCH e i geni necessari per la secrezione delle proteine PATCH si trovano sotto il controllo di un promotore inducibile, ovvero  $P_{BAD}$ , che attiva la trascrizione di geni a valle in presenza di arabinosio. Le proteine curli sono fuse a un dominio terapeutico, il fattore trifoglio 3 (TFF3), che ha effetti immunomodulatori. Una volta secrete, le proteine si autoassemblano e stimolano i sistemi di riparazione mucosale dell'ospite. Il plasmide è stato trasfettato in un *EcN* mutante i cui i geni cromosomici delle proteine curli sono stati deleti per evitare interferenze con l'espressione di proteine curli ricombinanti. *EcN* ingegnerizzato è stato somministrato in modelli murini prima, durante e dopo l'induzione di colite da destrano solfato ed è stato rilevato un miglioramento dell'infiammazione e una diminuzione delle cellule Th17.

*EcN* è stato ingegnerizzato per produrre 3'-HB in modelli di colite (Yan et al., 2021). Nel ceppo *EcNL4*, considerato possedere migliori caratteristiche per la produzione di 3'-HB in condizioni microaerobiche, è stato utilizzato il plasmide suicida pRE112, che è stato integrato nel cromosoma tramite ricombinazione omologa in una regione ad alta attività di espressione. È stato inoltre osservato un aumento delle specie microbiche appartenenti ai generi *Akkermansia* e *Clostridium*, che favoriscono la differenziazione delle cellule T in cellule Th<sub>reg</sub>. In modelli di colite indotta da destrano solfato è stata valutata l'efficacia della somministrazione orale di *EcNL4* rispetto a quella di *EcN*, o di una soluzione di 3'-HB o di PBS (controllo negativo). Nei topi con colite trattati con *EcNL4* si è evidenziata una riduzione dei sintomi, e i livelli di 3'-HB erano significativamente più alti rispetto al gruppo trattato con *EcN* normale.

### ***Bifidobacterium longum***

*B. longum* è un batterio Gram positivo che costituisce la maggior parte del microbiota intestinale infantile e per questo motivo un candidato per la progettazione di probiotici ingegnerizzati per l'infanzia.

*B. longum* è stato ingegnerizzato per la produzione dell'enzima superossido dismutasi, fondamentale per contrastare lo stress ossidativo e con un ruolo primario nella patofisiologia della colite ulcerosa. In seguito alla somministrazione di *B. longum* ingegnerizzato per la produzione di superossido dismutasi è stata osservata una diminuzione della concentrazione delle interleuchine infiammatorie 6 e 8 e del TNF- $\alpha$ .

*B. longum* è stato inoltre ingegnerizzato per la produzione dell'ormone melanotropo (*B. longum*-PDGMSH2) in un modello di colite da destrano solfato. L'ormone melanotropo ( $\alpha$ -MSH), derivato dalla proiomelanocortina, ormone con azione antiinfiammatoria, riduce la produzione di molecole pro-infiammatorie e stimola la produzione di molecole antiinfiammatorie, come l'interleuchina 10. L' $\alpha$ -MSH possiede una breve emivita *in vivo*, per cui la somministrazione *in situ* tramite un sistema ingegnerizzato risulta ottimale per offrire il tempo necessario a esercitare l'effetto benefico (Wei et al., 2016).

### ***Bacteroides ovatus***

*B. ovatus*, batterio del microbiota del colon, è stato ingegnerizzato per la produzione del fattore di crescita trasformante beta (TGF- $\beta$ ), indotta dalla somministrazione di xilano. TGF- $\beta$  è un fattore di crescita delle cellule epiteliali che favorisce la ricostituzione della barriera intestinale. *B. ovatus* possiede l'enzima xilanasasi, che degrada lo xilano, polisaccaride di origine vegetale, in acidi grassi a catena corta fondamentali per il benessere intestinale. Il gene del TGF- $\beta$  è stato posto sotto il controllo del promotore del gene della xilanasasi, cosicché la somministrazione di xilano determini l'attivazione del promotore e conseguente produzione di TGF- $\beta$ . In questo modo, è possibile controllare temporalmente la secrezione. È stato somministrato per via orale in topi con colite indotta da destrano solfato ed è stata osservata una generale diminuzione dei danni patologici macroscopici caratteristici della colite e una riduzione dell'espressione di marcatori dell'infiammazione (Pesce et al., 2022).

### ***Lactobacillus paracasei***

In modelli animali di colite ulcerosa è stata studiata l'attività terapeutica di *L. paracasei* sottospecie *paracasei* F19, ingegnerizzato con la fosfolipasi umana specifica per le N-acilfosfatidiletanolammine (NAPE-PLD), ormoni enterici

rilasciati dall'intestino tenue in seguito al metabolismo dei grassi. Questo enzima converte le N-acilfosfatidiletanolamine in palmitoiletanolamide (PEA), che stimola la riparazione cellulare con effetti antiinfiammatori. L'attività della fosfolipasi è indotta dalla somministrazione di dosi molto basse di palmitato esogeno, strategia che permette di controllare l'attività enzimatica. La produzione *in situ* di palmitoiletanolamide ad opera di NAPE-PLD risulta più vantaggiosa rispetto alla somministrazione diretta a causa della sua elevata lipoficità, che ne riduce la biodisponibilità (Pesce et al., 2022).

### ***Lactobacillus lactis***

È stato condotto uno studio su 10 pazienti affetti da morbo di Crohn in maniera moderata a cui è stato somministrato il *L. lactis* MG1363 ingegnerizzato (*LL-Thy12*), in cui il gene dell'enzima timidilato sintasi è stato sostituito col gene dell'interleuchina 10, citochina con proprietà antiinfiammatorie, a cui è stato fuso un segnale di secrezione così da indurre il rilascio nel lumen intestinale una volta generata (Braat et al., 2006). Durante lo studio uno dei pazienti ha interrotto la partecipazione a causa di frequenti crisi di vomito, ma il resto dei pazienti ha mostrato solamente effetti collaterali minori, come flatulenza, che è comunque caratteristica del morbo di Crohn. Il biocontenimento è assicurato dal fatto che il *L. lactis* *subspecie* MG1363:

- è un batterio comunemente utilizzato per la fermentazione degli alimenti;
- è impossibilitato a riprodursi in assenza di timina e timidina;
- il transgene è incorporato nel genoma batterico, così da prevenire eventuale trasmissione orizzontale ad altri organismi.

L'assenza di un gruppo di soggetti controllo nello studio clinico non permette di trarre conclusioni sulla sicurezza clinica. Tuttavia, l'assenza di effetti collaterali a lungo termine e la mitigazione della malattia indicano *LL-Thy12* come un potenziale probiotico di successo.

## CONCLUSIONI

L'incidenza delle MICI sta aumentando a livello globale e si rende sempre più necessario sviluppare nuove terapie che aiutino i pazienti a raggiungere e mantenere la remissione. Un interessante strategia terapeutica può essere l'impiego di probiotici, che sono già comunemente utilizzati in caso di disbiosi della flora intestinale. Tuttavia, diverse caratteristiche, come differenze nel meccanismo d'azione tra i vari ceppi, il rischio di produzione di molecole antimicrobiche non specifiche e la competizione con la flora residente per i nutrienti hanno portato i ricercatori a ingegnerizzare i probiotici. Gli strumenti e le tecniche di manipolazione genetica permettono l'ottimizzazione dell'attività terapeutica dei probiotici, rendendoli di fatto dei veri e propri agenti terapeutici che esercitano la loro azione terapeutica *in situ* solo in presenza di determinati composti, prevenendo o riducendo lo sviluppo di effetti collaterali. È necessario prestare attenzione a diversi aspetti, soprattutto all'aspetto del contenimento biologico. Con il termine contenimento biologico si intende rendere il microrganismo ingegnerizzato non in grado di replicare in natura. Una strategia di contenimento biologico si basa sull'impiego di specie auxotrofe, cioè specie che non sono in grado di sintetizzare i nutrienti necessari alla propria crescita e che quindi sopravvivono solo se il metabolita viene fornito. Un altro aspetto fondamentale da valutare è la competizione che si viene a creare tra il probiotico e la flora microbica locale per i nutrienti disponibili. È necessario ottimizzare strategie che permettano ai probiotici ingegnerizzati di sopravvivere per il tempo necessario a formare colonie resistenti, come l'ingegnerizzazione per il consumo di metaboliti di origine esogena. Si rende necessario sequenziare il genoma di tutte le specie batteriche costituenti il microbiota per poter comprendere al meglio la relazione microbiota-ospite e per poter sviluppare protocolli di manipolazione genetica che permettano di lavorare anche su organismi diversi dagli organismi modello. I probiotici ingegnerizzati hanno un ottimo potenziale come strategia terapeutica per le malattie infiammatorie croniche intestinali, anche nella direzione della medicina personalizzata.

## BIBLIOGRAFIA

- Agrawal M, Jess T. Implications of the changing epidemiology of inflammatory bowel disease in a changing world. *United European Gastroenterol J.* 2022 Dec;10(10):1113-1120. doi: 10.1002/ueg2.12317.
- Borowitz SM. The epidemiology of inflammatory bowel disease: Clues to pathogenesis? *Front Pediatr.* 2023 Jan 17;10:1103713. doi: 10.3389/fped.2022.1103713.
- Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, van Deventer SJ, Neiryneck S, Peppelenbosch MP, Steidler L. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006 Jun;4(6):754-9. doi: 10.1016/j.cgh.2006.03.028.
- Cai Z, Wang S, Li J. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review. *Front Med (Lausanne).* 2021 Dec 20;8:765474. doi: 10.3389/fmed.2021.765474.
- Dehò G, Galli E. *Biologia dei microrganismi.* Milano: Casa Editrice Ambrosiana 2018
- Guan Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res.* 2019 Dec 1;2019:7247238. doi: 10.1155/2019/7247238.
- Pesce M, Seguella L, Del Re A, Lu J, Palenca I, Corpetti C, Rurgo S, Sanseverino W, Sarnelli G, Esposito G. Next-Generation Probiotics for Inflammatory Bowel Disease. *Int J Mol Sci.* 2022 May 13;23(10):5466. doi: 10.3390/ijms23105466.
- Praveschotinunt P, Duraj-Thatte AM, Gelfat I, Bahl F, Chou DB, Joshi NS. Engineered *E. coli* Nissle 1917 for the delivery of matrix-tethered therapeutic domains to the gut. *Nat Commun.* 2019 Dec 6;10(1):5580. doi: 10.1038/s41467-019-13336-6.
- Murali SK, Mansell TJ. Next generation probiotics: Engineering live biotherapeutics. *Biotechnol Adv.* 2024 May-Jun;72:108336. doi: 10.1016/j.biotechadv.2024.108336.
- Yan X, Liu XY, Zhang D, Zhang YD, Li ZH, Liu X, Wu F, Chen GQ. Construction of a sustainable 3-hydroxybutyrate-producing probiotic *Escherichia coli* for treatment of colitis. *Cell Mol Immunol.* 2021 Oct;18(10):2344-2357. doi: 10.1038/s41423-021-00760-2.