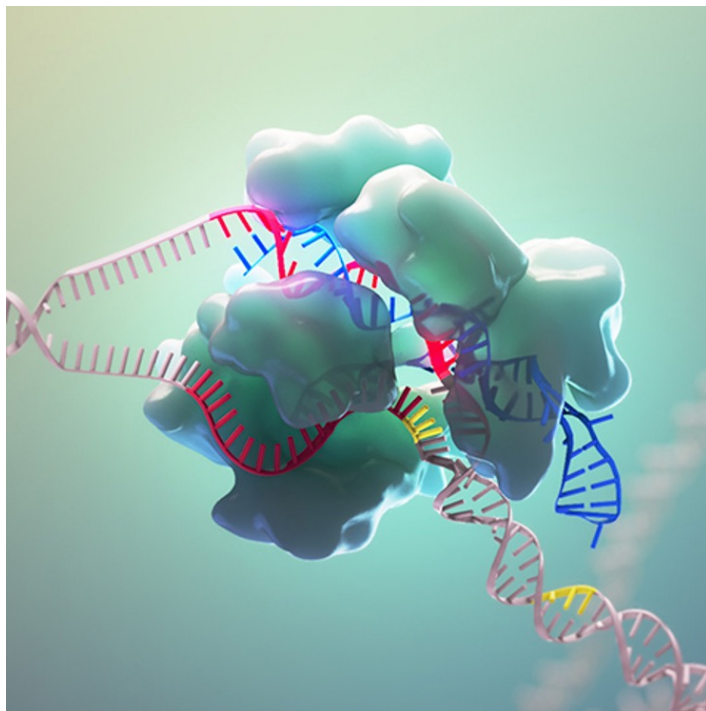




Centro Università degli Studi di Milano - Scuola per la diffusione delle Bioscienze

EDITING GENOMICO CON CRISPR

Utilizzo di tecniche di biologia molecolare per modificare il genoma degli organismi



Università degli Studi di Milano

1. INTRODUZIONE

La possibilità di modificare precisamente il genoma di una cellula, un virus o un intero organismo è di estrema importanza non solo per ampliare le nostre conoscenze di biologia molecolare ma anche in ambito medico - per la cura di molte malattie genetiche, e in agricoltura - nella produzione di piante geneticamente migliorate. Le tecniche che permettono di introdurre modifiche specifiche nel DNA sono dette nel complesso “tecniche di editing genomico”.

2. BREVE STORIA DELL'EDITING GENOMICO E DI CRISPR

La storia dell'editing genomico ha radici che risalgono alla fine degli anni '70 con la scoperta delle endonucleasi di restrizione. Questi enzimi batterici in grado di tagliare il DNA in posizioni specifiche hanno permesso un primo e fondamentale passo verso la manipolazione del DNA.

Tuttavia, la vera rivoluzione è avvenuta nei primi anni 2000 con l'utilizzo in vivo delle Nucleasi Zinc-Finger (ZFNs), enzimi di restrizione che possono essere ingegnerizzati per tagliare una sequenza specifica di DNA a scelta (Fig.1a). Dal 2011 le ZNF sono state affiancate e in parte soppiantate dalla tecnologia TALEN (acronimo di Transcription activator-like effector nucleases), più economica e precisa, ma ancora di complicata realizzazione. Infine, il 2012 ha segnato il punto di svolta nell'editing del genoma, con l'avvento della tecnica CRISPR/Cas. Tutte e tre queste tecniche, indipendentemente dal meccanismo di localizzazione del taglio, sfruttano poi i naturali meccanismi di riparazione del DNA delle cellule, per introdurre modifiche nel genoma (vedi Box: 'I meccanismi di riparazione del DNA').

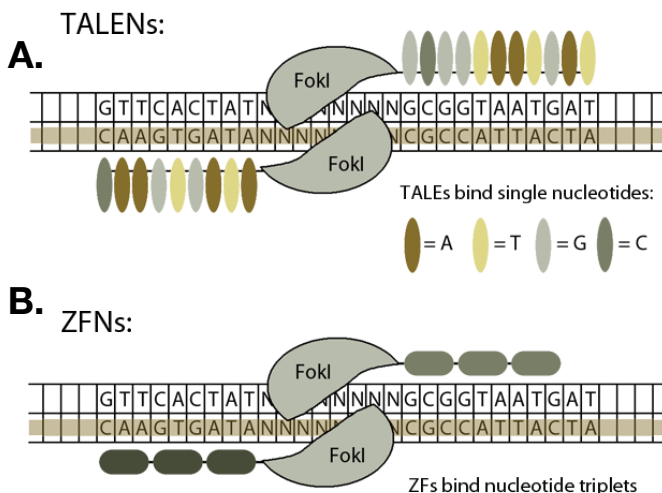


Fig.1: TALENs (A) e ZFNs (B) sono proteine modulari costruite da una serie di domini proteici. Ogni dominio è leggermente diverso dagli altri e riconosce una sequenza di 3 basi azotate (nel caso delle ZFNs) o una particolare base azotata (nel caso delle TALENs). Combinando più domini nel modo opportuno si può costruire una grossa proteina che va a legare una sequenza specifica. Entrambe le classi di proteine contengono inoltre un pezzo della nucleasi FokI. Questo frammento preso singolarmente è di per sé inattivo. Utilizzando però due proteine modulari, alla giusta distanza e con il giusto orientamento, è possibile portare insieme le due metà dell'enzima e ricostituirne l'attività endonucleasica. In questo modo si opera un taglio nel DNA in corrispondenza

di una determinata sequenza. (Fonte immagine: <https://www.xenbase.org/xenbase/static-xenbase/CRISPR.jsp>)

La storia della tecnica CRISPR inizia nel 1987 con la scoperta all'interno del genoma di E.coli, e in seguito in molti altri batteri, di brevi sequenze palindromiche ripetute, raggruppate a intervalli regolari, prontamente ribattezzate CRISPR dall'acronimo inglese: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. Le CRISPR agiscono insieme a una classe di endonucleasi chiamate Cas (CRISPR associated) per riconoscere e distruggere il genoma proveniente da un'infezione virale.

Anni di ricerca hanno portato, nel 2020, alla descrizione puntuale di come CRISPR/Cas possono essere sfruttate per l'editing genomico. La ricerca è valsa il premio Nobel per la chimica alle

scienziate Emanuelle Charpentier e Jennifer Doudna. Da allora, la tecnologia CRISPR ha conosciuto sviluppi e miglioramenti costanti, con un numero crescente di campi di applicazione. Tra le molte proteine Cas descritte fino ad oggi la più famosa ed utilizzata è Cas9 e su di essa ci focalizzeremo per buona parte di questa dispensa.

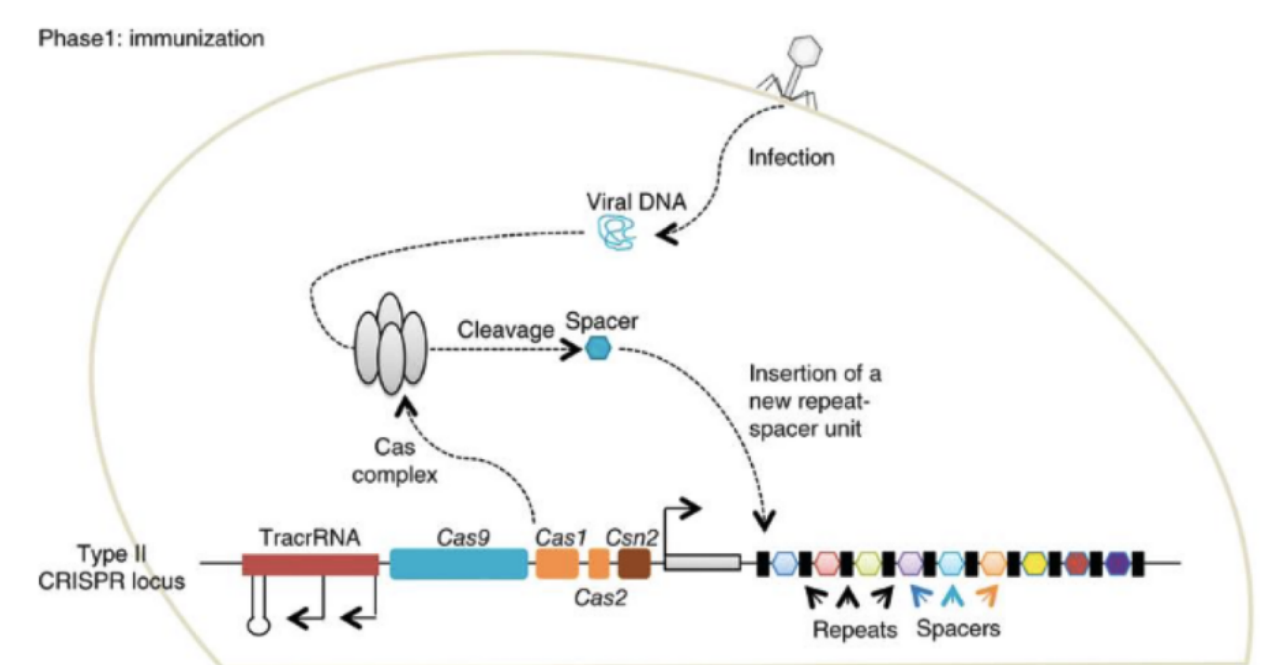


Fig.2 Le prime fasi del meccanismo di difesa antivirale mediato da CRISPR: Il locus CRISPR sul cromosoma batterico contiene i geni per la sintesi delle proteine Cas, per il tracrRNA e una collezione di ripetizioni/sequenze spaziatrici, detto array CRISPR. A seguito di un'infezione da parte di un virus a DNA mai incontrato prima, un complesso di proteine tra cui Cas1 e Cas2, riconoscono e ritagliano un frammento del DNA virale e lo inseriscono all'interno dell'array CRISPR, dove diventa un nuovo spacer. In sostanza gli spacer contengono ognuno un frammento di DNA di un virus diverso. L'array CRISPR viene poi trascritto dal macchinario cellulare per formare molti crRNA. Ogni crRNA si associa a una molecola di tracrRNA per formare l'RNA guida che, in caso di una successiva infezione, guiderà Cas9 sul DNA virale per distruggerlo. (Fonte: Mali, P., Esvelt, K. & Church, G. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* **10**, 957–963 (2013).)

3. CRISPR/Cas: UN MECCANISMO DI DIFESA BATTERICO

Quando un determinato virus attacca una cellula batterica per la prima volta, Cas1 e Cas2, due enzimi della famiglia delle Cas, riconoscono e ritagliano brevi frammenti del materiale genetico virale e li integrano all'interno del genoma batterico in corrispondenza delle regioni CRISPR (Fig.2). A seguito di una seconda infezione da parte dello stesso virus, il macchinario molecolare batterico trascrive le informazioni di questa regione di DNA per generare brevi frammenti di RNA denominati crRNA (crispr RNA). La molecola di crRNA si fonde con un secondo frammento di RNA (tracrRNA) per formare il complesso crRNA:tracrRNA, detto comunemente RNA guida (gRNA). Questo complesso si associa all'enzima Cas9 e lo guida sul materiale genetico virale, nella posizione

specificata dal crRNA. A questo punto l'endonucleasi Cas9 taglia il genoma virale distruggendo l'invasore. Avere frammenti di materiale genetico di più virus archiviati nella regione CRISPR, consente quindi al macchinario molecolare batterico di rispondere rapidamente a successivi attacchi da parte di quegli stessi virus.

Affinchè Cas9 possa legare e tagliare il DNA devono verificarsi due condizioni:

- 1) Il crRNA deve appaiarsi alla rispettiva sequenza complementare.
- 2) Questo legame deve verificarsi accanto a un particolare regione chiamata PAM (Protospacer Adjacent Motif). Si tratta di sequenze composte solo da tre nucleotidi (es.: NGG, dove N indica uno qualsiasi dei 4 nucleotidi), che essendo estremamente brevi, si trovano molto di frequente nel DNA.

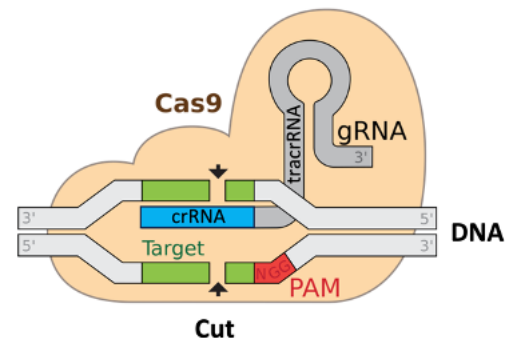


Fig.3 Geometria del complesso gRNA/Cas9/DNA.

4. EDITING GENOMICO CON CRISPR

Gli scienziati hanno capito che il macchinario molecolare del sistema CRISPR/Cas poteva essere sfruttato per tagliare sequenze di DNA in posizioni specifiche da loro scelte. Il sistema è stato ingegnerizzato in modo da poter funzionare su qualsiasi sequenza di DNA e non solo sul DNA di un virus invasore. Inoltre il crRNA e il tracrRNA sono stati fusi in una unica molecola di RNA (gRNA). L'unico requisito è la presenza di una sequenza PAM adiacente alla regione che si vuole modificare. Questo aspetto è cruciale per la versatilità del sistema CRISPR/Cas9, perché consente agli scienziati di indirizzare la proteina Cas9 praticamente in qualsiasi regione del DNA. Sfruttando poi i meccanismi naturali di riparazione del DNA delle cellule, è possibile sostituire o eliminare la sequenza originale in tali posizioni, per esempio allo scopo di correggere una mutazione.

La vera rivoluzione del sistema CRISPR sta nell'utilizzo di una guida a RNA. Il riconoscimento della sequenza bersaglio viene effettuata direttamente per complementarità delle basi, e non per mezzo di domini proteici. Questo offre un enorme vantaggio agli scienziati. Il design e la sintesi di un filamento di RNA è infatti un processo molto più veloce, economico e versatile della produzione di una proteina, come avveniva nel caso delle tecniche ZFNs e TALENs. Inoltre, la molecola di gRNA è molto più piccola e facile da inserire nelle cellule da modificare.

5. APPLICAZIONI DELLA TECNOLOGIA CRISPR

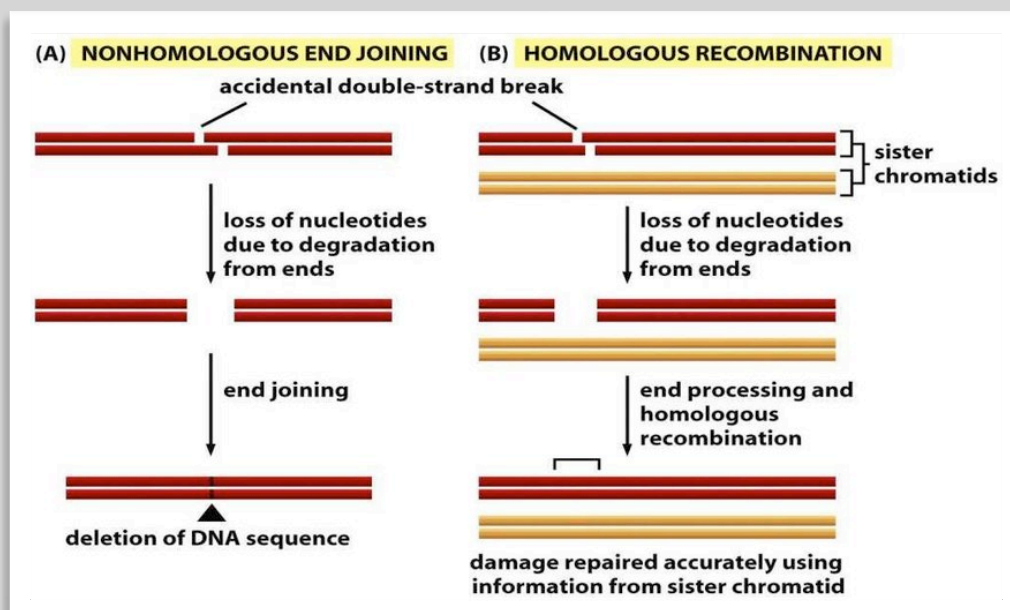
Il sistema CRISPR/Cas9 sfrutta il meccanismo del NHEJ per creare **Knock-Out** genici, ovvero organismi in cui una particolare proteina non è più prodotta. In pratica, si disegna un RNA guida in corrispondenza del gene che vogliamo inattivare e lo si introduce assieme alla proteina Cas9 nelle cellule da modificare. L'RNA guida porterà Cas9 in corrispondenza del gene e opererà un taglio. A

questo punto la cellula utilizzerà il NHEJ per riparare la lesione, generando però una delezione che con tutta probabilità altererà il gene. Il risultato è che la cellula non riuscirà più a produrre una proteina funzionante. Poiché il DNA della cellula è stato modificato in modo permanente, la mutazione sarà passata a tutte le sue cellule figlie.

I MECCANISMI DI RIPARAZIONE DEL DNA

La presenza di lesioni del DNA è un grave segnale di pericolo per la cellula. Per questo esiste un macchinario cellulare, altamente conservato, che provvede al monitoraggio e alla pronta riparazione di eventuali punti di rottura. Esistono due modalità attraverso le quali la cellula è in grado di riparare il DNA in corrispondenza di rotture del doppio filamento:

- **Non-homologous end-joining (NHEJ, unione non omologa delle estremità):** è il sistema di riparazione veloce. Le due estremità del DNA dove è avvenuto il taglio vengono riconosciute da un complesso proteico che le riattacca in modo 'grossolano', introducendo spesso errori, in particolare delezioni. In natura, è la modalità di riparazione più frequente e può avvenire in tutti gli stadi del ciclo cellulare di tutte le cellule. È l'unico meccanismo di riparazione negli organismi aploidi.
- **Homologous recombination (ricombinazione omologa):** è un sistema di riparazione più preciso ma richiede la presenza, nelle vicinanze del DNA danneggiato, del cromatide fratello o del cromosoma omologo. Avviene quindi essenzialmente solo quando la cellula è in fase di mitosi o meiosi. Un complesso proteico riconosce il taglio, ne digerisce le estremità e utilizza il cromatide fratello/cromosoma omologo come stampo per riparare l'errore. In questo caso la lesione viene riparata in modo accurato senza che vengano introdotte mutazioni.



Oltre ad eliminare una proteina, CRISPR può essere utilizzato per **inserire un nuovo gene** o per modificarne uno che sia per esempio associato a una patologia. In questo caso oltre a Cas9 e all'RNA guida viene fornito un pezzo di DNA omologo che contiene la versione corretta del gene. Dopo il taglio da parte di Cas9, la cellula, in presenza della copia corretta del gene da noi fornita, utilizzerà la ricombinazione omologa per ricopiare la sequenza giusta, su quella originaria, correggendo quindi l'errore.

In **ambito vegetale**, le modificazioni mirate del DNA rendono molto più preciso e rapido lo sviluppo di varietà di piante agricole, rendendole per esempio più resistenti agli agenti patogeni e alle diverse condizioni ambientali e climatiche, più produttive, più ricche di principi nutritivi e, dunque, in grado di nutrire la popolazione umana sempre in crescita. Grazie all'editing genomico con CRISPR, ad esempio, è stato possibile modificare due geni della manioca (CYP79D1 and CYP79D2 che producono due glucosidi **cianogeni**, la linamarina e la lotaustralina che sono tossiche per l'uomo e che causano la malattia neurodegenerativa Konzo) rendendo più sicuro l'utilizzo di questa radice anche nei paesi poveri dove costituisce parte integrante dell'alimentazione umana.

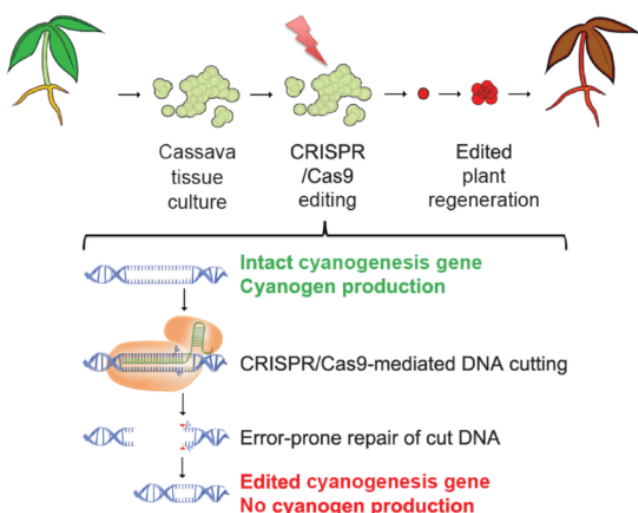


Fig.4 CRISPR-Cas9-mediated knockout of CYP79D1 and CYP79D2 in cassava attenuates toxic cyanogen production
(Fonte: Gomez et al., Front. Plant Sci., 17 March 2023, Sec. Plant Biotechnology Volume 13 - 2022)

Le applicazioni del CRISPR/Cas9 sono enormi anche in **ambito medico** (diagnostico e terapeutico): potenzialmente, si potrebbero curare malattie genetiche quali distrofia muscolare e fibrosi cistica, e malattie neurologiche come Alzheimer e Parkinson. Il macchinario CRISPR/Cas9 potrebbe essere utilizzato persino per riparare danni subiti dal DNA durante la vita della cellula, come succede nelle cellule cancerogene o le mutazioni somatiche che causano il Parkinson non ereditario.

A differenza delle applicazioni sugli organismi animali e vegetali, le pratiche dell'editing genomico sull'organismo umano sono ancora agli albori e – come già detto – per la maggior parte si svolgono sul piano della ricerca e dello studio in laboratorio, in vitro, su colture cellulari. Il rapido avanzare della ricerca e l'esplosione di nuove applicazioni di questa tecnologia, offrono incoraggianti prospettive per il futuro.

L'utilizzo di versioni modificate dell'enzima Cas9, e la scoperta di nuove proteine Cas hanno esteso le possibili applicazioni del sistema CRISPR ad aspetti che vanno oltre la semplice introduzione di rotture del doppio filamento di DNA. Versioni ingegnerizzate di Cas9 possono ad esempio essere utilizzate per visualizzare o addirittura controllare l'accensione/spegnimento di un determinato gene. Altre proteine Cas caratterizzate più di recente, utilizzano meccanismi leggermente diversi. Cas12 per esempio utilizza un RNA guida più semplice e taglia il DNA in un modo diverso da Cas9, rendendolo una valida alternativa a Cas9 stesso. Cas13 infine è in grado di tagliare selettivamente le molecole di RNA a singolo filamento, estendendo la possibilità di editing anche a questo acido nucleico.

Ex vivo genome editing

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | REPORT


CANCER

Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells

Waseem Qasim,^{1,2*} Hong Zhan,³ Sujith Samarasinghe,² Stuart Adams,² Persis Amrolia,^{1,2} Stan Stafford,¹ Katie Butler,¹ Christine Rivat,² Gary Wright,² Kathy Somana,² Sara Ghorashian,² Danielle Pinner,² Gul Aksoy,² Kimberly Gilmour,² Giovanna Lucchini,² Sarah Ingle,² William Mifsud,² Robert Chiesa,² Karl S. Peggs,² Lucas Chan,² Farzin Farzaneh,² Adrian J. Thrasher,² Ajay Vora,² Martin Pule,² Paul Veys²

'Designer cells' reverse one-year-old's cancer

By James Gallagher
March 2019 | 2019 | News website
© 5 November 2019



In vivo genome editing

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

BRIEF REPORT

CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia

H. Frangoul, D. Altshuler, M.D. Cappellini, Y.-S. Chen, J. Domm, B.K. Eustace, J. Foell, J. de la Fuente, S. Grupp, R. Handgretinger, T.W. Ho, A. Kattamis, A. Kernytsky, J. Lekstrom-Himes, A.M. Li, F. Locatelli, M.Y. Mapara, M. de Montalembert, D. Rondelli, A. Sharma, S. Sheth, S. Soni, M.H. Steinberg, D. Wall, A. Yen, and S. Corbacioglu

- Sickle cell disease
- Beta thalassemia
- Non-small-cell lung cancer

- Eye Disease - Leber Congenital Amaurosis
- Spinal muscular atrophy
- Urinary tract infections
- Hereditary transthyretin amyloidosis

