

LE
SCIENZE
live



LE SCIENZE *live*

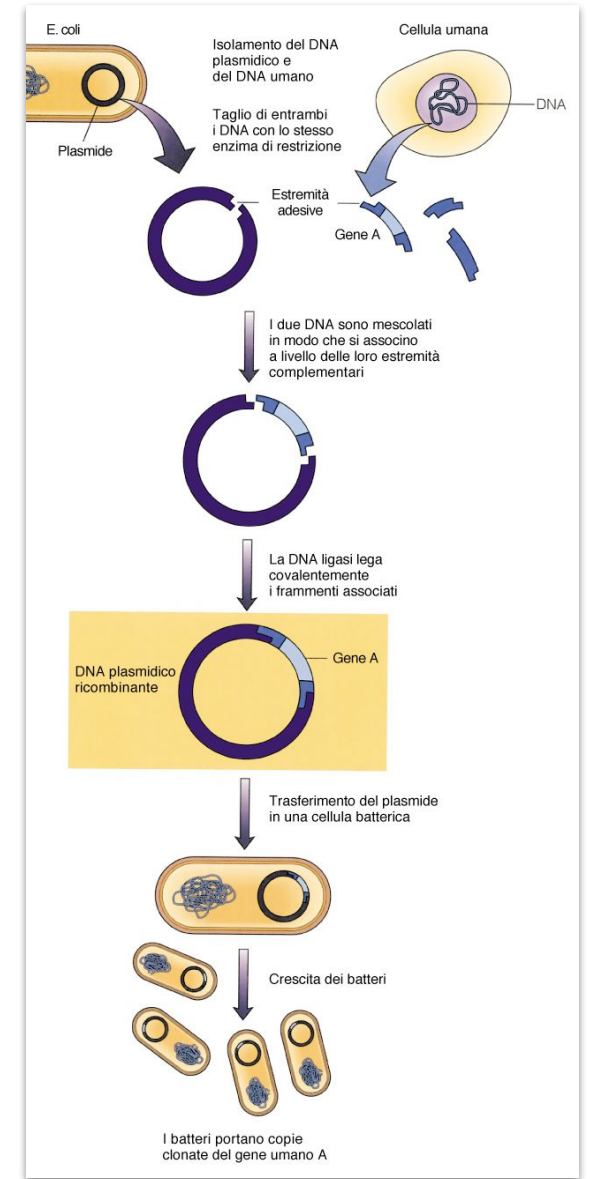
Genome editing e CRISPR
Un taglio tutto nuovo
per la biologia molecolare
Alessio Rochira

Dal gene editing al genome editing

Il gene editing è la modifica *in vitro* della sequenza di un gene tramite delezione di parti di esso o inserimenti di altre sequenze (il classico Clonaggio molecolare).

Perché la modifica si esprima in un sistema *in vivo* è necessario che avvenga un trasferimento del gene e la sua **ricombinazione** con il genoma ospite.

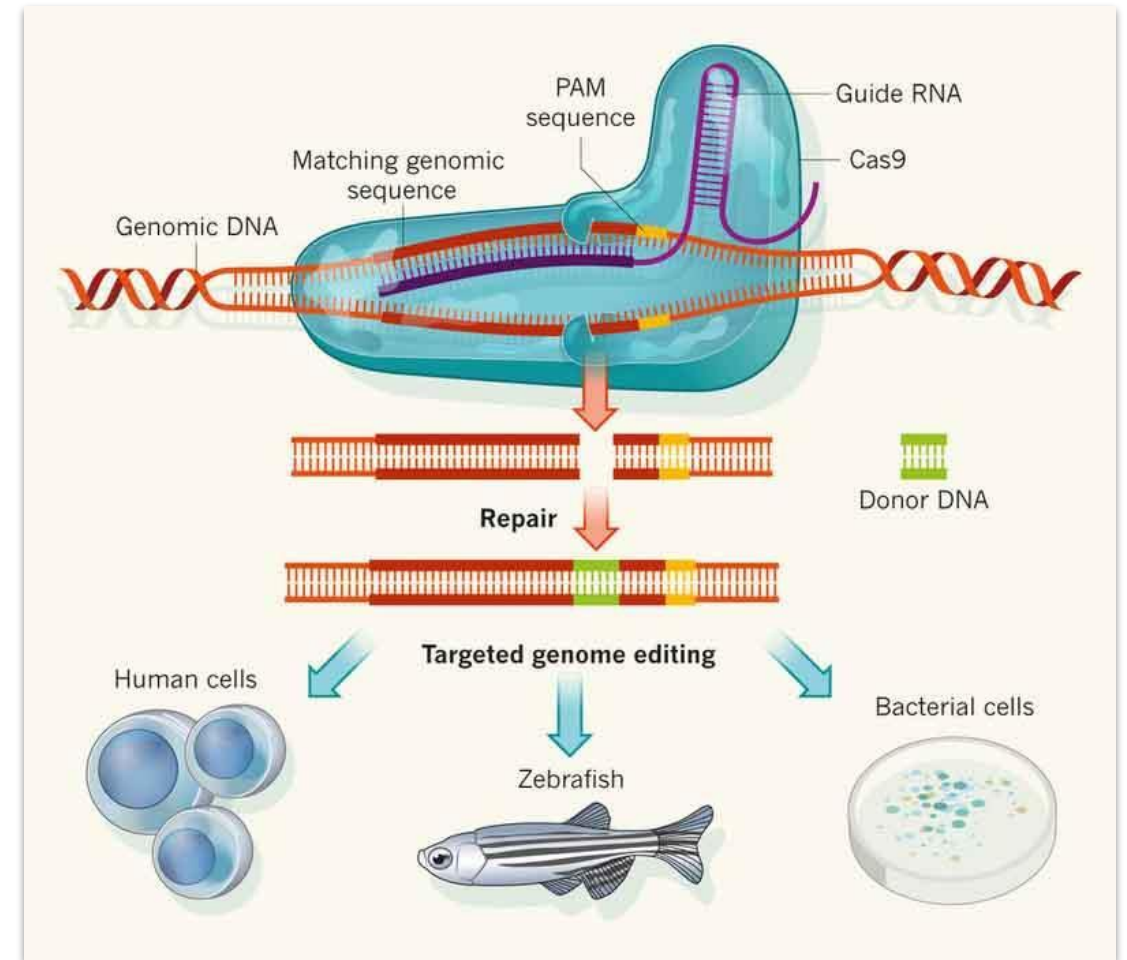
Il processo di trasferimento è piuttosto semplice nei **procarioti**, molto meno negli **eucarioti**.



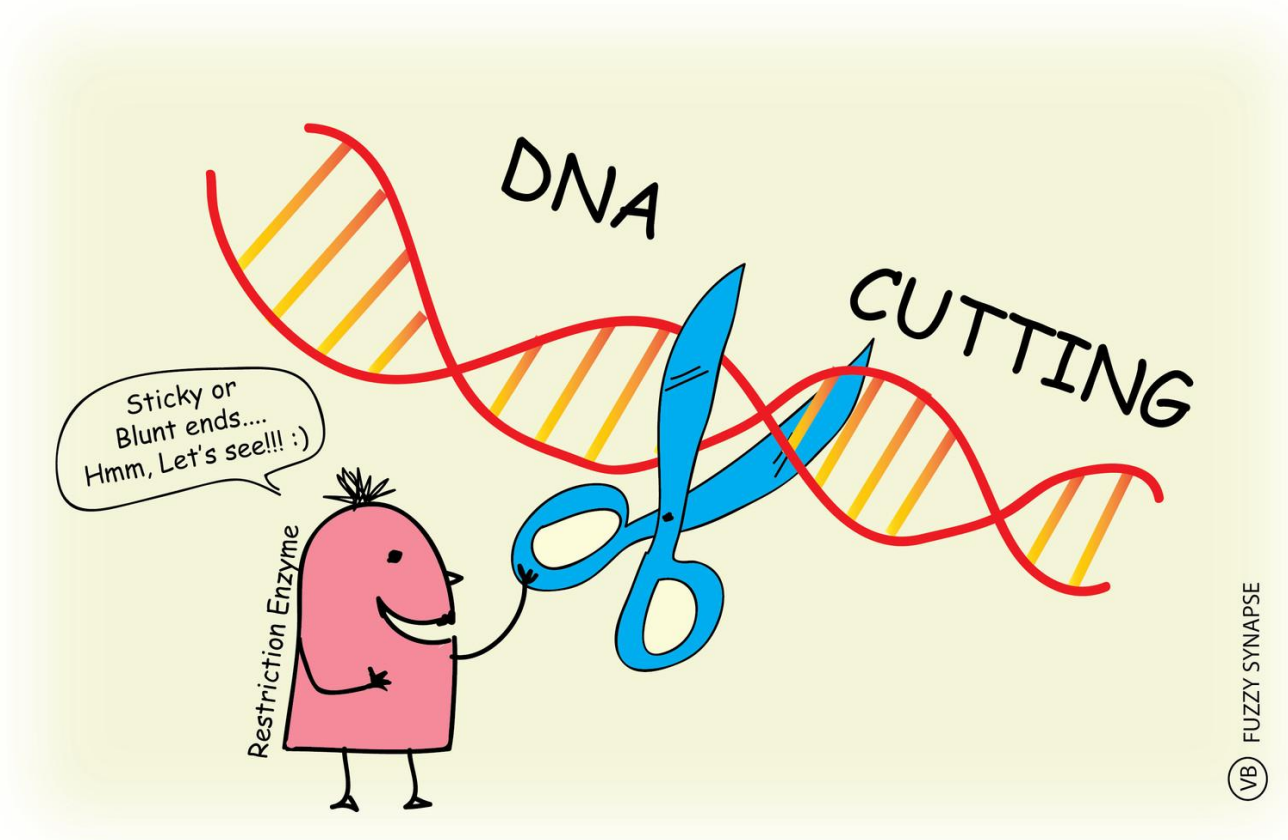
Dal gene editing al genome editing

Il **genome editing** è una tecnica che consente di introdurre, eliminare o alterare sequenze di DNA **all'interno del genoma** in una posizione specifica (*in situ*).

Questa tecnica si basa sull'utilizzo di particolari endonucleasi ingegnerizzate.



La chiave di tutto: gli enzimi



La chiave di tutto: gli enzimi

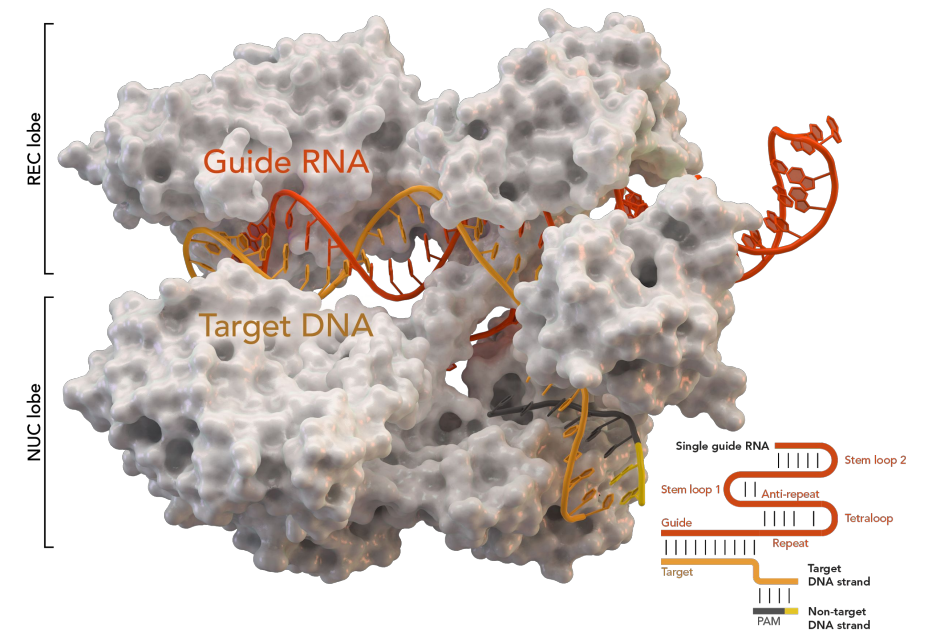
Enzimi di restrizione:

fondamentali per il gene editing

Endonucleasi sito-specifiche:

fondamentali per il genome editing

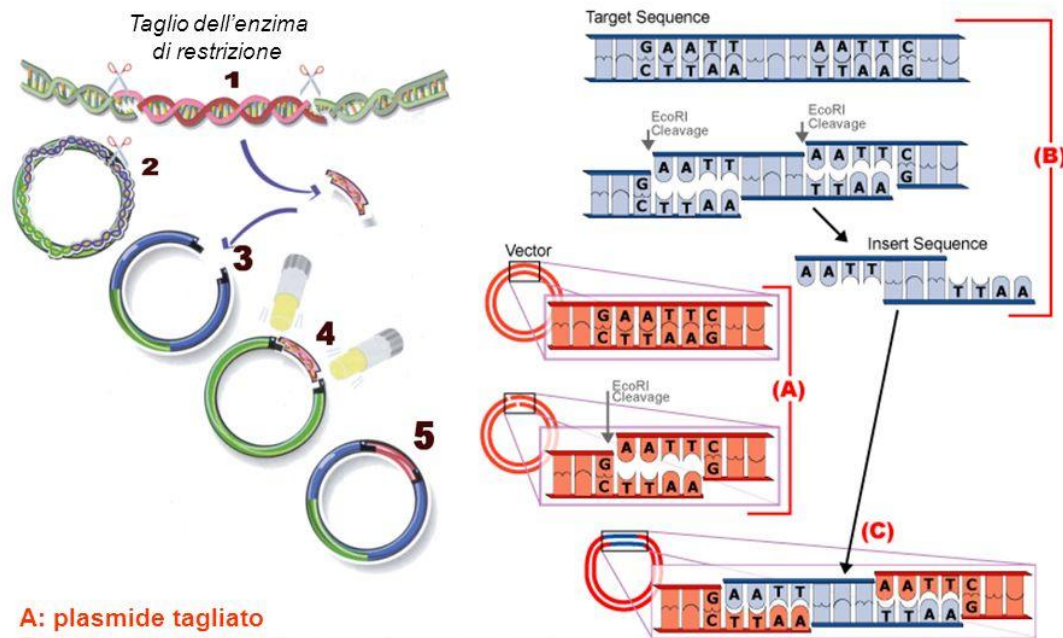
Enzima	Sequenza bersaglio	Tipo di taglio
EcoRI	G AATTC CTTAA G	asimmetrico
PstI	CTGCA G G ACGTC	asimmetrico
BamHI	G GATCC CCTAG G	asimmetrico
HpaI	GTT AAC CAATT G	simmetrico
SmaI	CCC GGG GGG CCC	simmetrico



Un po' di storia

Editing del genoma **procariotico**: semplice perché utilizza il processo biologico della **Trasformazione**

II DNA Ricombinante



A: plasmide tagliato
B: gene esogeno tagliato con lo stesso enzima
C: inserzione del gene

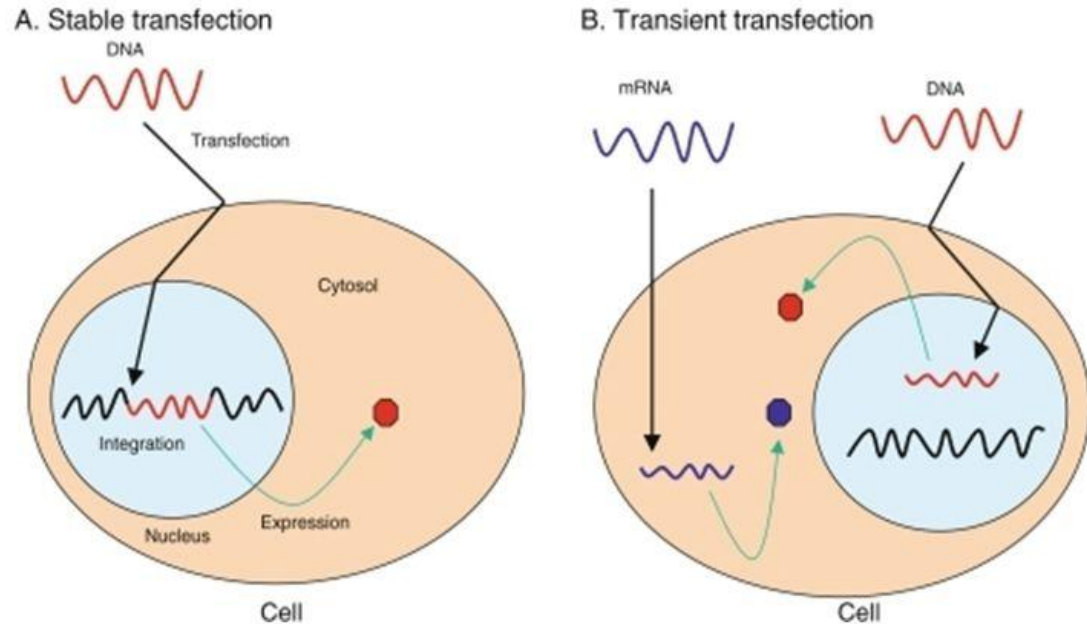
Usato a partire dagli anni '60 con la scoperta degli enzimi di restrizione per:

- Scopi di ricerca
- Produzione di proteine ricombinanti
- Produzione di farmaci

Un po' di storia

Editing del genoma **eucariotico**: decisamente più complesso. Difficoltà nel superare le barriere naturali

• STABILE TRASFEZIONE TRANSIENTE



Usato a partire dagli anni '80:

- Scopi di ricerca
- Produzioni di OGM
- Terapia genica

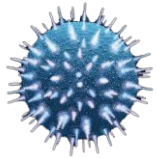
Problematiche:

- Bassa efficienza
- Alta citotossicità
- Solo alcuni tipi cellulari
- **Integrazione casuale**

Un po' di storia

VIRALI

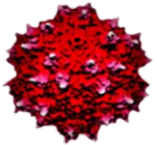
Infezione – stabile



RETROVIRUS



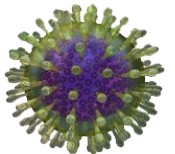
ADENOVIRUS



VIRUS ADENO-ASSOCIATI



LENTIVIRUS (derivati da HIV)

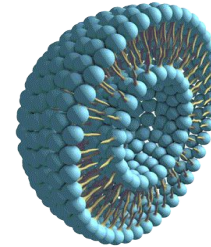


HERPESVIRUS

VETTORI

NON-VIRALI

Lipofezione – transiente



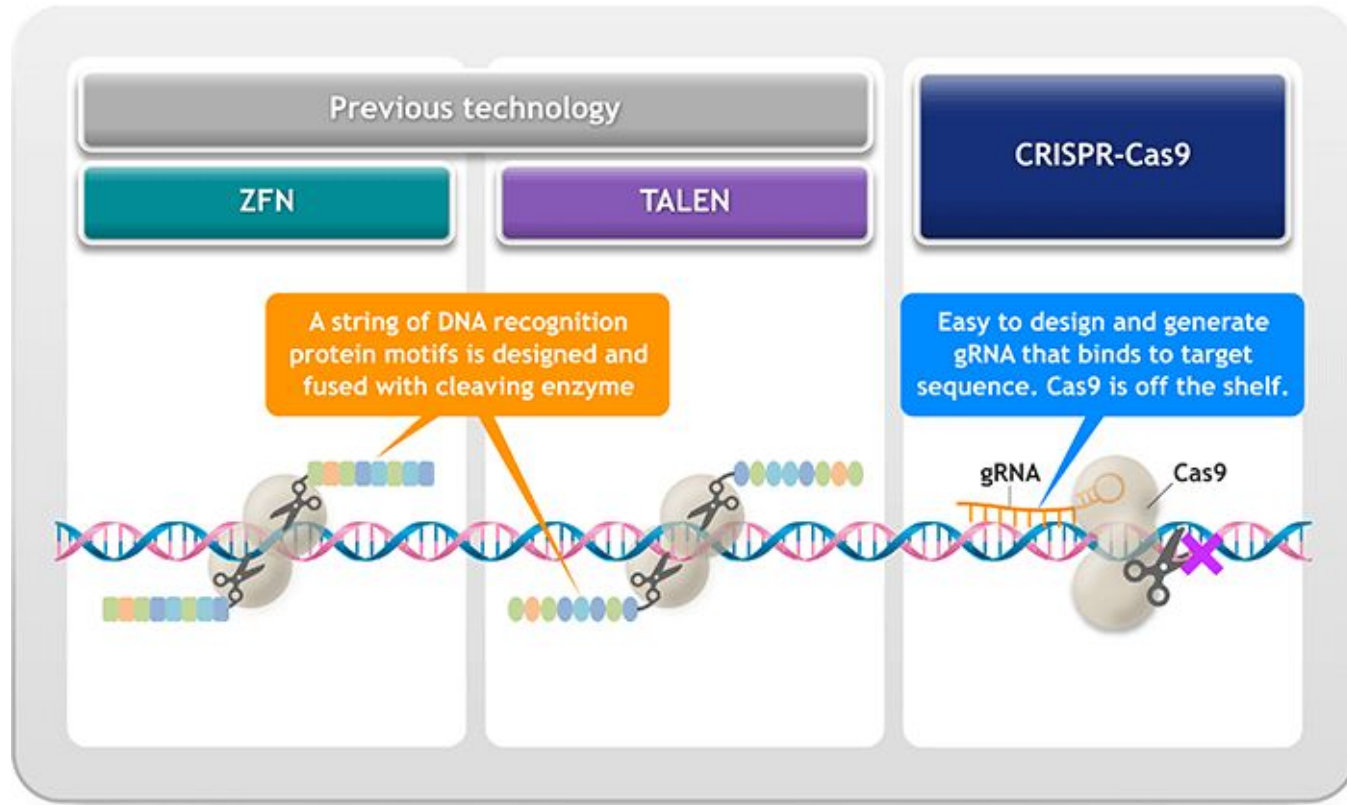
LIPOSOMI



DNA NUDO

Un po' di storia

Editing del genoma **eucariotico**: sviluppo di endonucleasi specifiche ingegnerizzate



Usato a partire dagli anni 2000:

- Buona efficienza
- Ricombinazione sito specifica
- Bassa citotossicità
- Sfrutta i meccanismi naturali della cellula

Meccanismo generale di funzionamento

Elemento chiave del genome editing è l'introduzione mirata di una **rottura a doppio filamento** nel DNA (**Double-Stranded Break, DSB**) da parte di specifiche endonucleasi.

I DSB si verificano frequentemente nella cellula e, se non vengono prontamente riparati, essa va incontro a morte.

Due meccanismi cellulari di riparazione dei DSB:

✓ **Giunzione non omologa delle estremità (NHEJ)**

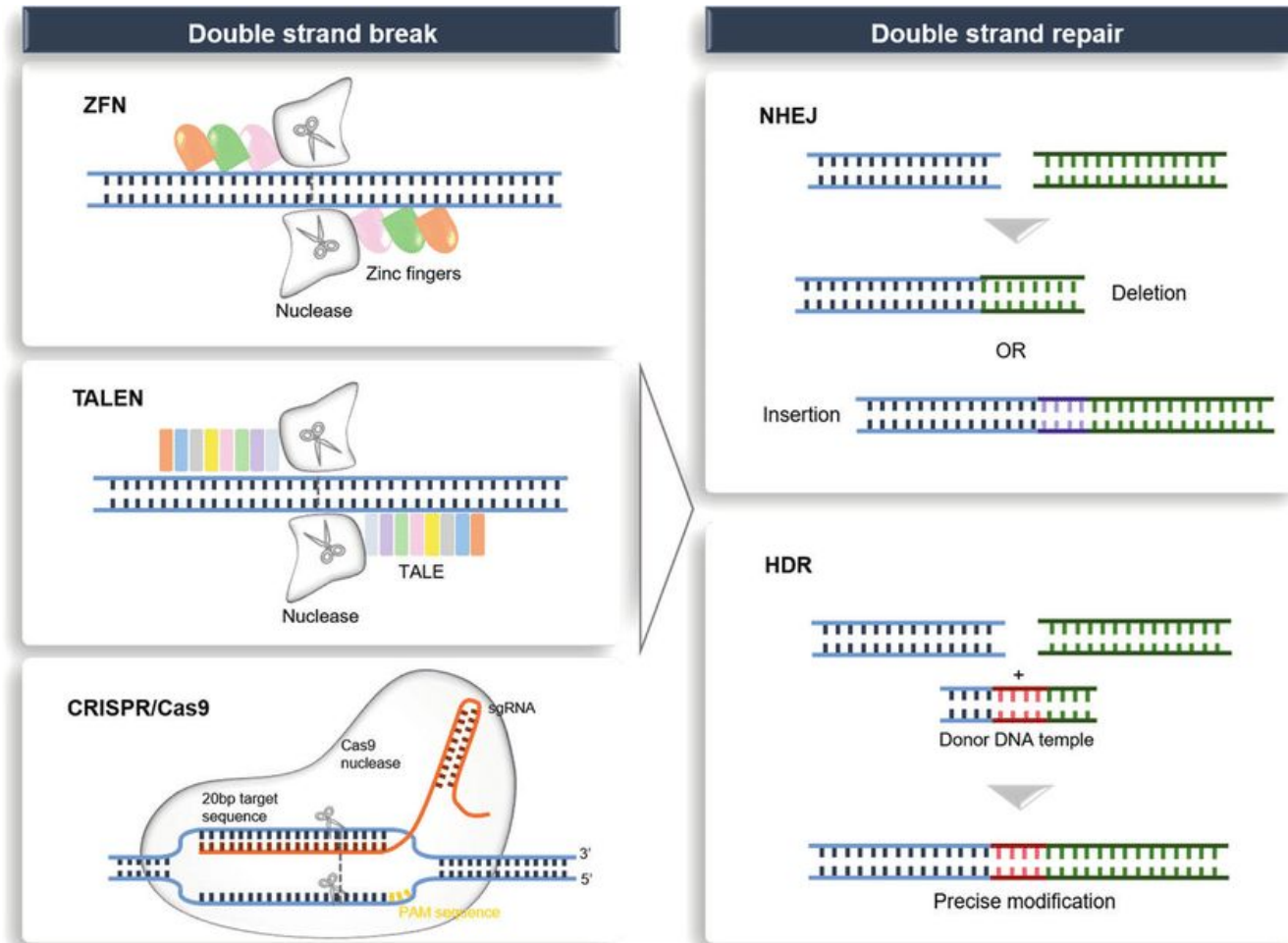
Processa le estremità rotte e le unisce, ma poiché la sequenza originaria è persa, il doppio filamento viene ricostituito con modalità "error-prone" e quindi può generare delezioni o inserzioni

✓ **Ricombinazione diretta dall'omologia (HDR):**

Prevede l'allineamento di due molecole di DNA "omologhe", cioè due sequenze di DNA identiche, o quasi identiche..

In presenza di una sequenza corretta, il danno viene riparato efficacemente.

Meccanismo generale di funzionamento

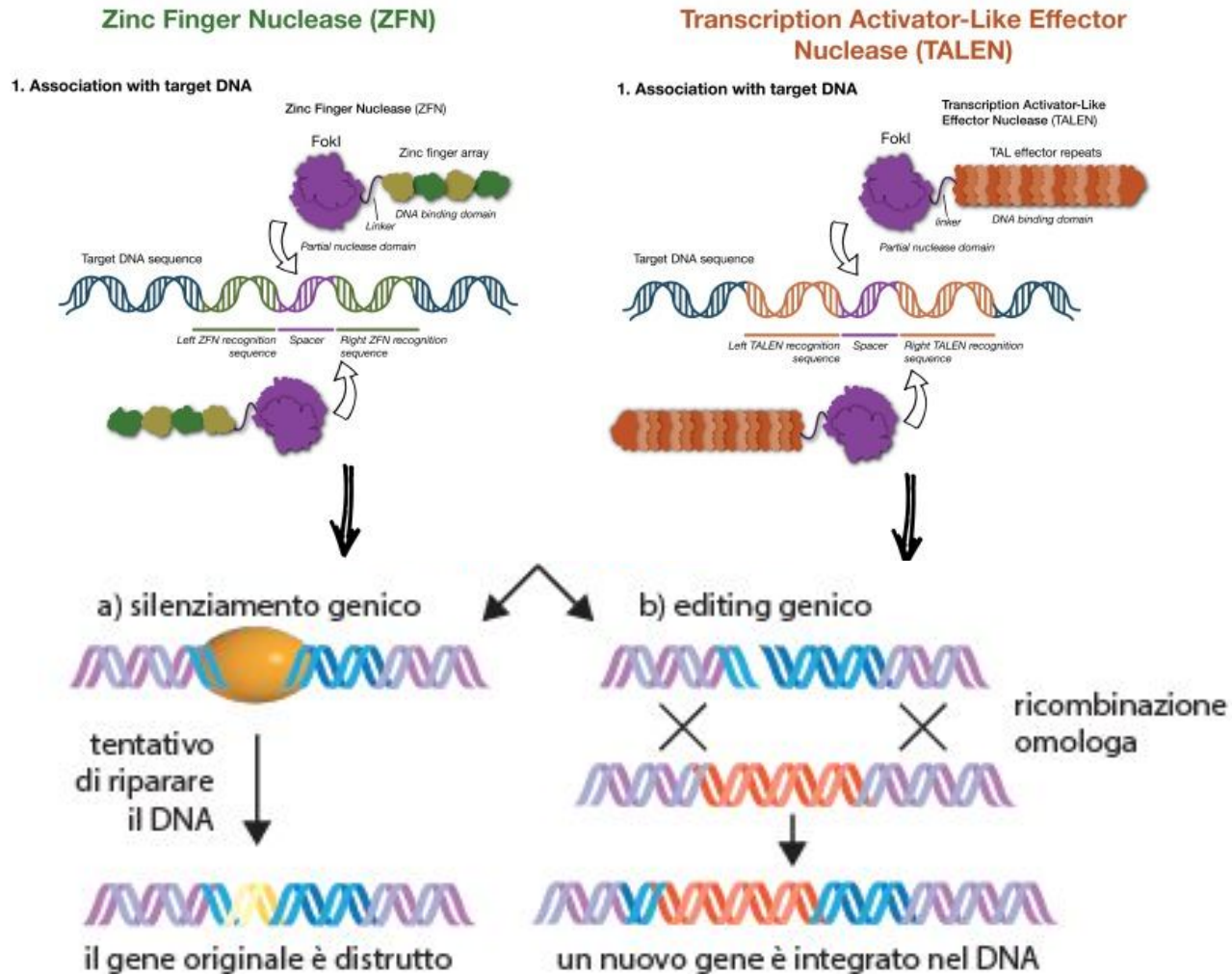


La scoperta che un DSB innesca la riparazione mediata da HDR o NHEJ è stata la base del Genome editing.

Il sistema **NHEJ** è usato per silenziare definitivamente un gene (**Knock out**)

Il sistema **HDR** è usato principalmente per introdurre una mutazione puntiforme oppure per correggere una mutazione (**Knock in**).

I sistemi Zinc Finger e TALEN



Nucleasi ibride

- **FokI** (endonucleasi)
- Domini di legame al DNA ingegnerizzati di tipo **Zinc Finger**
-
- **TALEN** (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)

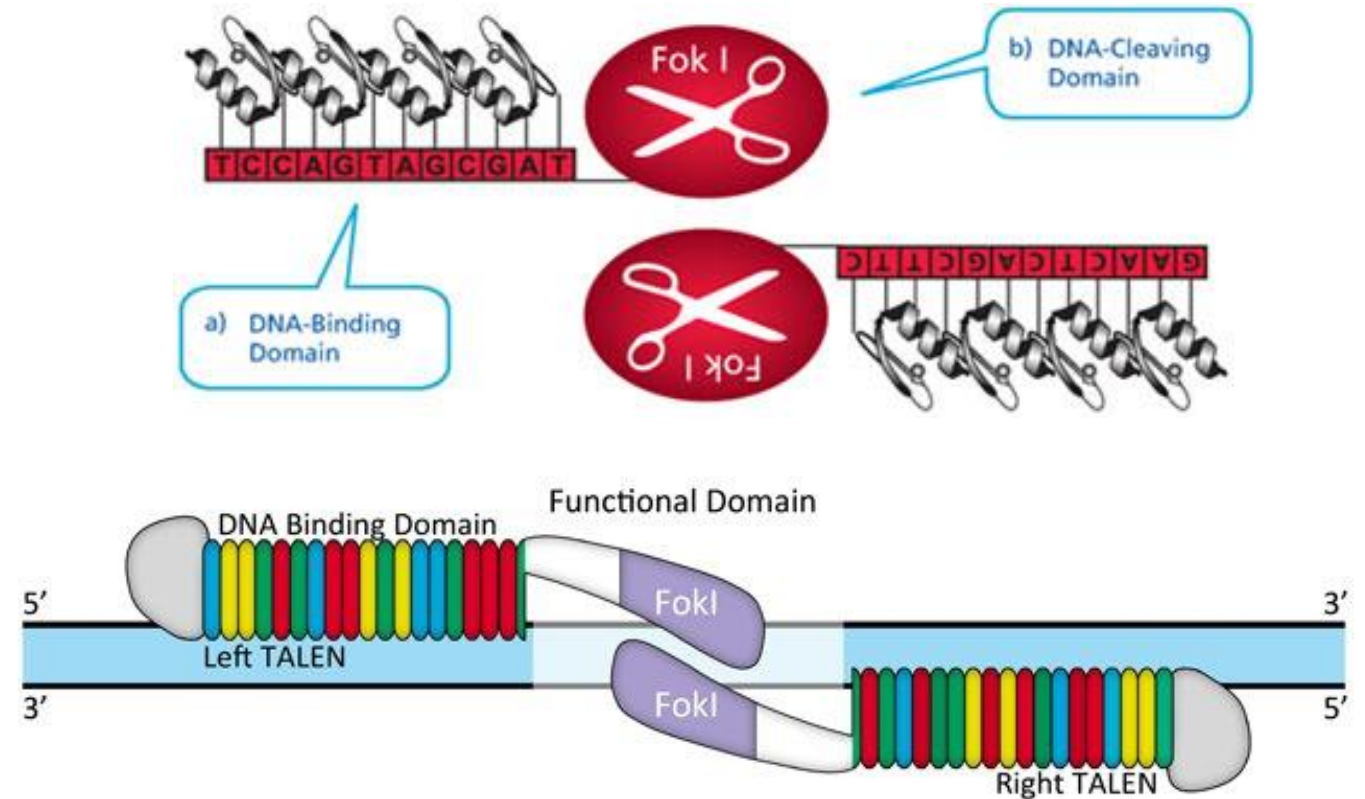
I sistemi Zinc Finger e TALEN

Vantaggi:

- Specificità nel sito del DSB

Svantaggi:

- Alto numero di errori
- Elevata citotossicità
- Difficoltà oggettive nel design
- Elevati costi
- Tempi lunghi



Crispr-Cas – Le origini

1987




in the cells
er the 5' or
rotein was
and 6. The
ver in these
11- and 38-
protein and
n were de-
since their
uct and the
n the DNA
ein was se-
xicells that
natant and
in nor the
asmic frac-
let fraction

both nucleotide 1367 and nucleotide 1376, in the same reading frame.

With nine nucleotides spacing from the second terminator codon, a nucleotide sequence with a transcript that may form a stable stem-and-loop structure was found. Transcription may end at this region.

An unusual structure was found in the 3'-end flanking region of *iap* (Fig. 5). Five highly homologous sequences of 29 nucleotides were arranged as direct repeats with 32 nucleotides as spacing. The first sequence was included in the putative transcriptional termination site and had less homology than the others. Well-conserved nucleotide sequences containing a dyad symmetry, named REP sequences, have been found in *E. coli* and *Salmonella typhimurium* (28) and may act to stabilize mRNA (18). A dyad symmetry with 14 nucleotide pairs was also found in the middle of these sequences (underlining, Fig. 5), but no homology was found between these sequences and the REP

Journal List > J Bacteriol > v.169(12); 1987 Dec > PMC213968

 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

Journal of Bacteriology®

J Bacteriol. 1987 Dec; 169(12): 5429–5433. PMID: PMC213968
doi: [10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987](https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987) PMID: [3316184](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3316184/)

Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product.

Y Ishino, H Shinagawa, K Makino, M Amemura, and A Nakata

▶ Author information ▶ Copyright and License information ▶ [Disclaimer](#)

ISHINO ET AL.

```
TGA AAATGGGAGGGAGTTC ACCGCAGAGCGGGGGA ACTCCAAGTGATAT  
(1,452) CGGTTATCCCCGCTGATGCGGGGAACACCAGCGTCAGG  
(1,513) CGGTTATCCCTGCTGGCGCGGGGA ACTCTCGGTTTCAGG  
(1,574) CGGTTATCCCCGCTAACGCGGGGA ACTCGTAGTCCATC  
(1,635) CGGTTATCCCCGCTGGCGCGGGGA ACTCG (1,664)
```

consensus: CGGTTATCCCCGCT^{GG}AA_{AA}C^{AA}GCGGGGA ACTC

Comparison of direct-repeat sequences consisting of 61 base pairs in the sequences, which contain a dyad symmetry of 14 base pairs (underlined), are shown. The segments are shown in boldface type. The second translational termination codon is shown in boldface type.

Crispr-Cas – Le origini

1993



Comparative Study > Mol Microbiol. 1993 Aug;9(3):613-21.

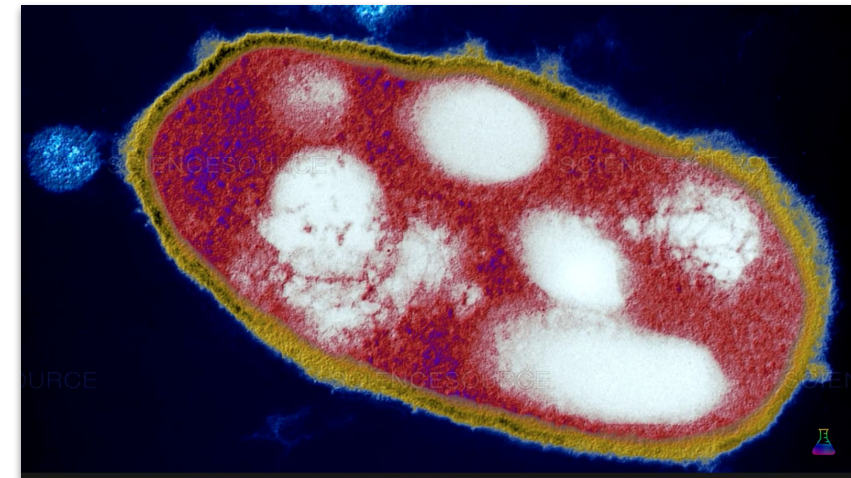
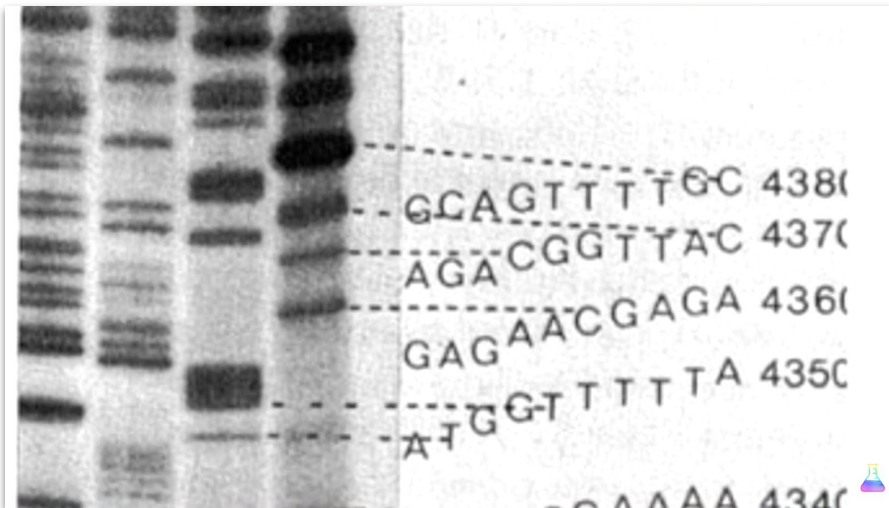
doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x.

Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites

F J Mojica ¹, G Juez, F Rodríguez-Valera

Affiliations + expand

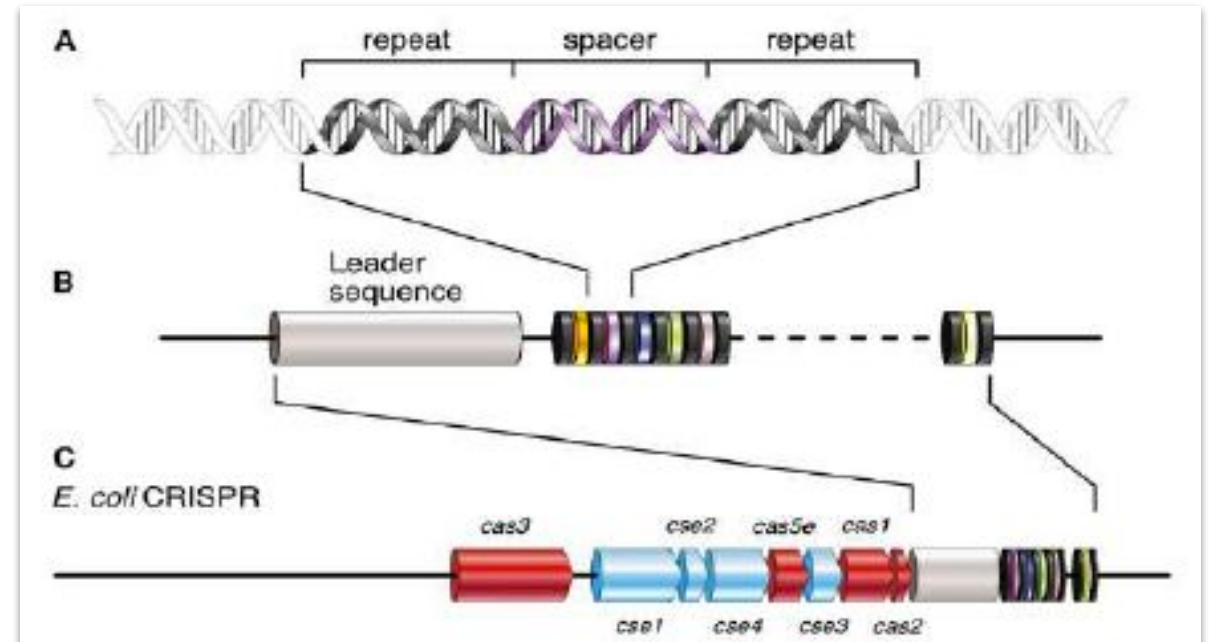
PMID: 8412707 DOI: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x



Crispr-Cas – Il locus CRISPR

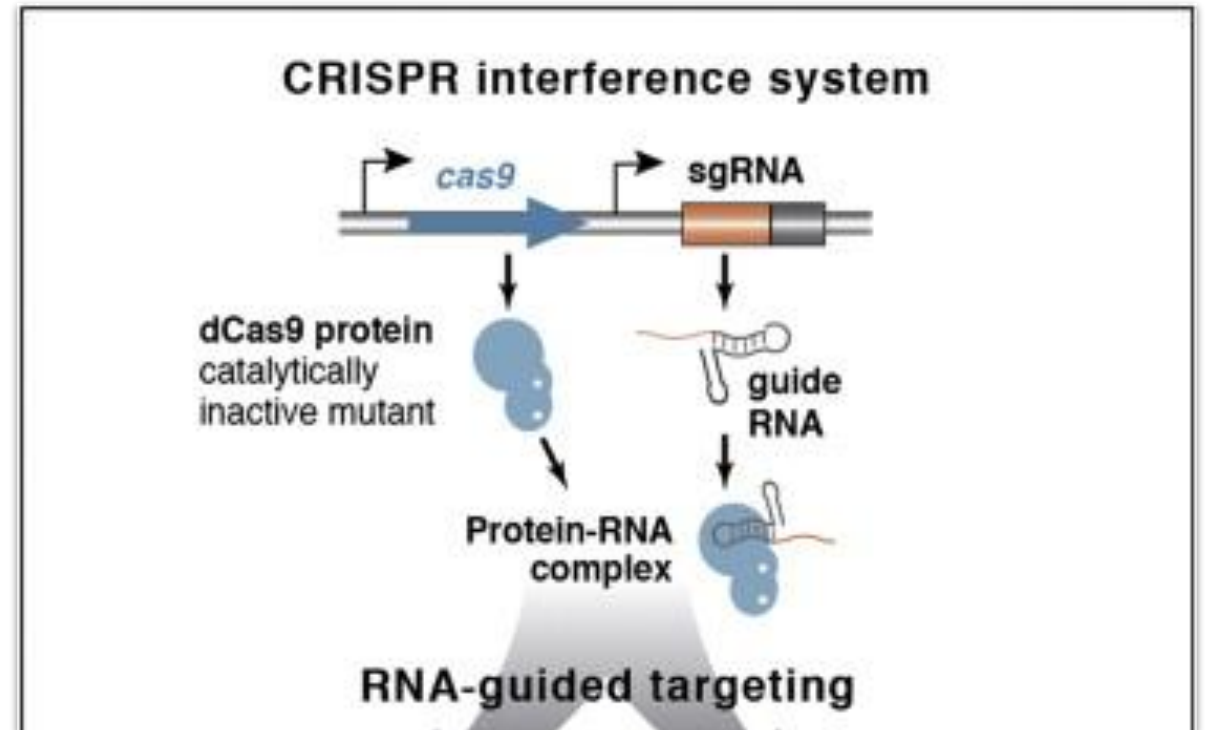
(cluster regularly interspaced short palindromic repeats)

- Un **locus CRISPR** è una regione di DNA genomico batterico caratterizzata da tre elementi genici:
- Un **array CRISPR** costituito da un'alternanza di ripetitori e spaziatori;
- Una **sequenza leader** a monte dell'array CRISPR, contenente una regione promotore;
- Un cluster di **geni cas** (il termine cas vuol dire “associati a CRISPR”), situato nelle immediate vicinanze.



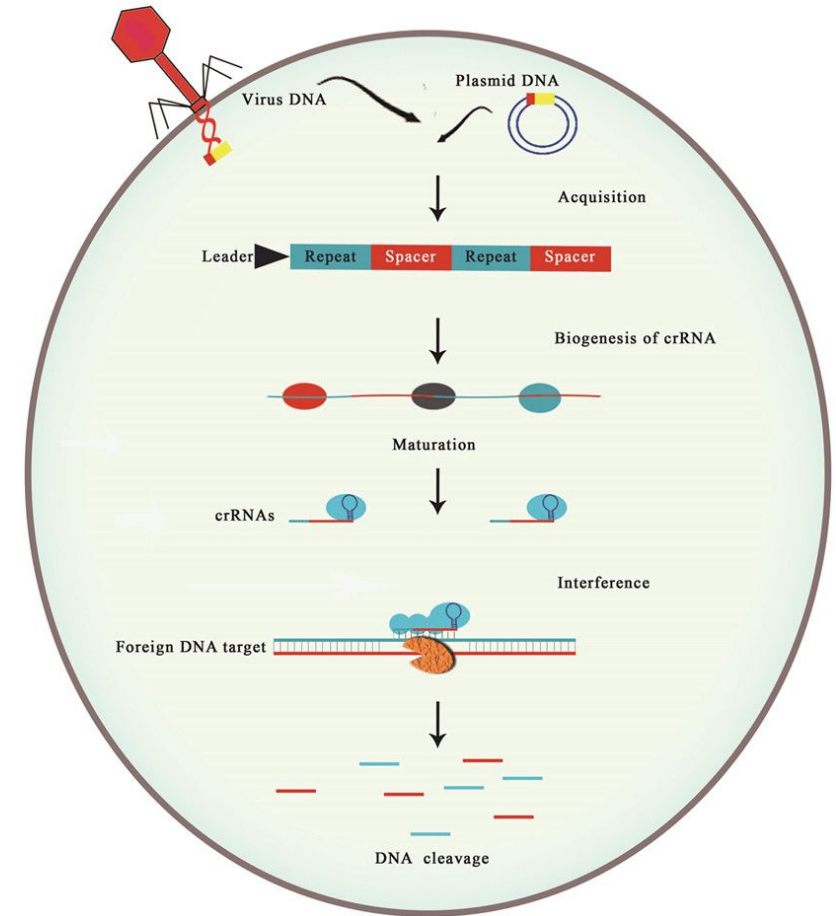
Crispr-Cas – Il sistema Crispr-Cas

- **Proteina Cas** prodotta dai geni Cas
- L' **array CRISPR** viene trascritto in diversi **RNA guida** che contengono: una porzione per associarsi a Cas (trascritta dal **Repeat**) e una porzione per associarsi al DNA target (trascritta dallo **Spacer**)



Crispr-Cas – L'immunità procariotica

- **Adattamento:** Acquisizione degli SPACERS: durante l'infezione fagica segmenti di acidi nucleici dell'elemento invasore vengono copiati e incorporati a valle della sequenza leader del CRISPR.
- **Espressione:** Nella fase di processamento il locus è trascritto e processato in **crRNA maturi** contenenti una sequenza **REPEAT** (per legare Cas) ed una singola sequenza **Spacer** per legare il DNA fagico
- **Interferenza:** Durante la fase effettrice i crRNA complessati alle proteine CAS portano alla degradazione il DNA complementare



Crispr-Cas – L'invenzione da Nobel

Nel 2012 CRISPR viene reso programmabile usando la proteina Cas9

RESEARCH ARTICLE

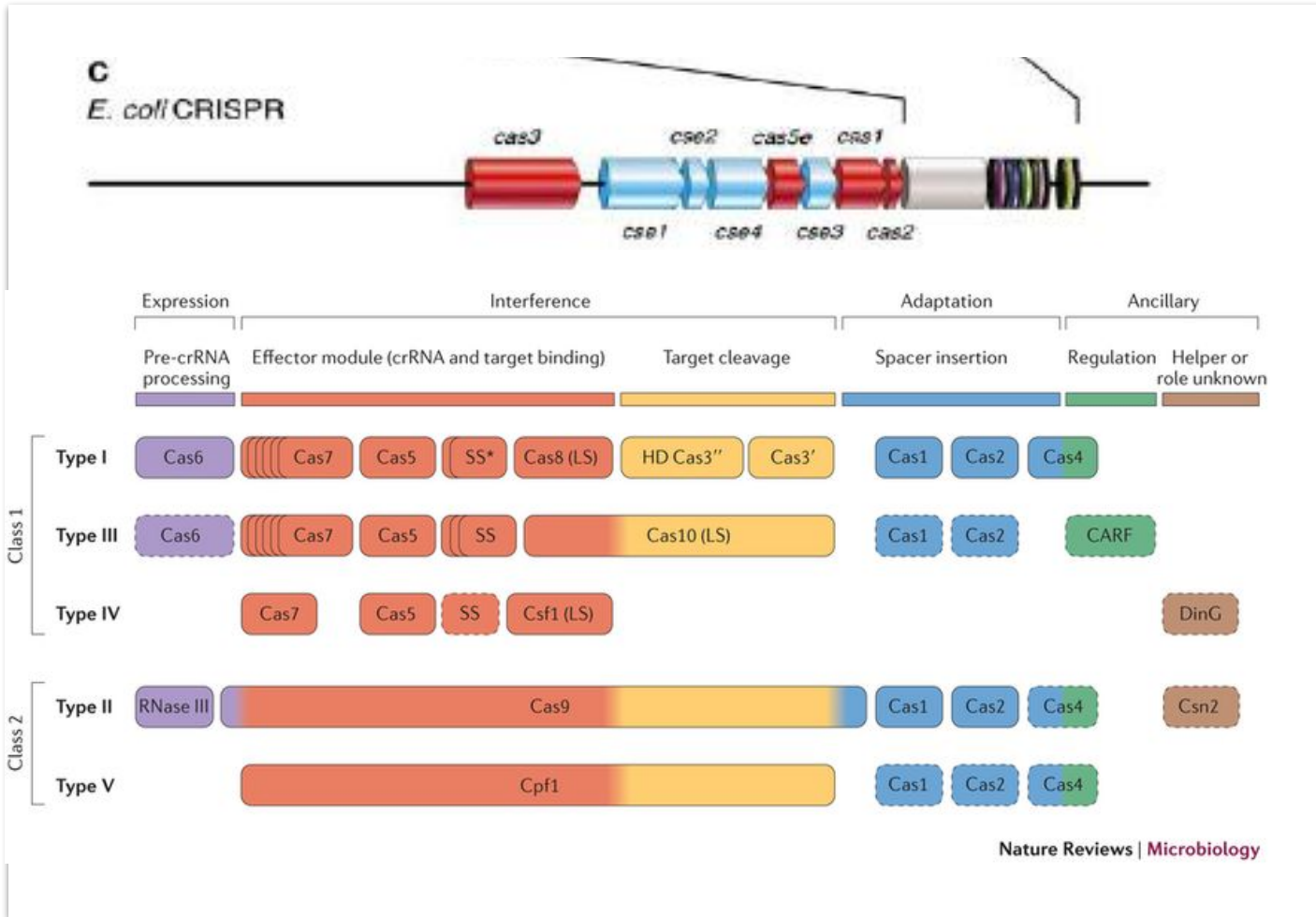
A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity

Martin Jinek,^{1,2*} Krzysztof Chylinski,^{3,4*} Ines Fonfara,⁴ Michael Hauer,^{2†} Jennifer A. Doudna,^{1,2,5,6‡} Emmanuelle Charpentier^{4‡}

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) systems provide bacteria and archaea with adaptive immunity against viruses and plasmids by using CRISPR RNAs (crRNAs) to guide the silencing of invading nucleic acids. We show here that in a subset of these systems, the mature crRNA that is base-paired to trans-activating crRNA (tracrRNA) forms a two-RNA structure that directs the CRISPR-associated protein Cas9 to introduce double-stranded (ds) breaks in target DNA. At sites complementary to the crRNA-guide sequence, the Cas9 HNH nuclease domain cleaves the complementary strand, whereas the Cas9 RuvC-like domain cleaves the noncomplementary strand. The dual-tracrRNA:crRNA, when engineered as a single RNA chimera, also directs sequence-specific Cas9 dsDNA cleavage. Our study reveals a family of endonucleases that use dual-RNAs for site-specific DNA cleavage and highlights the potential to exploit the system for RNA-programmable genome editing.



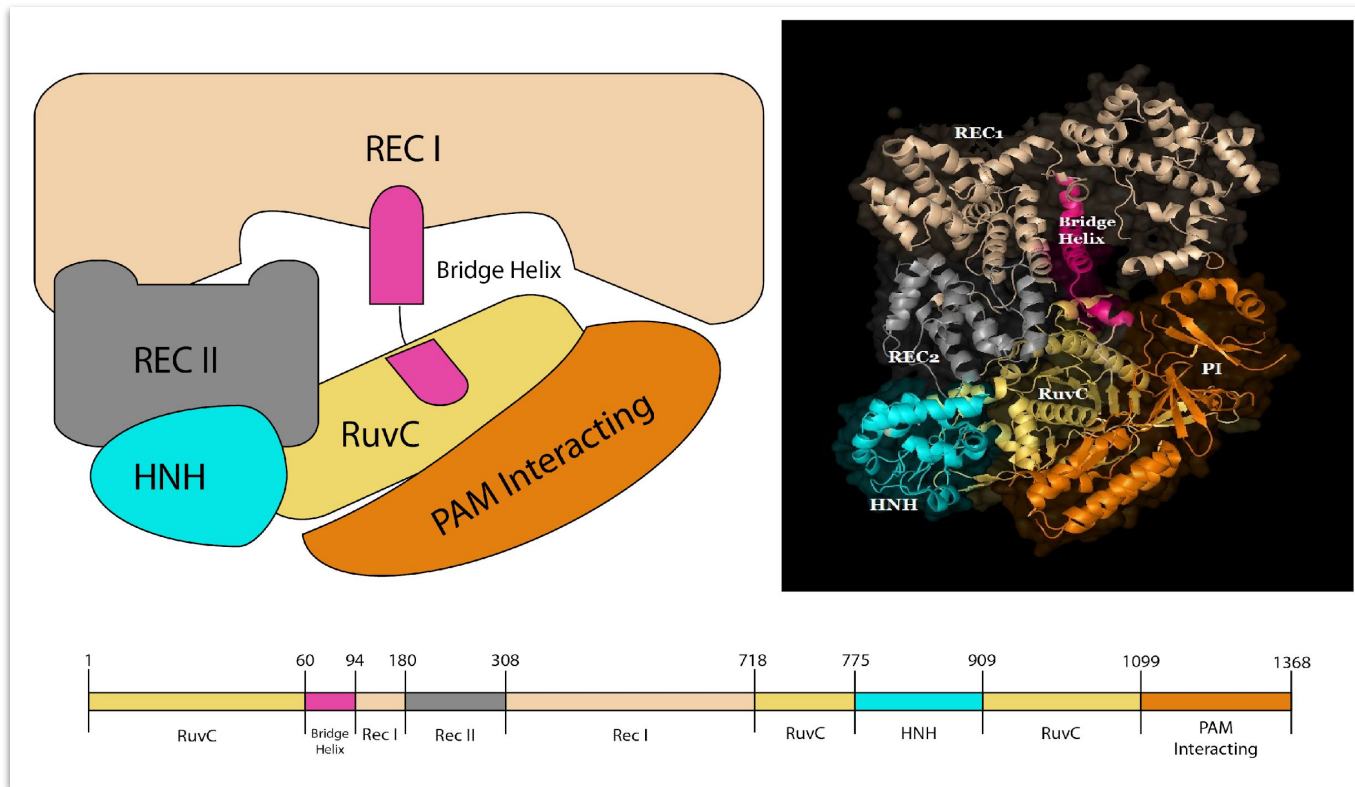
Crispr-Cas – Le proteine Cas



Le proteine Cas sono un gruppo eterogeneo di enzimi con diverse funzioni utili nel processo di immunità batterica:

- **Nucleasi**
- **Transattivazione (riconoscimento) con Rna guida**
- **Elicasi**

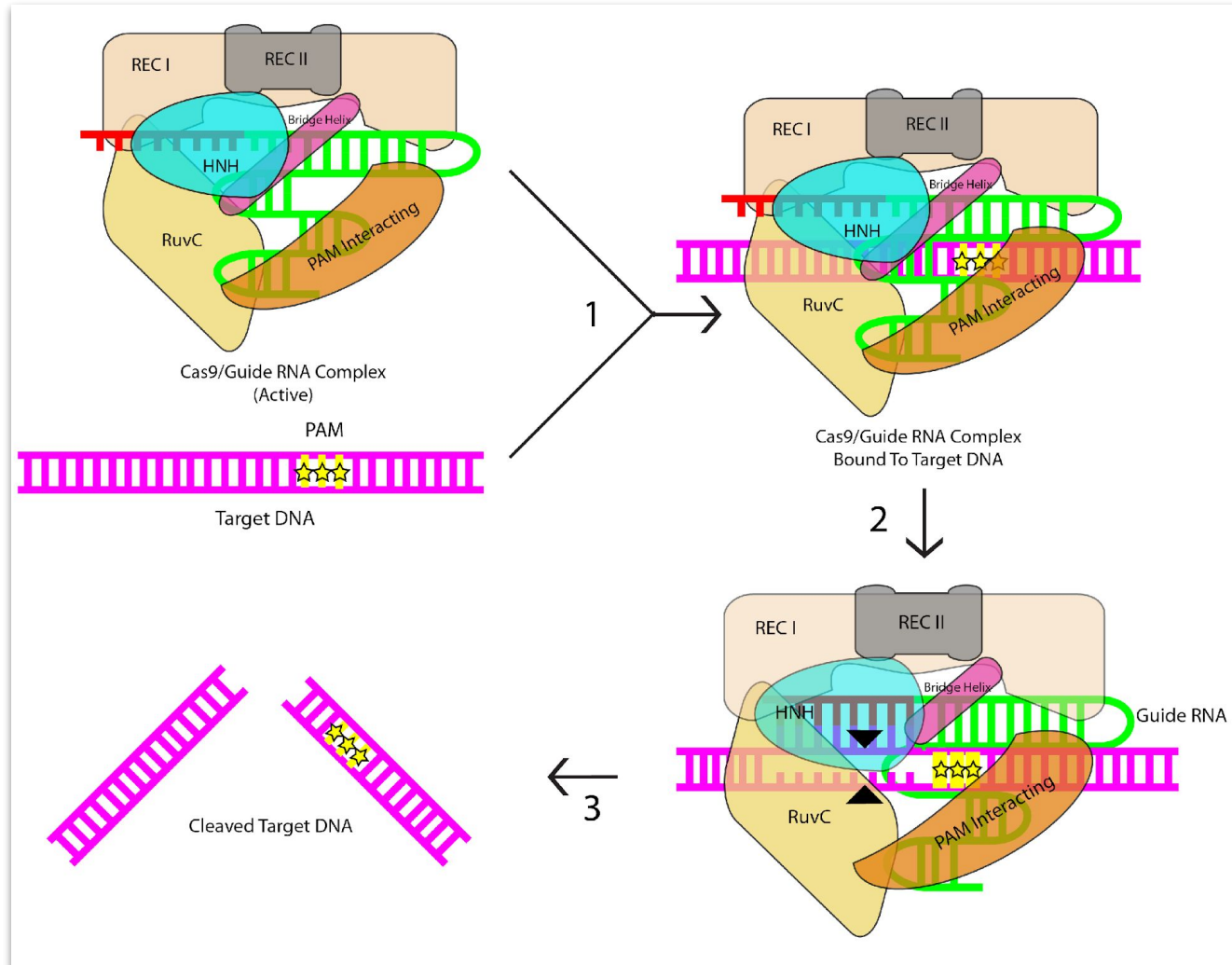
Crispr-Cas9 – La proteina Cas9



La particolarità di Cas9 risiede nella sua struttura multifunzionale

- **Nucleasi** (Ruvc e HNH)
- **Transattivazione (riconoscimento)** (REC I e II, PAM)
- **Elicasi** (REC I e II)

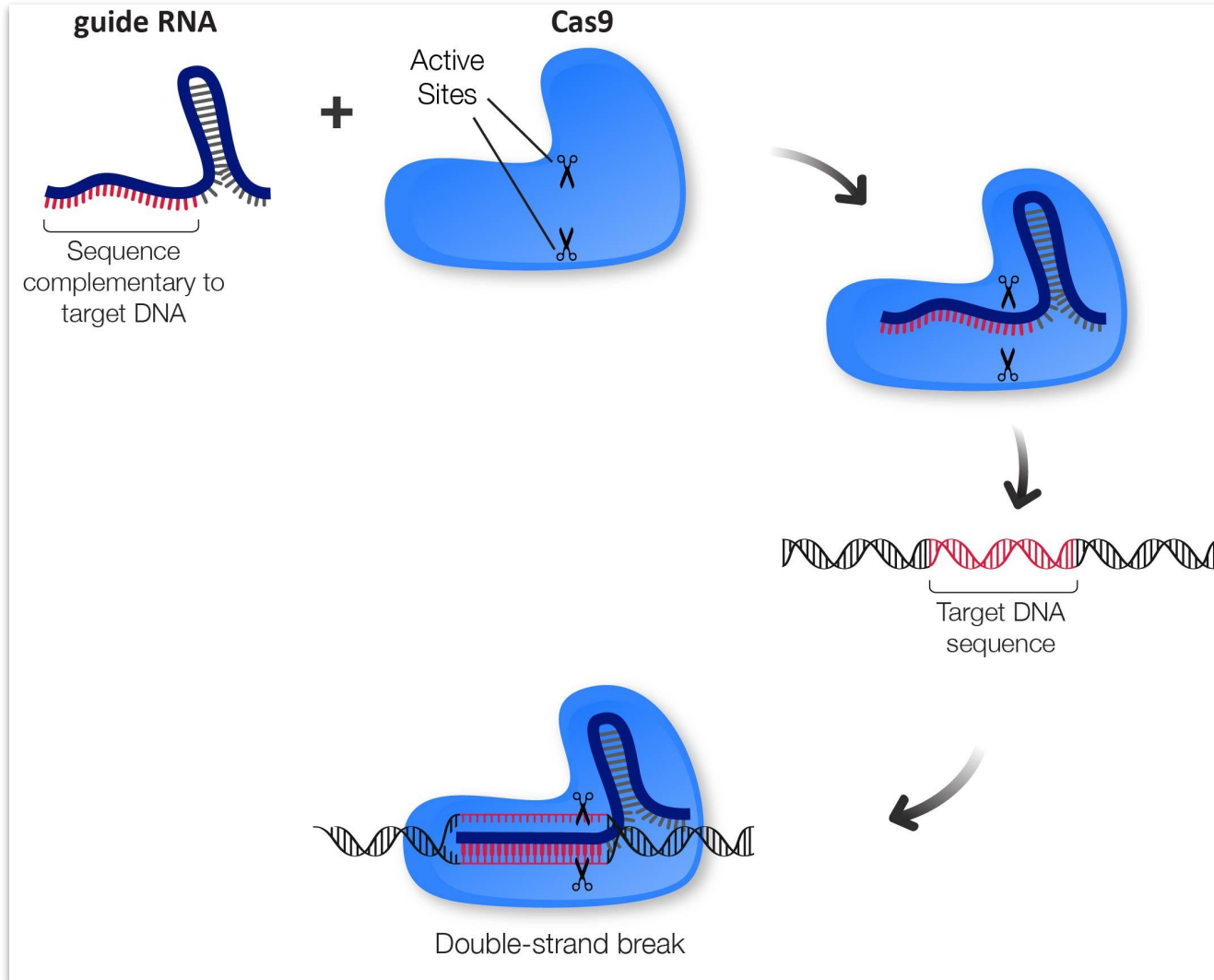
Crispr-Cas9 – La proteina Cas9



La particolarità di Cas9 risiede nella sua struttura multifunzionale

- **Nucleasi** (Ruvc e HNH)
- **Transattivazione (riconoscimento)** (REC I e II, PAM)
- **Elicasi** (REC I e II)

Crispr-Cas9 – All'opera!

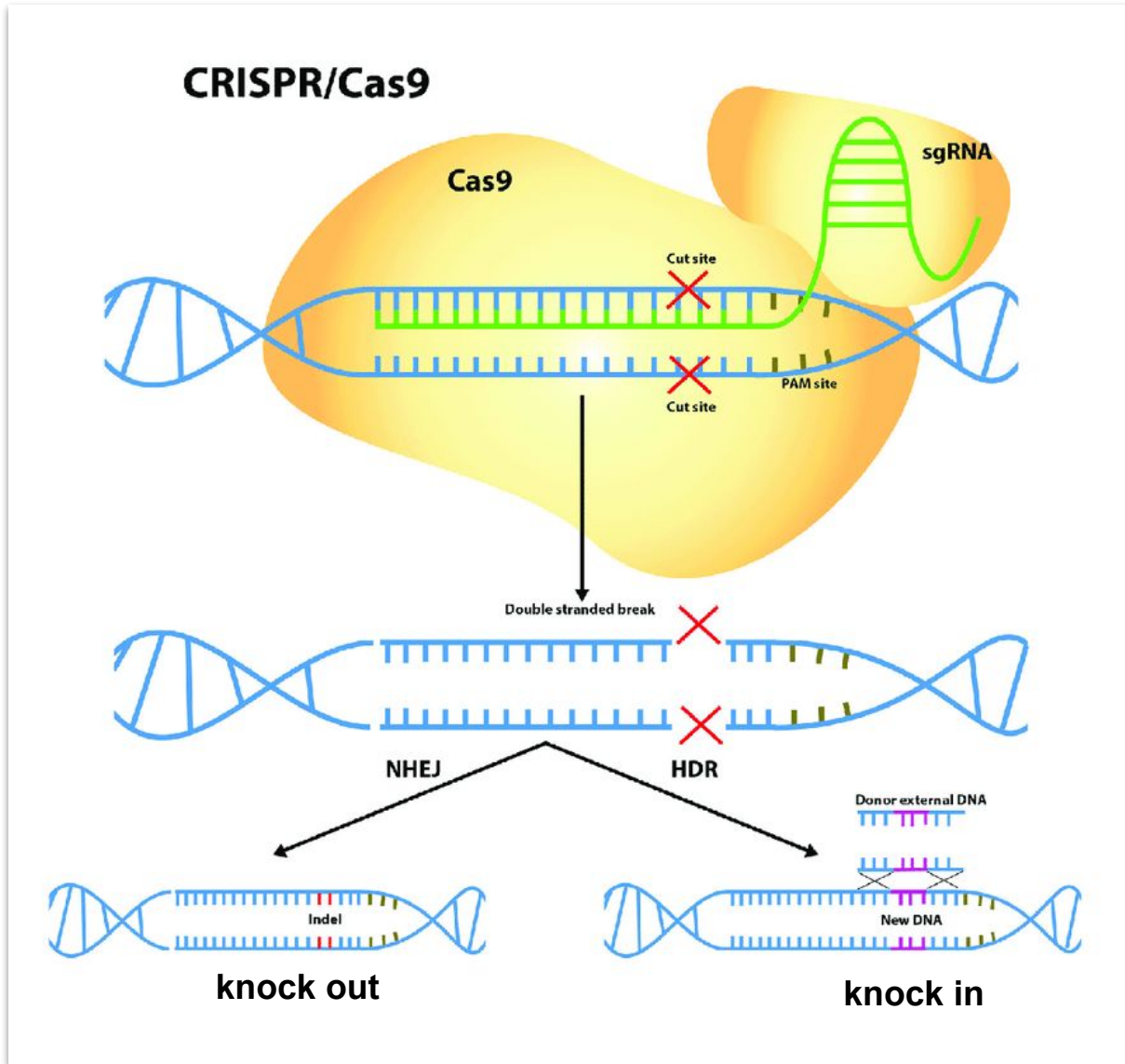


.....

In pratica la tecnica consiste nel:

- disegno e sintesi dell' **RNA guida**
 - disegno e sintesi dell'eventuale **DNA donatore**
-

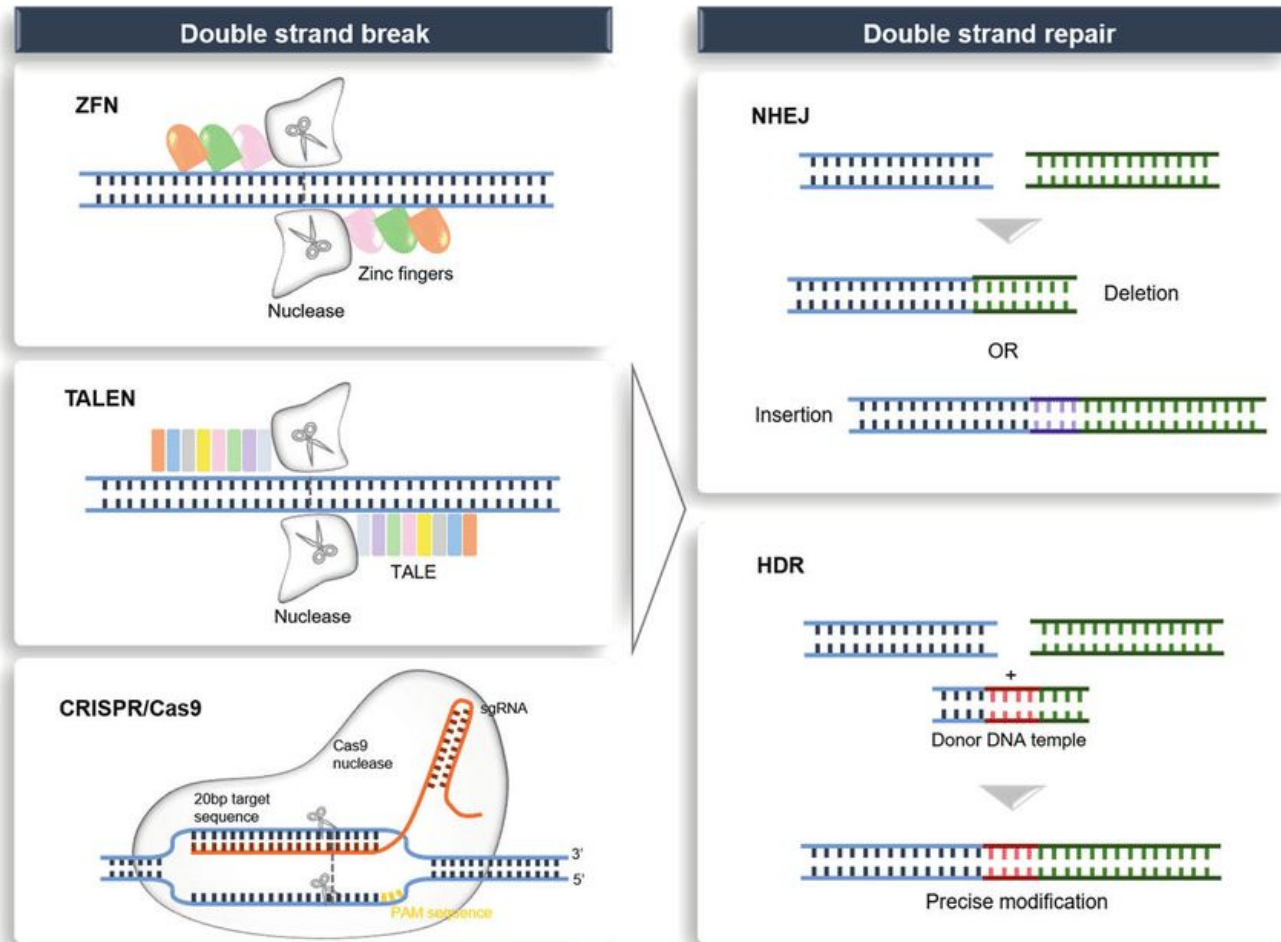
Crispr-Cas9 – All'opera!



Meccanismi di riparazione del DNA

- In caso di giunzione non omologa (**NHEJ**) si avrà il silenziamento del gene (**knock out**).
- In caso di trasfezione con un DNA donatore si avrà una ricombinazione omologa (**HDR**) con riparazione del gene difettoso (**knock in**).

Crispr-Cas9 – Vantaggi enormi



Sia la nucleasi le ZFN, che le TALEN, richiedono **l'ingegnerizzazione** e la sintesi di **proteine personalizzate** per ogni sequenza target di DNA, un processo enormemente più **complesso, lungo e costoso** rispetto alla sintesi degli RNA guida. Mentre i CRISPRs sono molto più **facili da progettare** perché richiedono solo una breve **sequenza di RNA** da associare a Cas9 e alla **sequenza target** del DNA.

Crispr-Cas9 – Principali applicazioni

Creando dei sistemi cellulari che mimino alcune patologie →
identificare con più accuratezza **nuove terapie**

➤ Utilizzando un approccio più avanzato di **terapia genica** →
modificare il genoma di una cellula “curando” la sequenza di DNA
"malata"

➤ **Sfruttandolo nel miglioramento genetico vegetale** →

1) per indurre l'insorgenza di mutazioni nel DNA e quindi può
consentire di passare da una mutagenesi chimica o da radiazione
ad una mutagenesi biologica, arrivando ad un miglioramento
genetico molto più efficiente, rapido e preciso.

2) preservare intatta la varietà di partenza non dovendo ricorrere
all'incrocio

➤ **Sfruttandolo nel miglioramento genetico animale** →

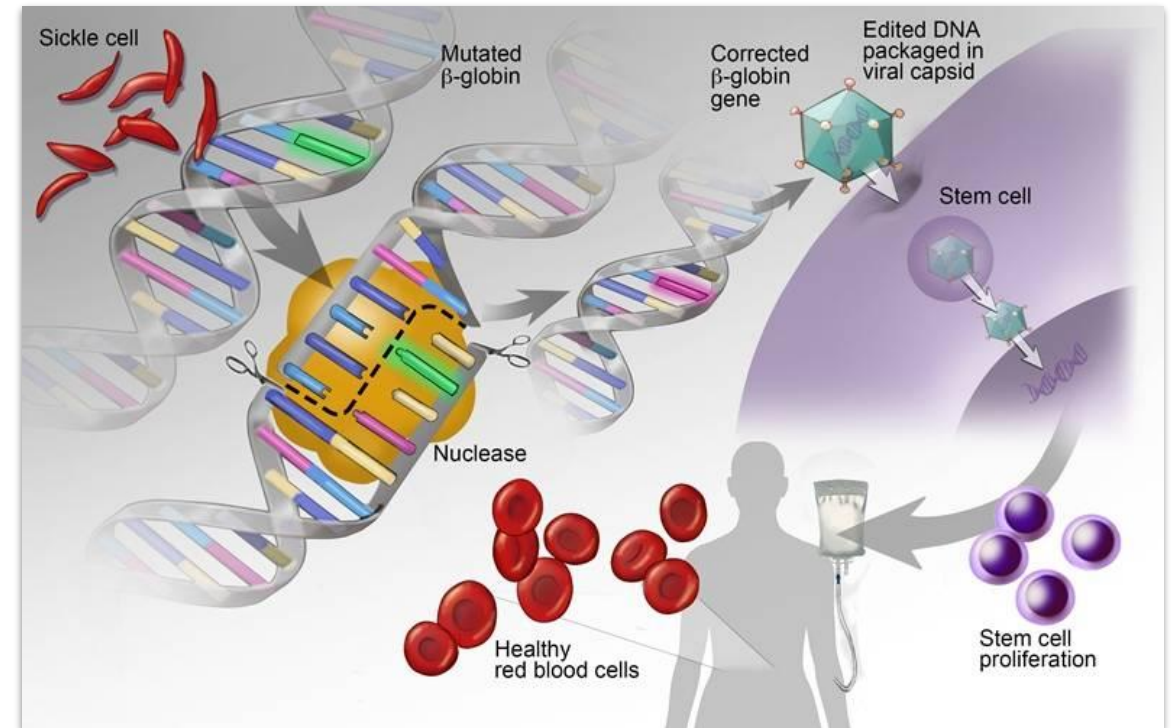
accorciare i tempi della selezione di nuove razze, trasferire
rapidamente caratteri desiderabili, introdurre resistenze a malattie,
alterare la nocività degli insetti...



Crispr-Cas9 – Terapia genica 2.0

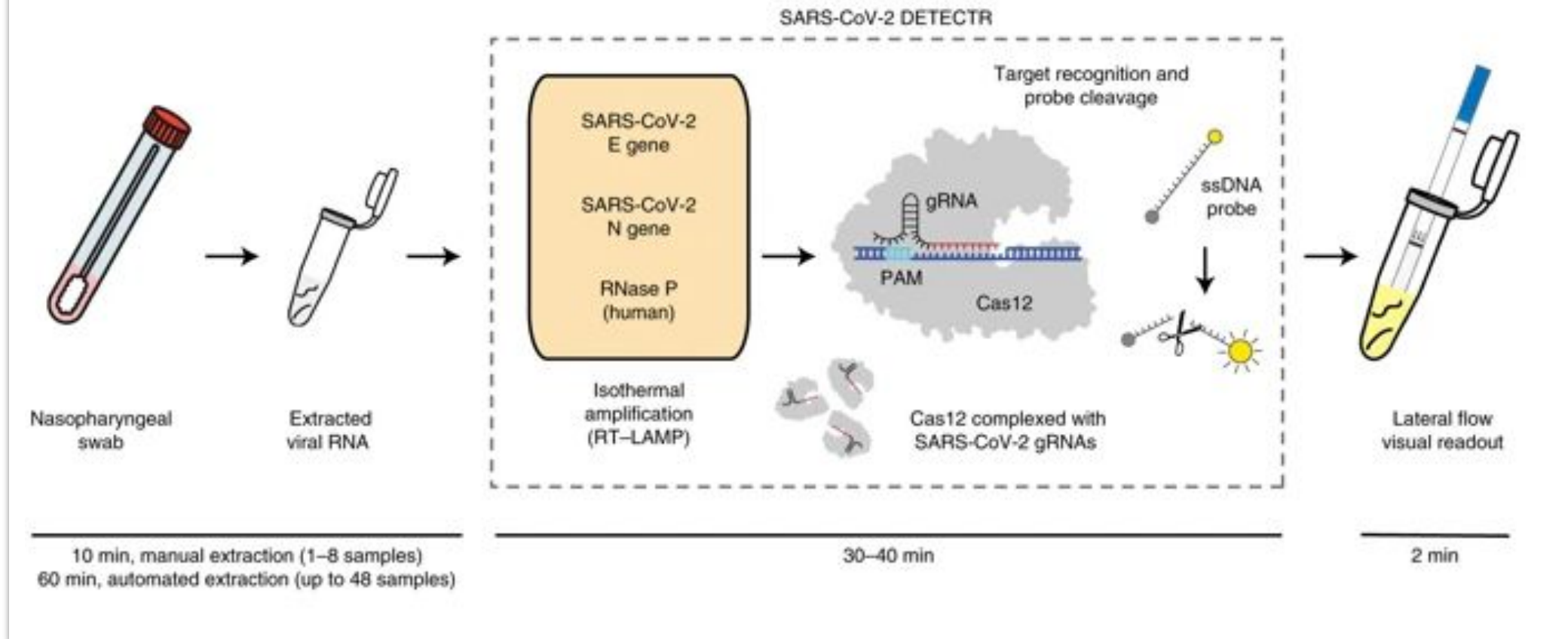
Terapia genica per malattie a base semplice

- **Approcci Knock-out:** Beta Talassemie, Anemia Falciforme, Tumori
- **Approcci Knock-in:** Fibrosi cistica, Malattie autoimmuni, Tumori, Malattie degenerative, Distrofia di Duchenne, Maculopatie, ecc..
- **Diagnostica molecolare** Test genici, Test Covid Crisper-based...

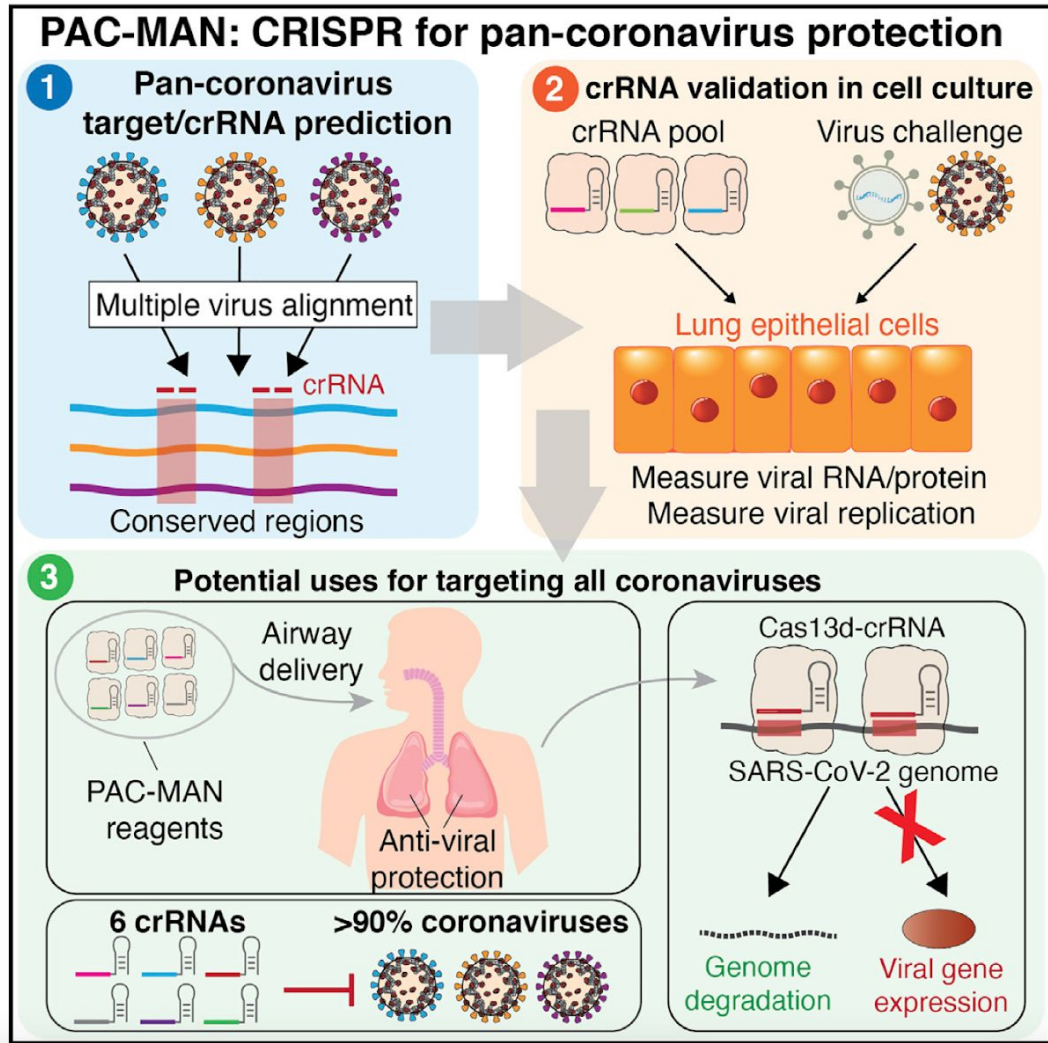


Crispr-Cas – Genomica in medicina

Sars Cov2 Crispr Test



Crispr-Cas – Genomica in medicina



Cell. 2020 May 14; 181(4): 865–876.e12. PMID: PMC7189862
Published online 2020 Apr 29. doi: [10.1016/j.cell.2020.04.020](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.020) PMID: [32353252](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32353252/)

Development of CRISPR as an Antiviral Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza

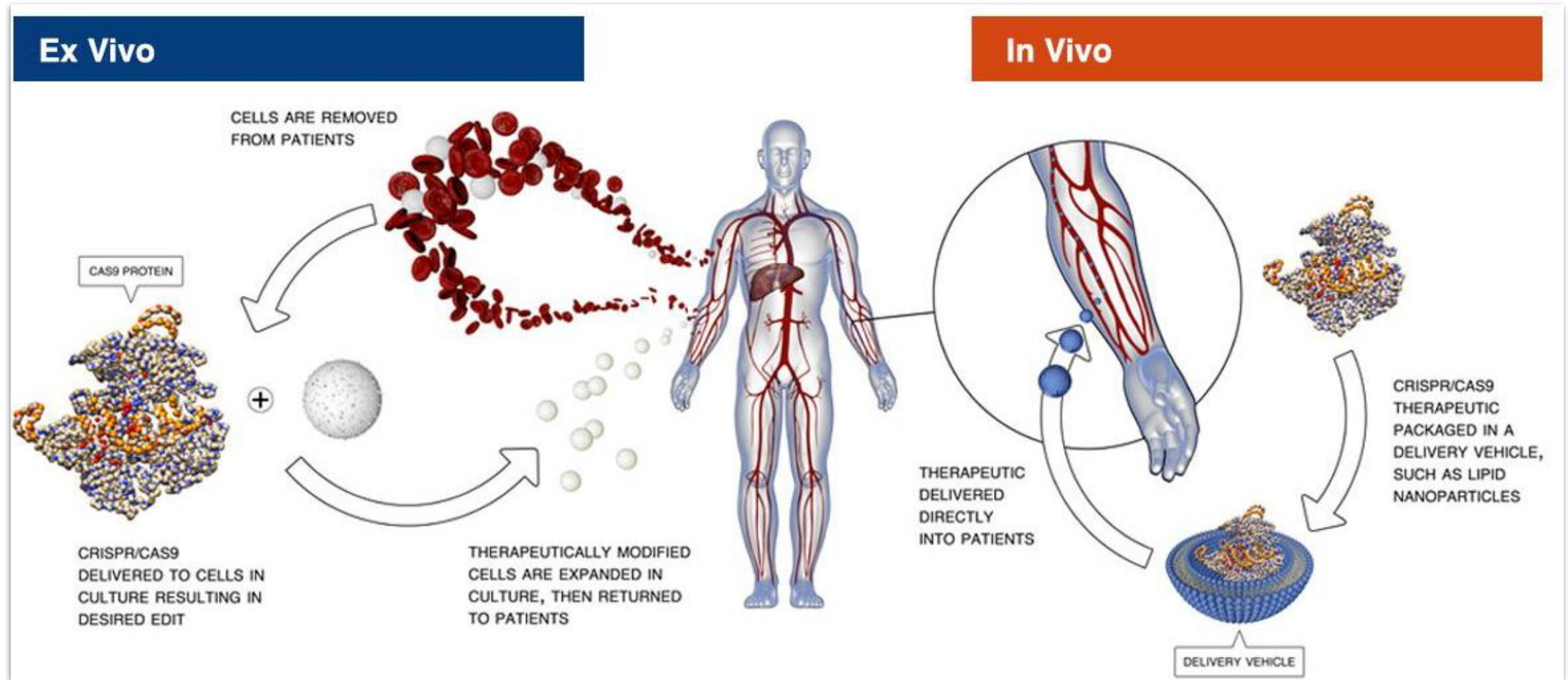
Timothy R. Abbott,^{1,9} Girija Dhamdhare,^{2,9} Yanxia Liu,^{1,9} Xueqiu Lin,^{1,9} Laine Goudy,^{1,9} Leiping Zeng,¹ Augustine Chemparathy,³ Stephen Chmura,⁴ Nicholas S. Heaton,⁵ Robert Debs,⁴ Tara Pande,⁶ Drew Endy,¹ Marie F. La Russa,^{1,*} David B. Lewis,^{2,**} and Lei S. Qi^{1,7,8,10,***}

▶ Author information ▶ Article notes ▶ Copyright and License information ▶ Disclaimer

Elsevier Public Health Emergent

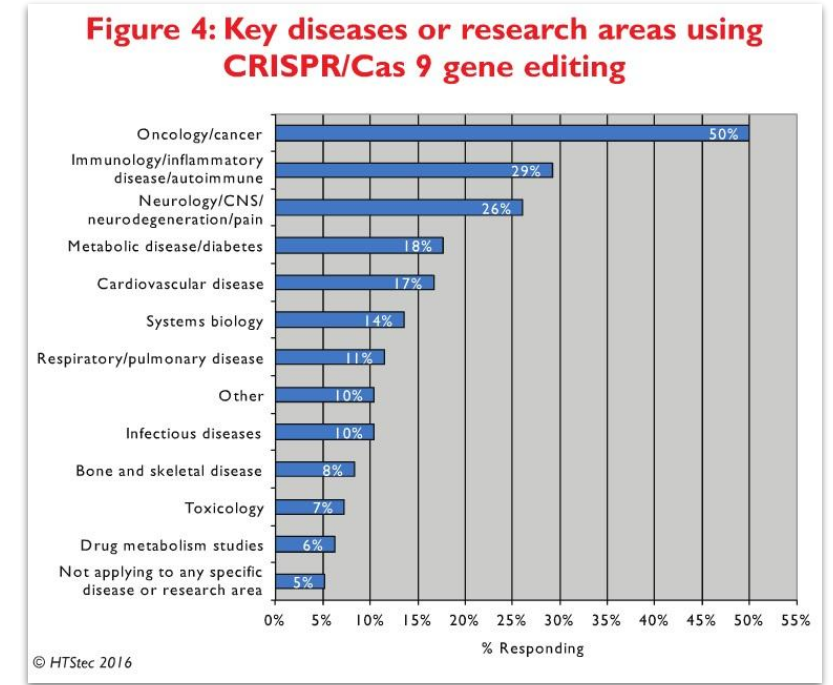
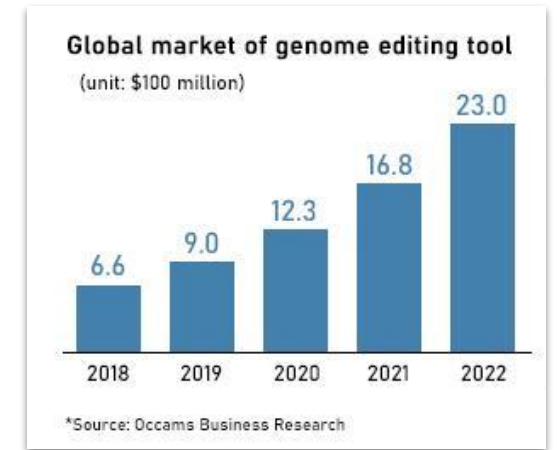
Nuove frontiere contro SARS-CoV2?

Crispr-Cas9 – Terapia genica 2.0



Crispr-Cas9 – Limiti e rischi

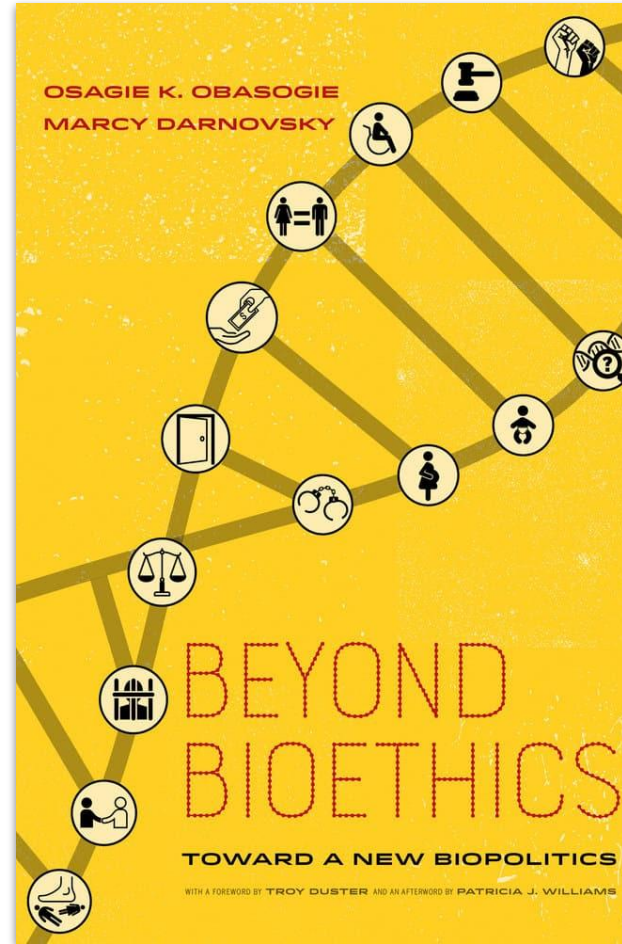
- Reazioni “off target”
- Malattie poligeniche multifattoriali
- Malattie multiorgano (si può intervenire solo sull’embrione)
- Brevetti di utilizzo: si per ricerca, no per tutto il resto
- GM si o no?
- Bioterrorismo



Questioni bioetiche

Eugenetica

- Regole di respiro internazionale
 - Talmente intelligenti da non bloccare gli scopi di ricerca e medici
-



Prospettive e sviluppi

- Aumentare la diversità genica in popolazioni vicine all'estinzione
- Utilizzo epigenetico del sistema Crispr
- RNA editing



Il corso "Insegnare le scienze con l'IBSE"



Negli ultimi anni numerosi studi europei hanno evidenziato la necessità di rinnovare le metodologie didattiche per l'insegnamento delle Scienze. L'Inquiry-Based Science Education (IBSE) si presenta come un valido approccio induttivo basato sull'investigazione e la collaborazione e finalizzato allo sviluppo dell'attitudine alla sperimentazione e alla risoluzione di problemi "in situazione".

a cura di Antonella Alfano, Vincenzo Boccardi, Gabriella Colaprice, Ernesta De Masi, Giulia Forni

MODULO 1

Le prove internazionali e il rinnovamento delle discipline scientifiche

MODULO 2

I principi dell'IBSE

MODULO 3

L'inquiry in classe: proposte didattiche

MODULO 4

Restituzione degli elaborati e conclusione

Scopri di più e organizza nella tua scuola!

www.formazioneSUMISURA.it

Rizzoli
EDUCATION