

Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats (CRISPR)

CRISPR sono segmenti di DNA contenenti brevi sequenze ripetute. Ogni ripetizione è seguita da brevi frammenti di DNA «distanziatore», generato da una passata esposizione del batterio a virus batteriofagi o plasmidi ed incorporate **nei procarioti**, derivante non solo da DNA virali, ma anche raccattate dall'ambiente esterno, come molecole di DNA degradato.

CRISPR sono state scoperte per la prima volta nel **1987** in *E. coli* da Yoshizumi Ishino, ma a quell'epoca la loro funzione non era conosciuta. Nel **2000** furono identificati simili cluster di ripetizioni di sequenza in altri batteri e archeobatteri (SRSR), ma furono chiamati CRISPR solo nel **2002**.

La loro funzione ed importanza è stata compresa dopo la scoperta di un **complesso di geni associati a tali sequenze, denominati Cas** (CRISPR-associated), in grado di codificare per nucleasi ed elicasi, enzimi in grado di tagliare il DNA.

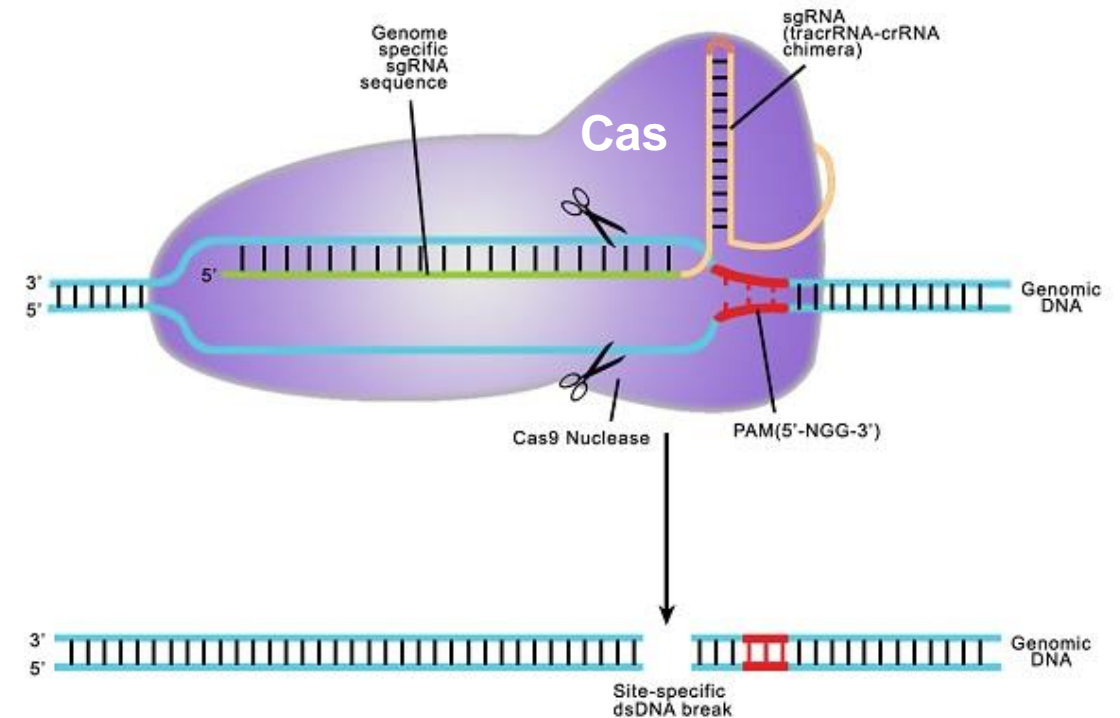


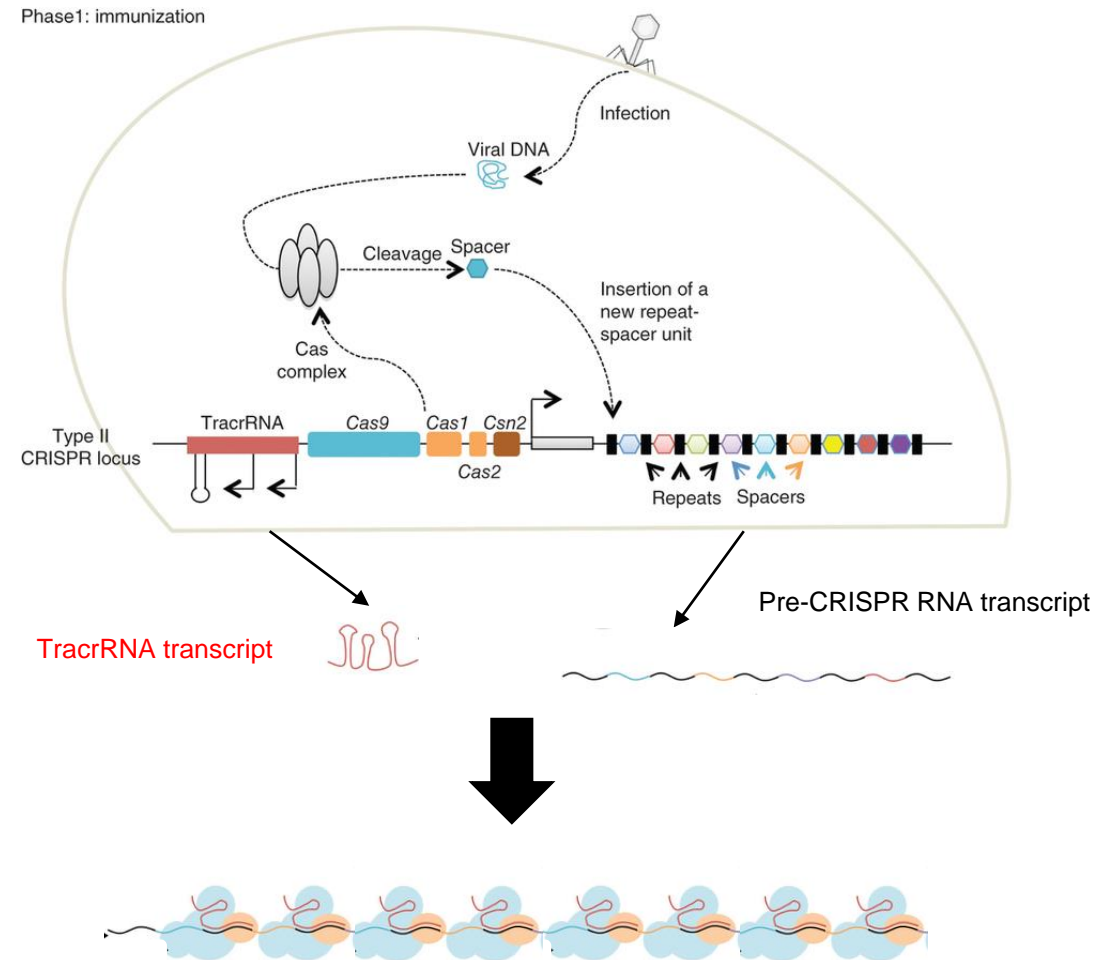
Illustration of CRISPR/Cas9-mediated genome editing
<http://www.genecopoeia.com/product/crispr-cas9/>

Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats (CRISPR)

Nel **2005**, tre gruppi di ricerca indipendenti dimostrarono che **gli *spacer* (spaziatori) sono frammenti di DNA derivati da virus** che, in precedenza, avevano cercato di infettare la cellula e che venivano inseriti tra sequenza di DNA ripetute, chiamate ***repeats***.

Jennifer Doudna ed Emmanuelle Charpentier hanno scoperto che **il batterio reagisce alle successive infezioni virali trascrivendo questi *spacer* e i repeat di DNA adiacenti in una unica lunga molecola di RNA pre-CRISPR**.

Questa molecola **si associa** ad altri trascritti del cluster **TracrRNA** e alla **cas9** (sempre codificata dallo stesso cluster genico), **per essere tagliata poi in singole unità (ciascun contenente un unico spacer)**.



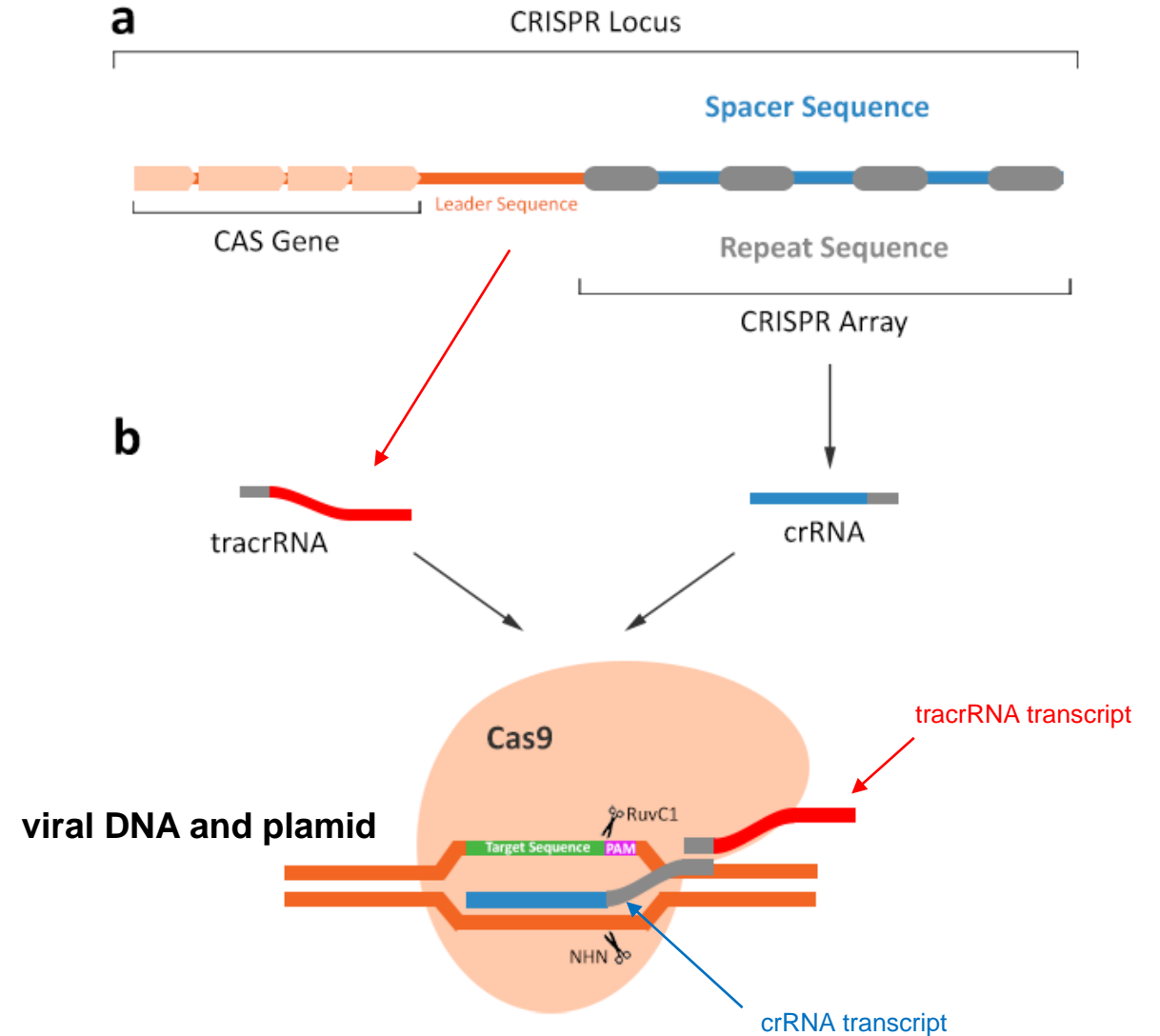
CRISPR locus

Il complesso molecolare CRISPR/Cas9:

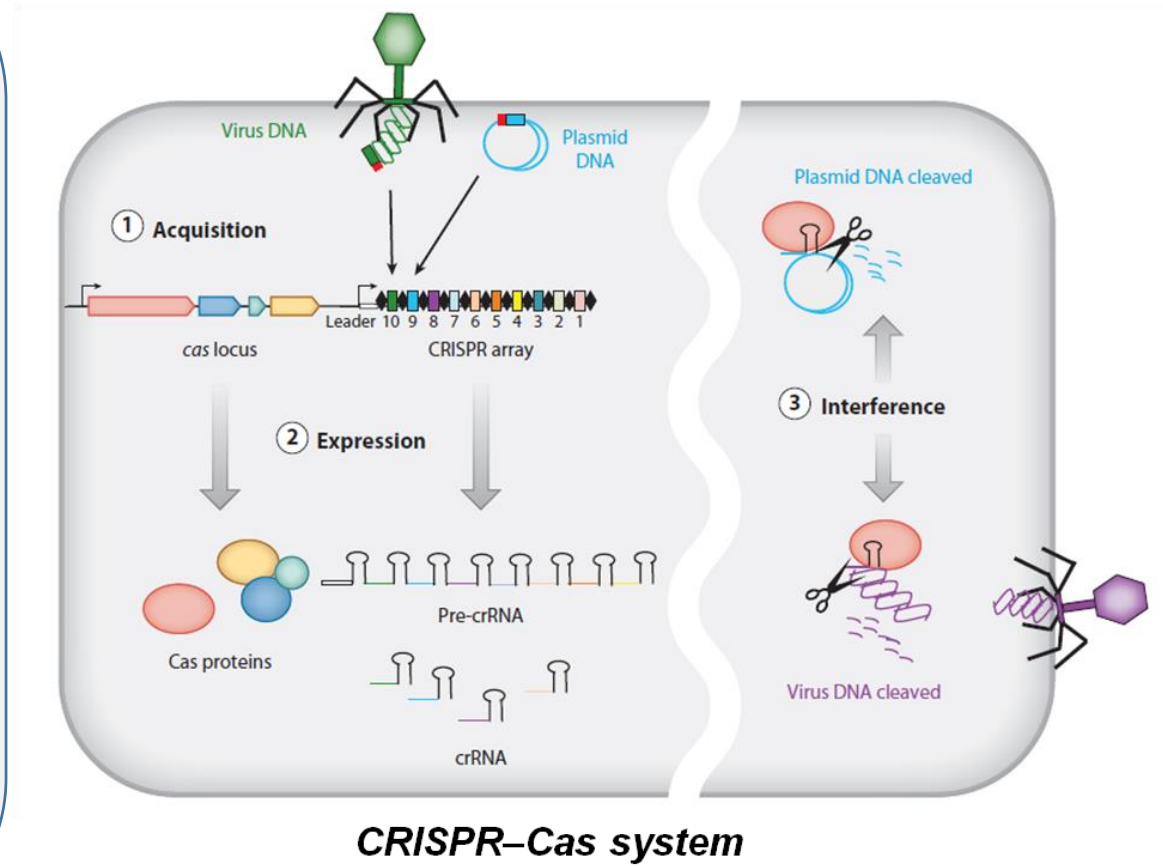
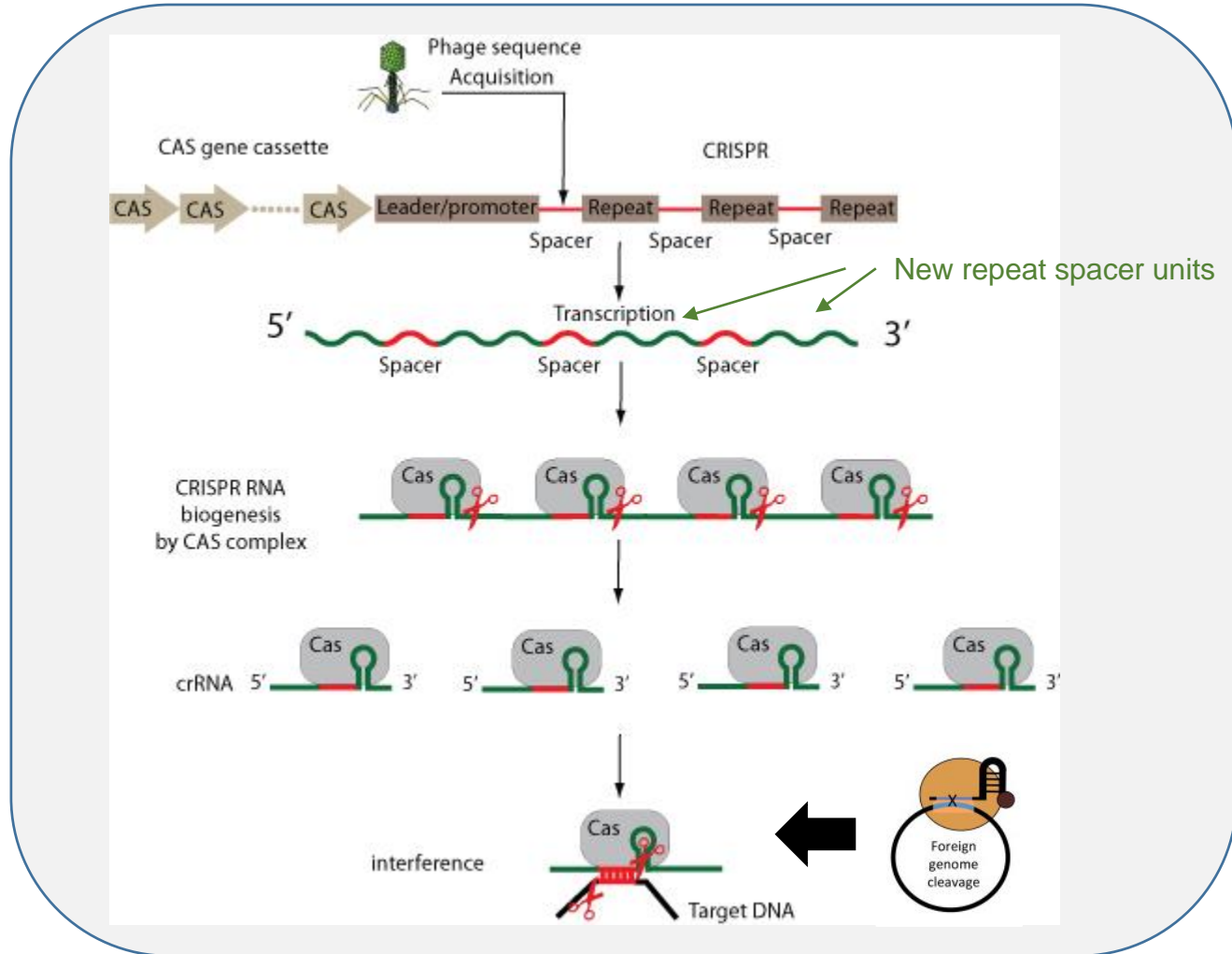
- Riconosce mediante la sequenza *spacer* (crRNA) le sequenze di un virus infettante complementari, funzionando da «guida» e dirigendo il complesso CRISPR/Cas9 sul DNA target
- poi l'attività nucleasica della Cas9 taglia il DNA bersaglio.

L'associazione CRISPR/Cas costituisce un sistema immunitario procariotico che conferisce resistenza al batterio nei confronti di elementi genetici estranei (plasmidi e fagi).

Koonin e colleghi proposero che funzionassero come il sistema chiamato *RNA interference* usato nelle cellule eucariote per lo spegnimento genico, anche questo è un sistema diretto verso sequenze bersaglio di acidi nucleici.



Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats (CRISPR)

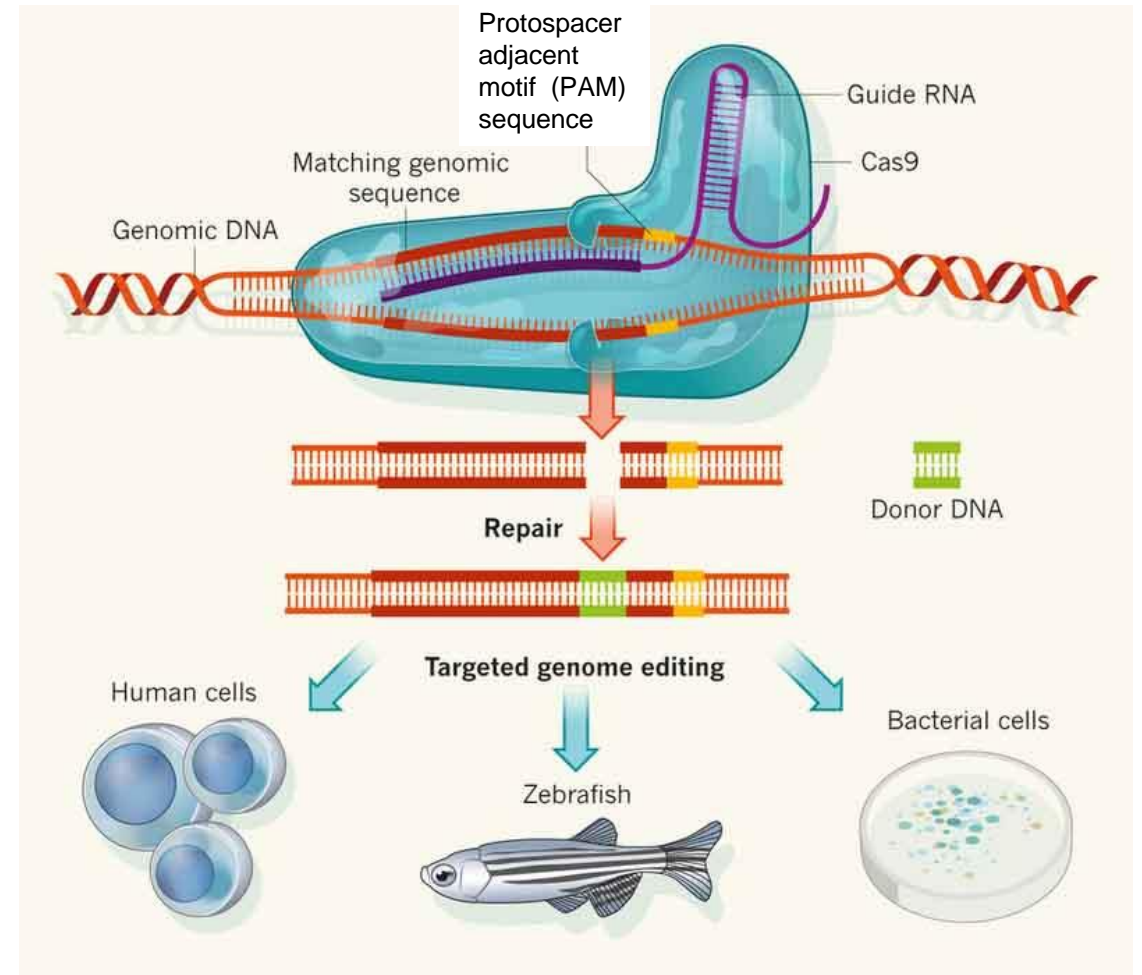


Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats (CRISPR)

Per queste sue caratteristiche, il sistema CRISPR/Cas è usato nell'ingegneria genetica (rimuovendo, aggiungendo o modificando la sequenza di geni specifici) in molte specie.

Introducendo la proteina Cas9 e gli appropriati RNA guida (gRNA) nelle cellule, il genoma può essere tagliato in qualsiasi punto in maniera estremamente precisa e con una tecnica semplice.

CRISPR apre la strada all'alterazione del codice genetico, con numerose applicazioni nella manipolazione del genoma di piante nell'agricoltura, del bestiame da allevamento, ma anche umano. **Ovviamente le prospettive potenziali di questo metodo sollevano importanti questioni etiche.**



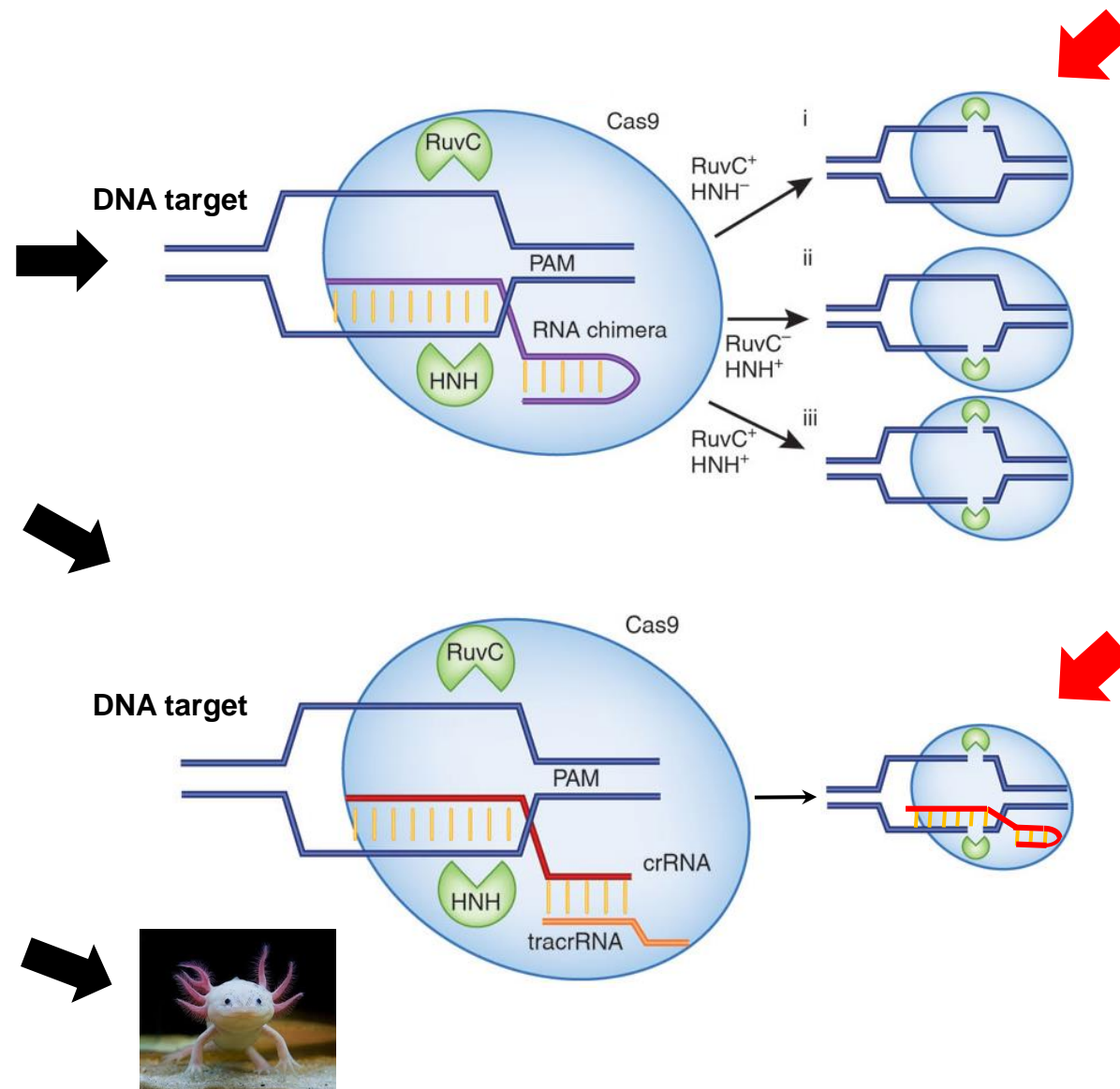
CRISPR/Cas system e gene editing

Cas9 è una nucleasi specializzata nel taglio del DNA: ha due siti di taglio attivi (HNH and RuvC), uno per ciascun filamento della doppia elica di DNA.

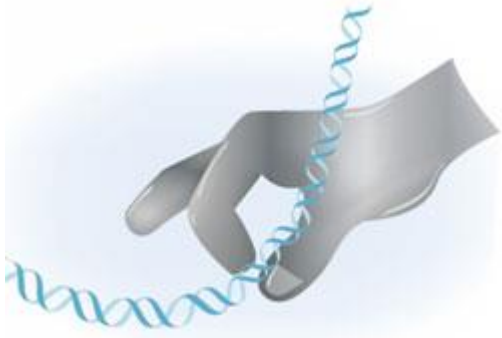
Il team di Doudna e Charpentier ha dimostrato che **è possibile disabilitare uno o entrambi i siti**, preservando la capacità della Cas9 di legare il suo DNA target.

Nel **2012 Jinek M ha combinato tracrRNA e RNA spaziatore in una singola molecola di "RNA a guida"** che, unita a Cas9, riusciva a riconoscere e tagliare i corretti DNA bersaglio. Jinek et al hanno proposto l'uso di questi **RNA guida sintetici per l'editing genetico**.

Nel **2015** si è avuta la prima prova che CRISPR potesse essere usato per ingegneria genetica e **l'editing del genoma** in colture cellulari umane. Da allora è stato impiegato in un ampio spettro di organismi tra cui il lievito di birra (*Saccharomyces cerevisiae*), pesce zebra (*Danio rerio*), moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*), axolotl (*A. mexicanum*), nematodi (*Caenorhabditis elegans*), piante, topi scimmie, embrioni umani non vitali, e altri organismi viventi.



Gene editing usando nucleasi a dita di zinco

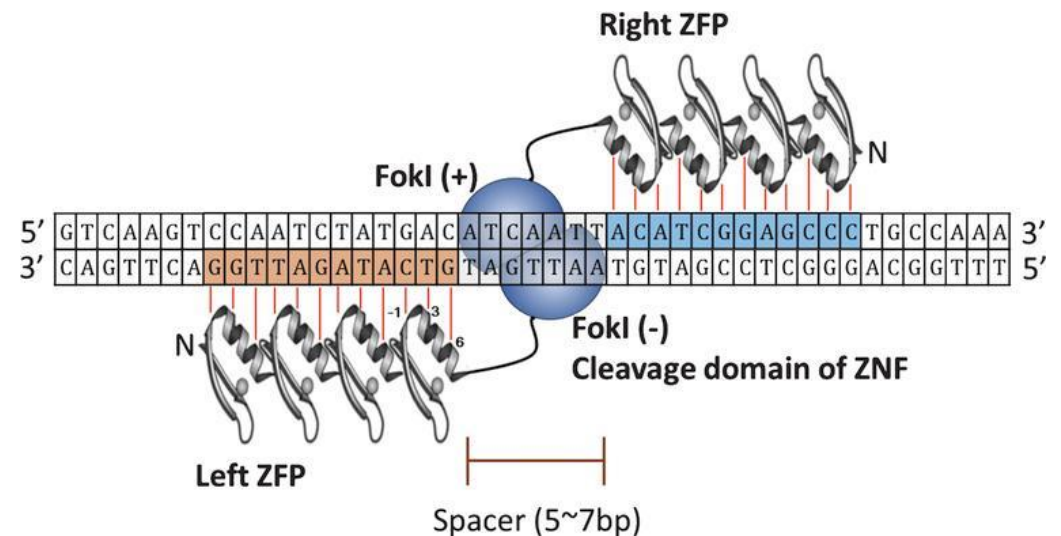
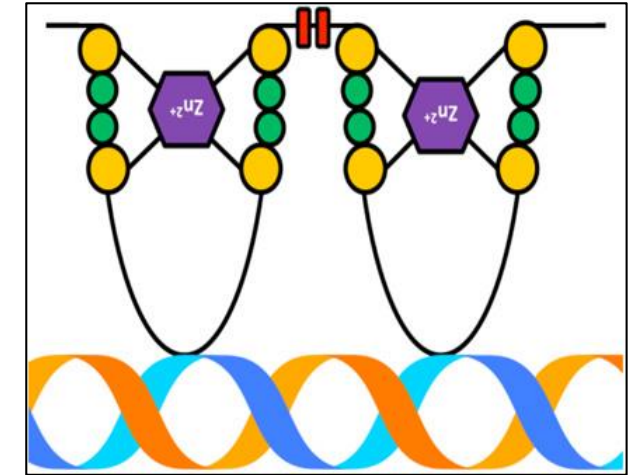
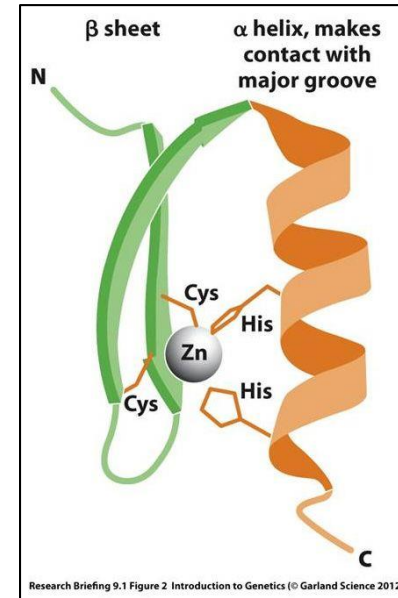


L'enzima FokI, presente in natura nel batterio *Flavobacterium okeanoikoites*, è un'endonucleasi di restrizione di tipo IIS costituita da un **dominio N-terminale, legante il DNA**, e un **dominio C-terminale, che taglia il DNA** in maniera aspecifica.

FokI funziona come un **dimero** e dopo aver legato il **sito di riconoscimento 5'-GGATG-3'** sul dsDNA, taglia il DNA (senza ulteriori specificità di sequenza), producendo un taglio sul primo filamento 9 nucleotidi a valle e sul secondo filamento circa 13 nucleotidi a monte rispetto al sito di riconoscimento.

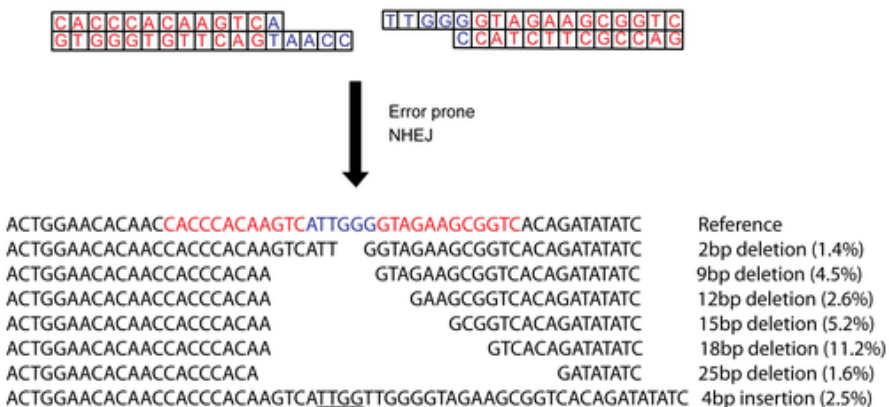
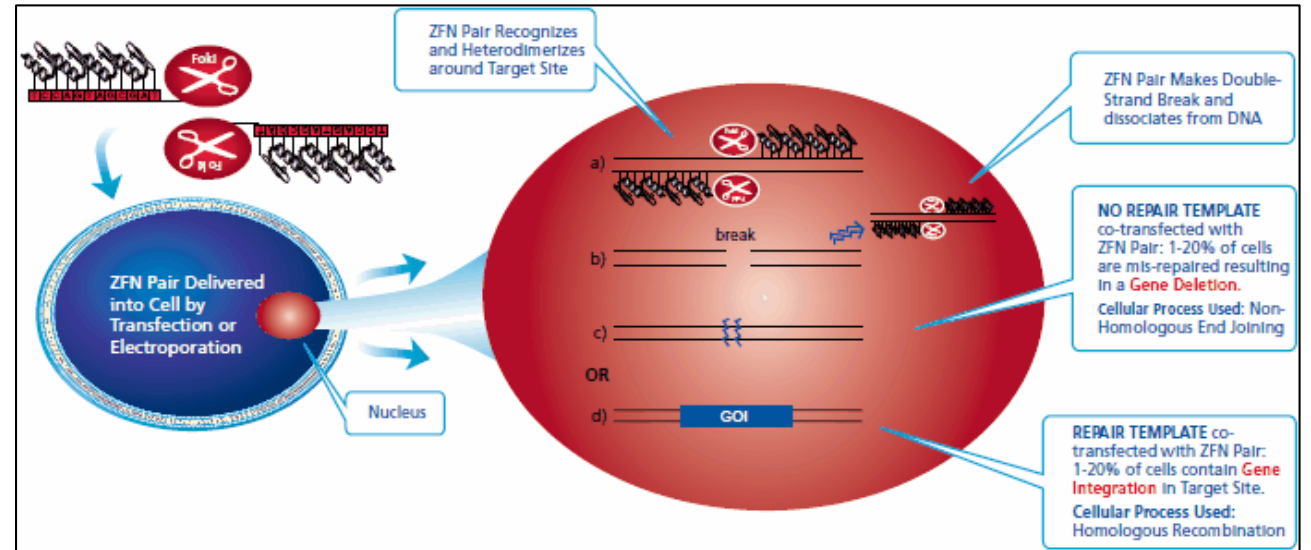
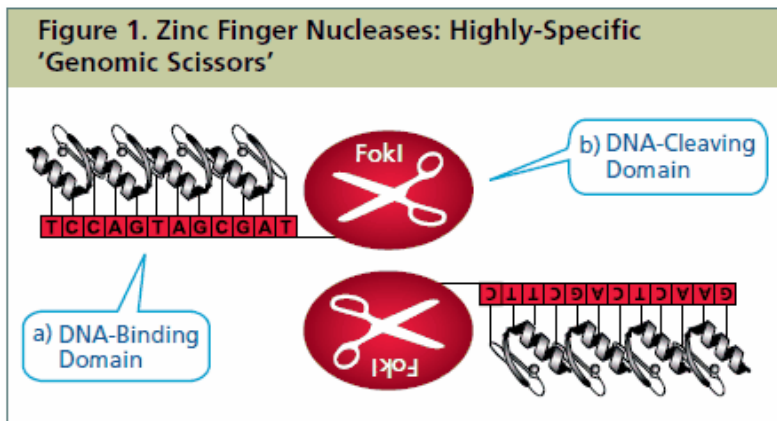
Il dominio di taglio non specifico del DNA dell'endonucleasi FokI può essere usato per costruire nucleasi ibride aventi siti di legame al DNA più specifici, come le Zinc finger nuclease (ZFN).

Grazie all'ingegnerizzazione di specifiche endonucleasi è quindi possibile introdurre **un taglio in una regione determinata del genoma.**



Gene editing usando nucleasi a dita di zinco

Nei primi anni 2000, la ricerca aveva sviluppato le **nucleasi a dita di zinco**, proteine sintetiche i cui DNA-binding domains permettono di rompere il doppio filamento del DNA in **corrispondenza di specifiche sequenze**.



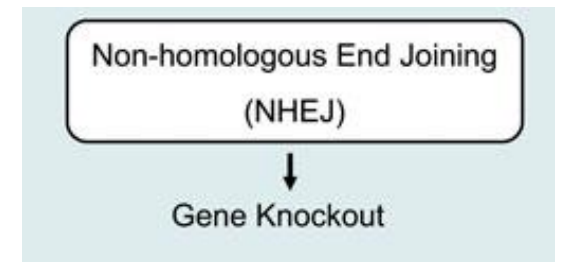
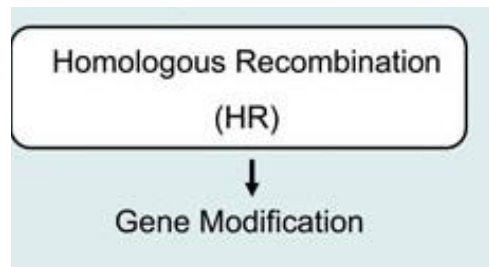
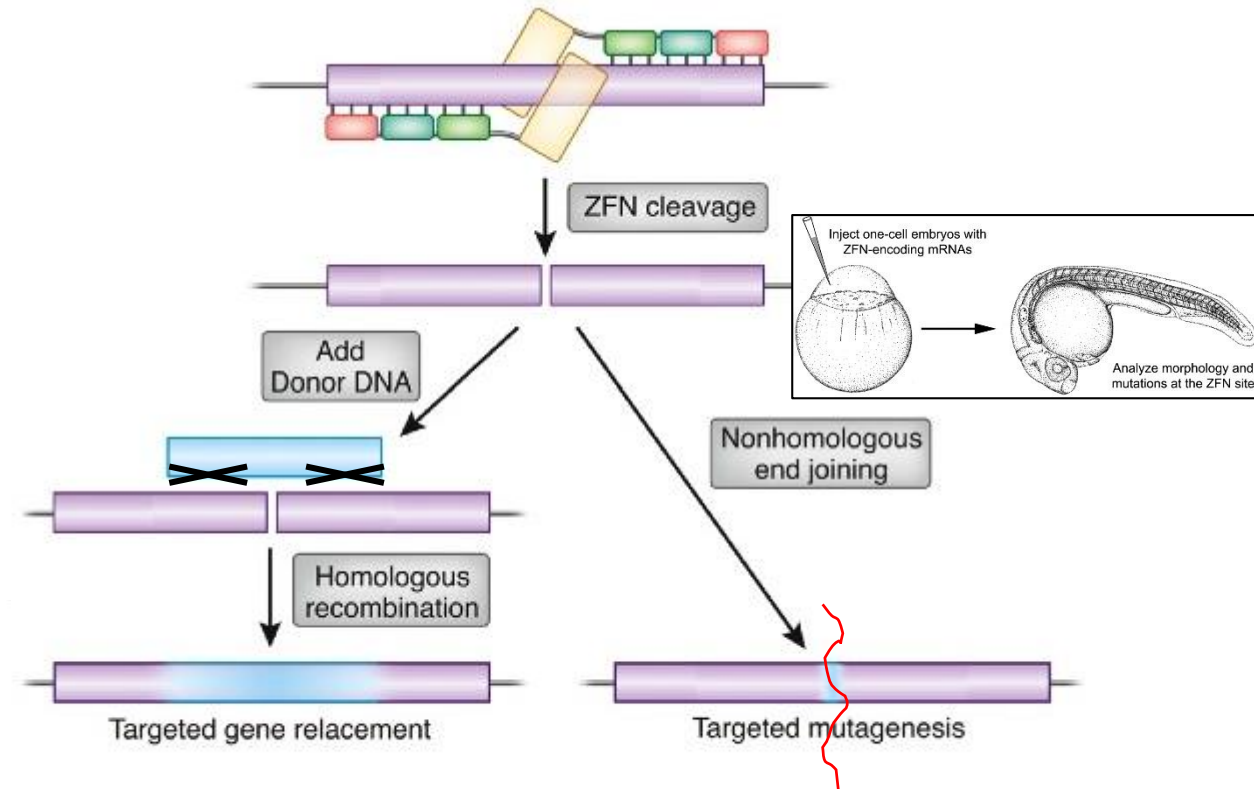
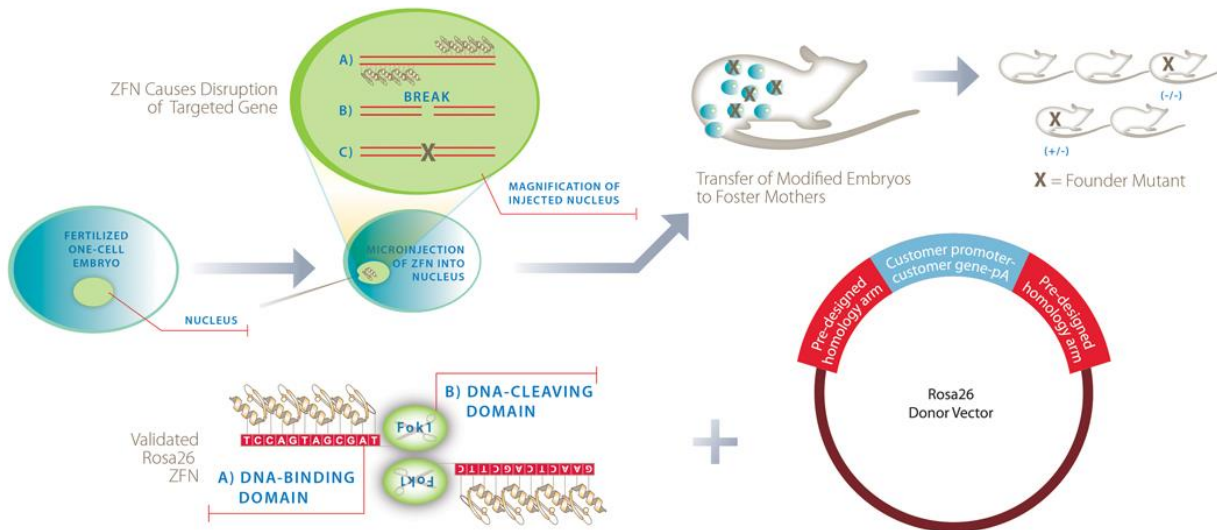
Il **genome editing** è una tecnica che consente di **introdurre, eliminare o alterare sequenze di DNA** all'interno del genoma in una **posizione specifica**.

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

Questi enzimi possono essere costruiti in modo da tagliare sequenze di DNA stabilite dallo sperimentatore e riconosciute dalle estremità ZFN.

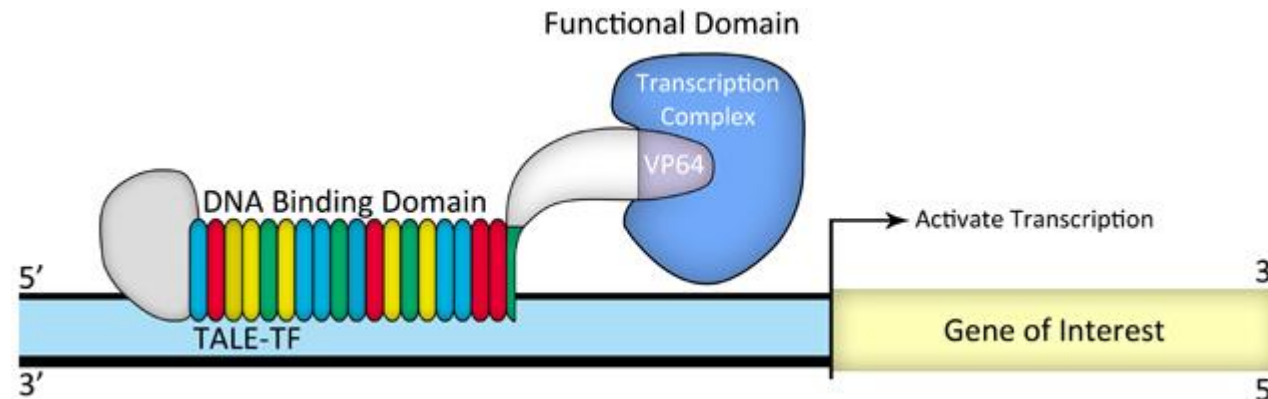
Gene editing usando nucleasi a dita di zinco

- La **ZFN** legherà i siti specifici sul genoma bersaglio e l'enzima **FokI** lo taglierà inattivandolo.
- **Ma se:**
 1. oltre a questi enzimi (**ZFN**)
 2. si trasfetta nella cellula frammento di **DNA ricombinante (gene ricombinante)** contenente alle estremità brevi sequenze omologhe a quelle fiancheggianti il sito di taglio nel DNA bersaglio
 3. il **DNA esogeno sarà inserito nel punto in cui hanno agito le endonucleasi**, grazie al fenomeno della **ricombinazione omologa**.



Gene editing usando Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)

Gli effettori TAL (simili a ZFN) **sono proteine che vengono secrete** dai batteri *Xanthomonas*, che le iniettano nelle cellule delle piante, dove arrivate nel nucleo attivano la trascrizione di geni specifici, che rendono la pianta più suscettibile all'infezione. Il **dominio legante il DNA è formato da una sequenza altamente conservata di 33-34 aminoacidi ripetuti col 12° e 13° aminoacido divergenti**. Queste due posizioni, sono indicate come Repeat Variable Diresidue (**RVD**), sono molto variabili e **fortemente correlati al riconoscimento specifico dei nucleotidi sul DNA bersaglio**.



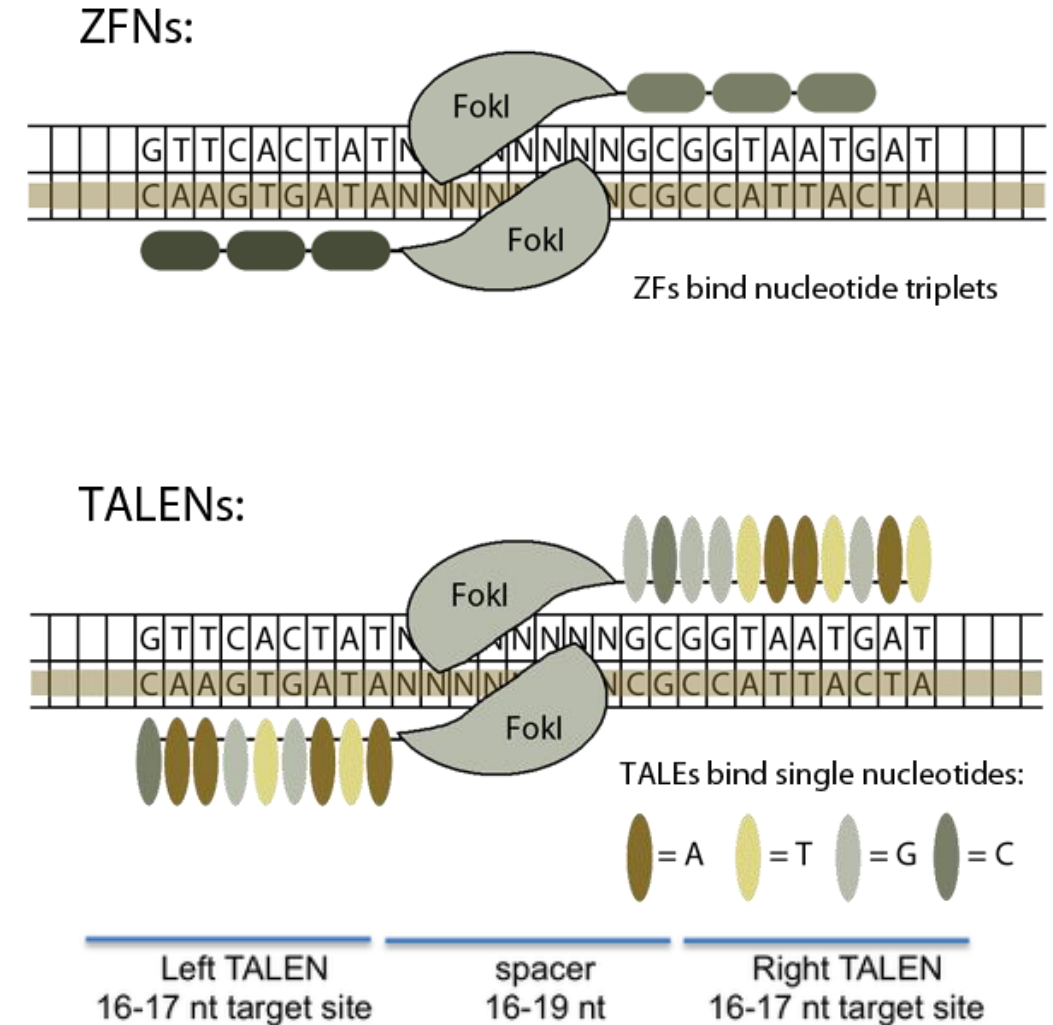
Questo rapporto diretto tra la sequenza di aminoacidi e il riconoscimento di sequenze specifiche sul DNA ha permesso la **progettazione di domini leganti il DNA sequenza-specifici, selezionando una combinazione appropriata di RVD**.

Gene editing usando Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)

Il dominio di taglio non specifico del DNA dell'endonucleasi FokI può essere quindi usato per costruire nucleasi ibride con TALEN. Inizialmente i primi ibridi usavano il dominio nucleasico di FokI wild-type, ma successivamente sono state usate varianti del dominio nucleasico di FokI progettando mutazioni per migliorarne la specificità e l'attività.

Tuttavia il numero di amminoacidi tra il dominio di TALEN legante il DNA e il dominio nucleasico di FokI ed il numero di basi sul DNA dei rispettivi siti di legame e taglio sono parametri importanti da considerare durante l'ingegnerizzazione della proteina per ottenere elevati livelli di attività.

<http://circres.ahajournals.org/content/113/5/571.full.pdf+html>



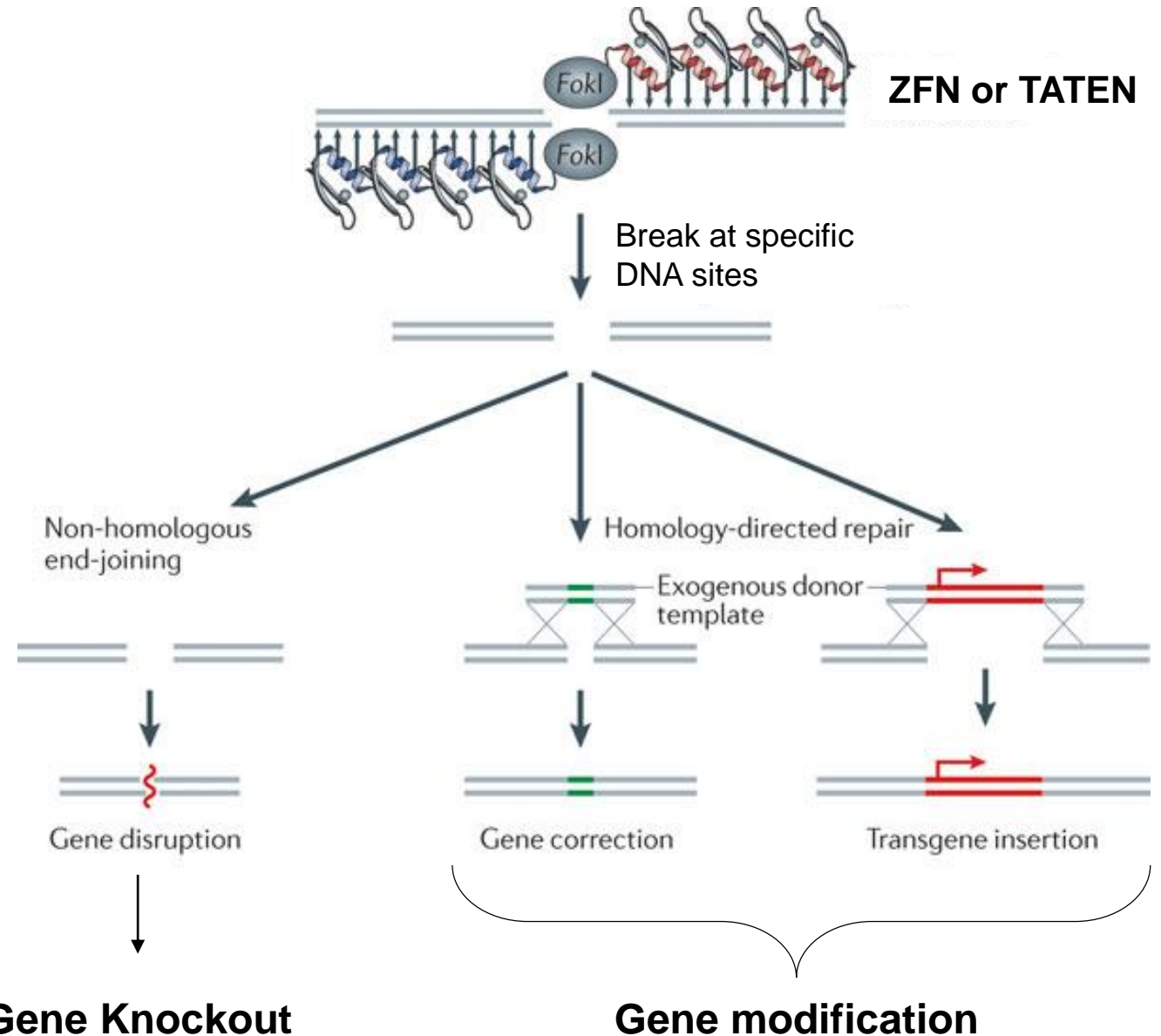
Gene editing

Nei primi anni 2000, la ricerca aveva sviluppato le **nucleasi a dita di zinco**, proteine sintetiche i cui DNA-binding domains permettono di creare rotture nella doppia elica del DNA in specifici punti.

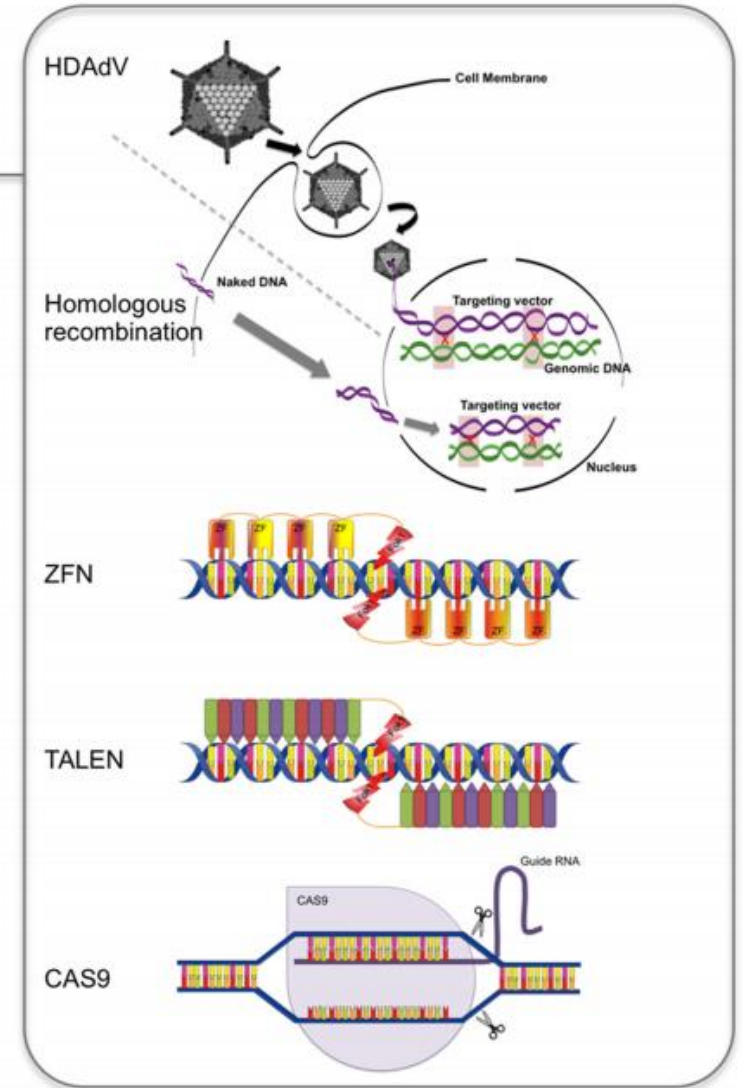
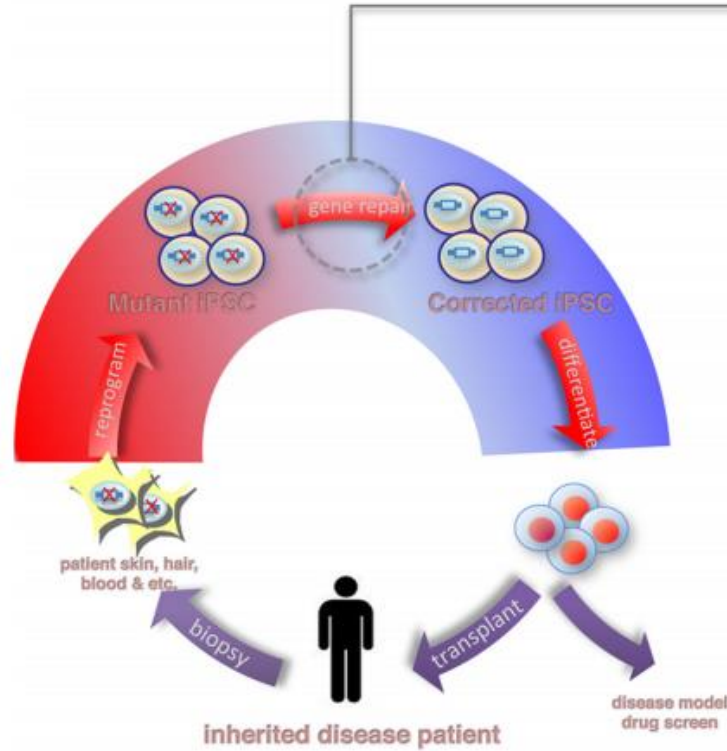
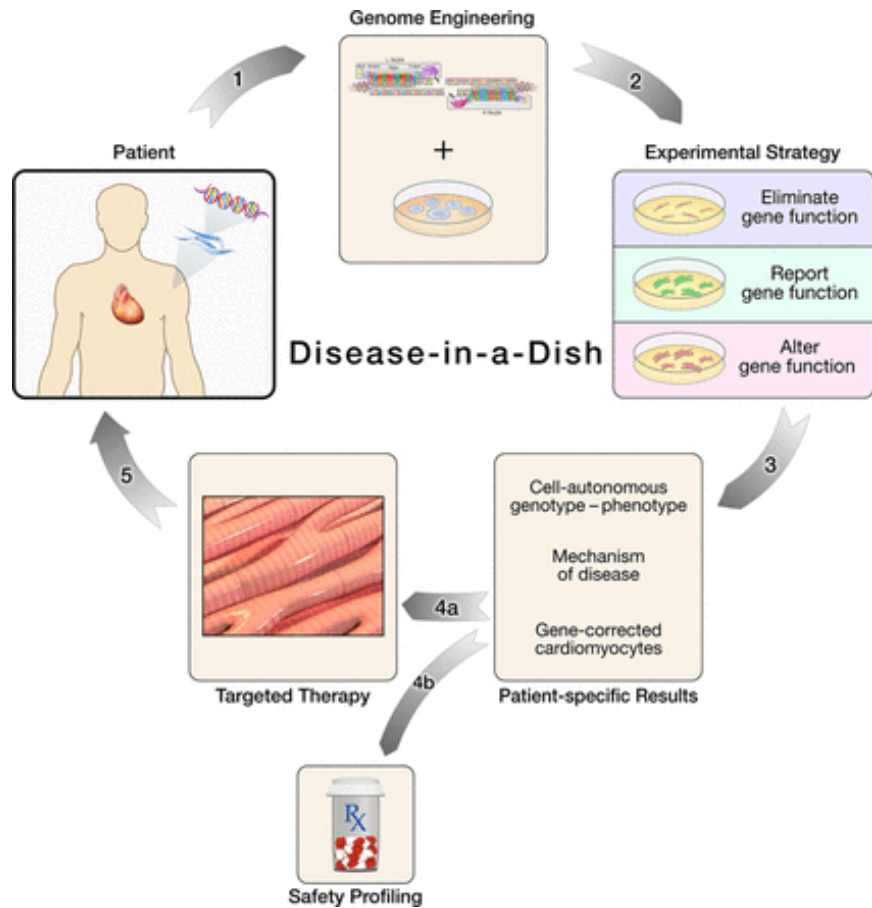
Nel 2010, le **nucleasi sintetiche chiamate TALEN** (Transcription activator-like effector nuclease) hanno fornito un modo più facile per indirizzare la rottura del doppio filamento verso posizioni specifiche del DNA.

TALEN associati ad enzimi di restrizione possono essere progettati per legarsi praticamente qualsiasi sequenza di DNA desiderato, in modo che quando combinato con una nucleasi, il DNA può essere tagliato in punti specifici.

Possono essere introdotti nelle cellule per correggere un gene (*gene editing*) o per inserire una modifica in una specifica posizione (*gene editing in situ*).



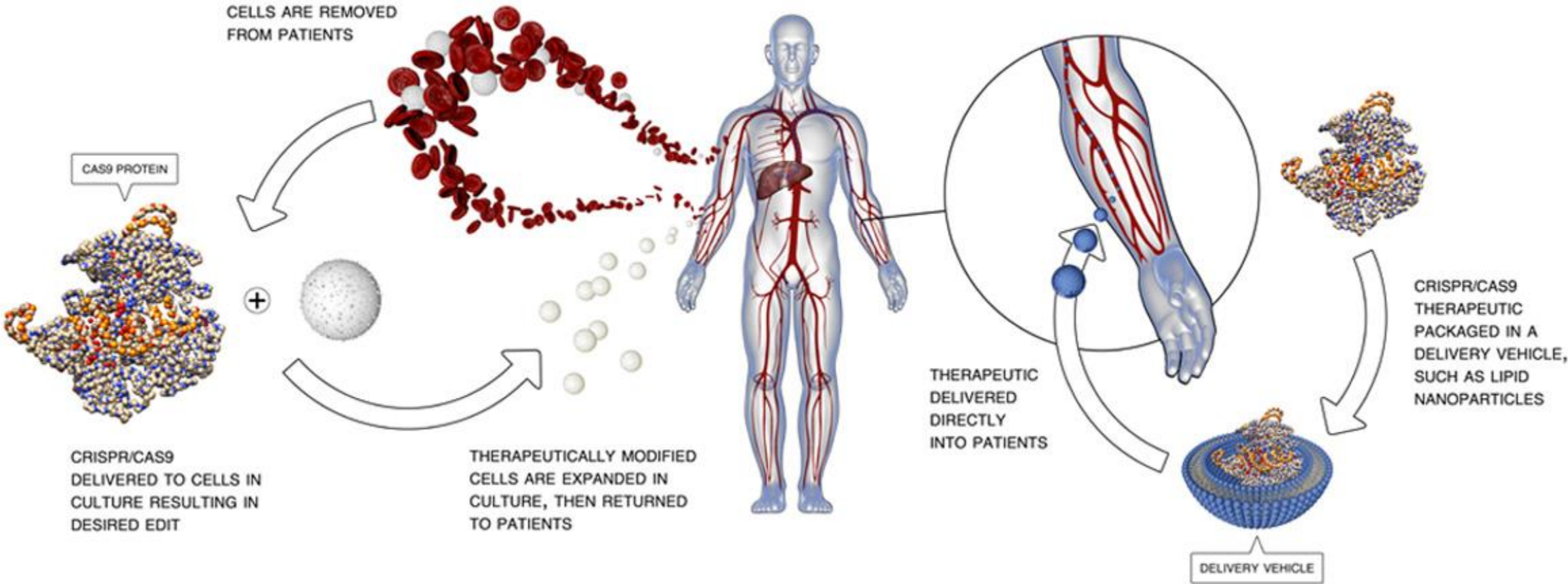
Targeted Genome Editing Technologies



Ex vivo and in vivo opportunities for gene therapy

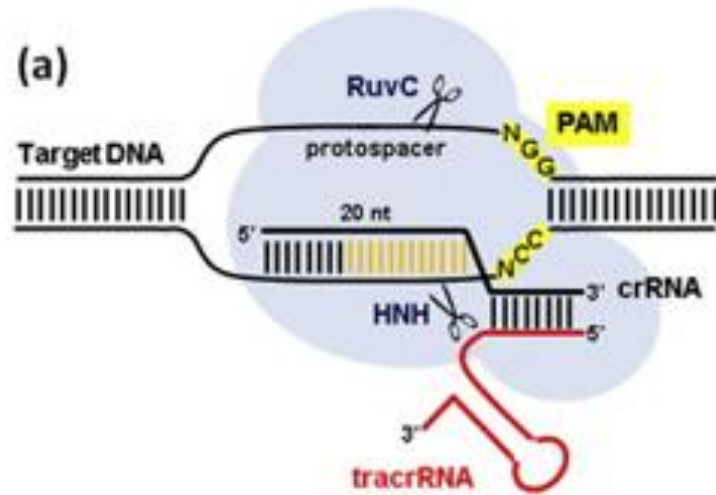
Ex Vivo

In Vivo



Gene editing e CRISPR/Cas9

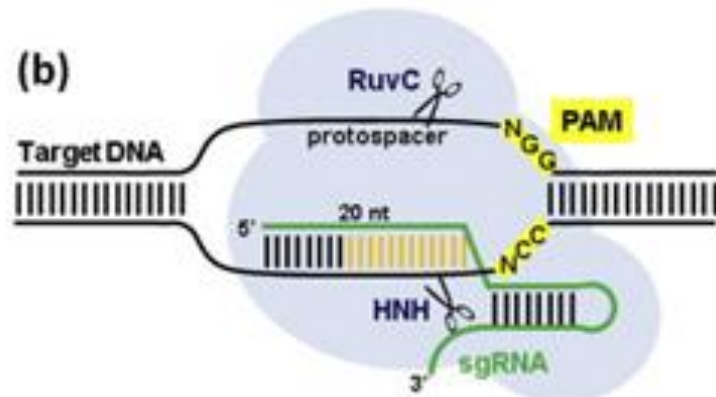
normal crRNA and tracrRNA



In bacterial type 2 CRISPR cas system, the site specificity is defined by complementary base pairing of a small CRISPR RNA (crRNA)

➤ After annealing to a transactivating CRISPR RNA (tracrRNA) the crRNA directly guides the Cas9 endonuclease to cleave the targeted DNA sequence.

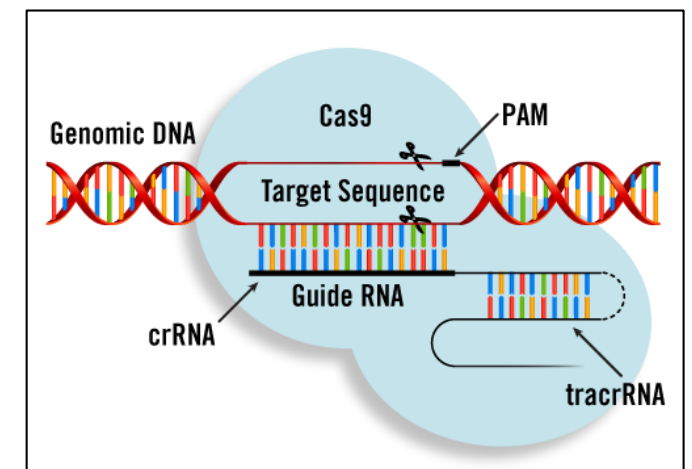
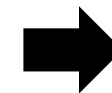
chimeric RNA (sgRNA)



➤ The crRNA-tracrRNA heteroduplex could be replaced by one chimeric RNA (so-called guide RNA (gRNA)) and the gRNA could be programmed to target specific sites.

Oltre a nucleasi (FokI) associati a ZFN o a TALEN il sistema CRISPR/Cas9 sta diventando uno strumento di primo piano nel campo della modifica del genoma.

Sia la nucleasi ZFN, che le TALEN, **richiedono tuttavia l'ingegnerizzazione e la sintesi di proteine personalizzate per ogni sequenza target di DNA**, un processo più complesso e lungo 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.



Gene editing e CRISPR/Cas9

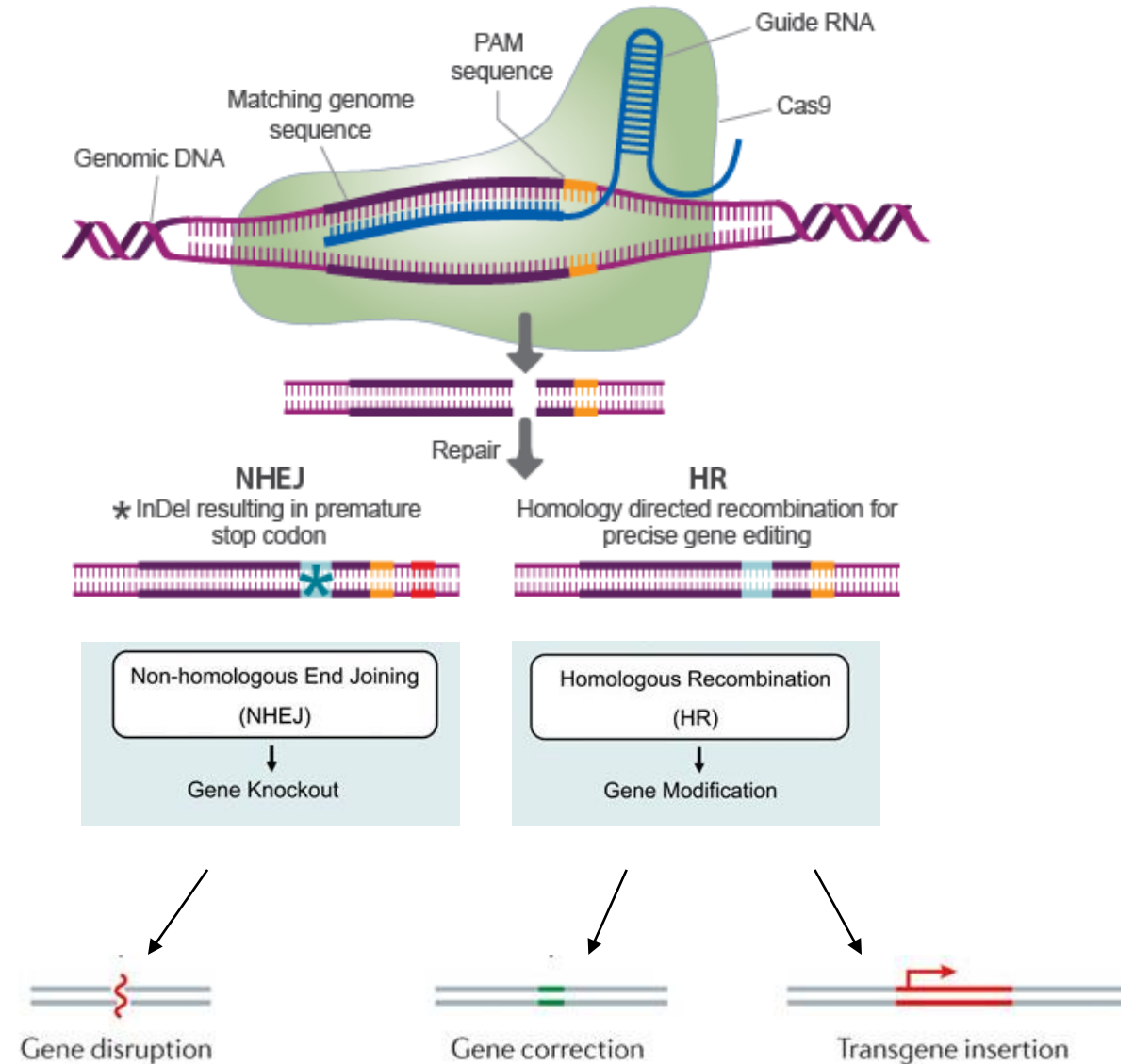
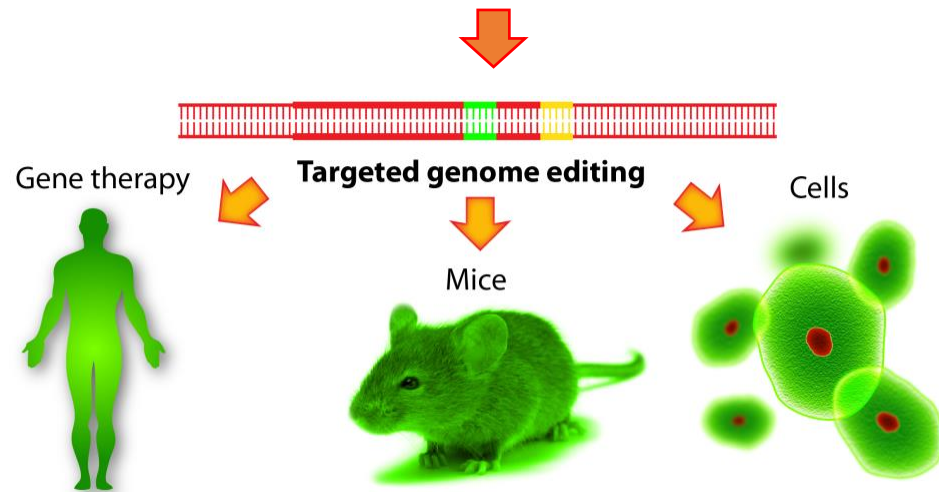
Il **genome editing** è una tecnica che consente di:

- **Introdurre,**
- **Eliminare,**
- **o Alterare sequenze di DNA all'interno del genoma in una posizione specifica.**

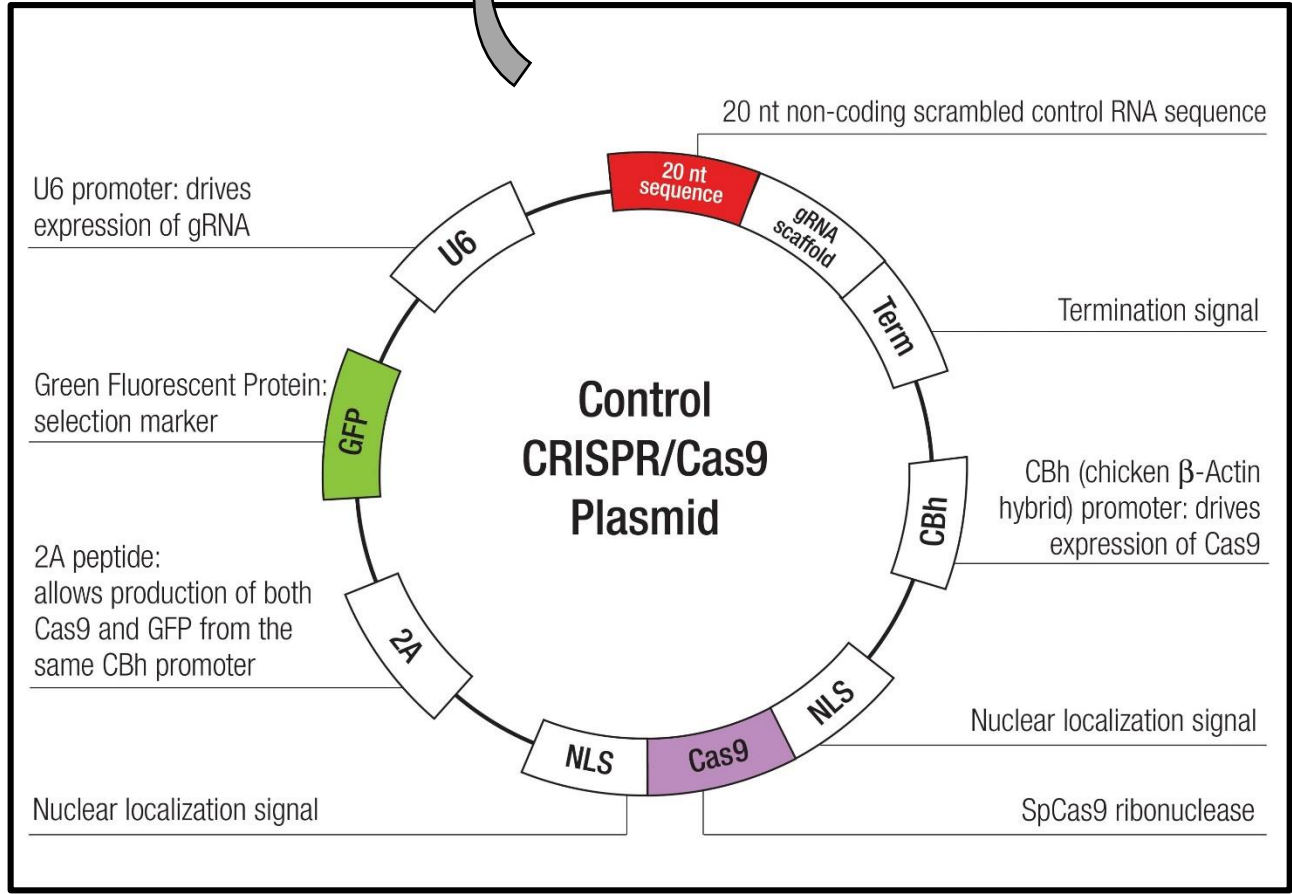
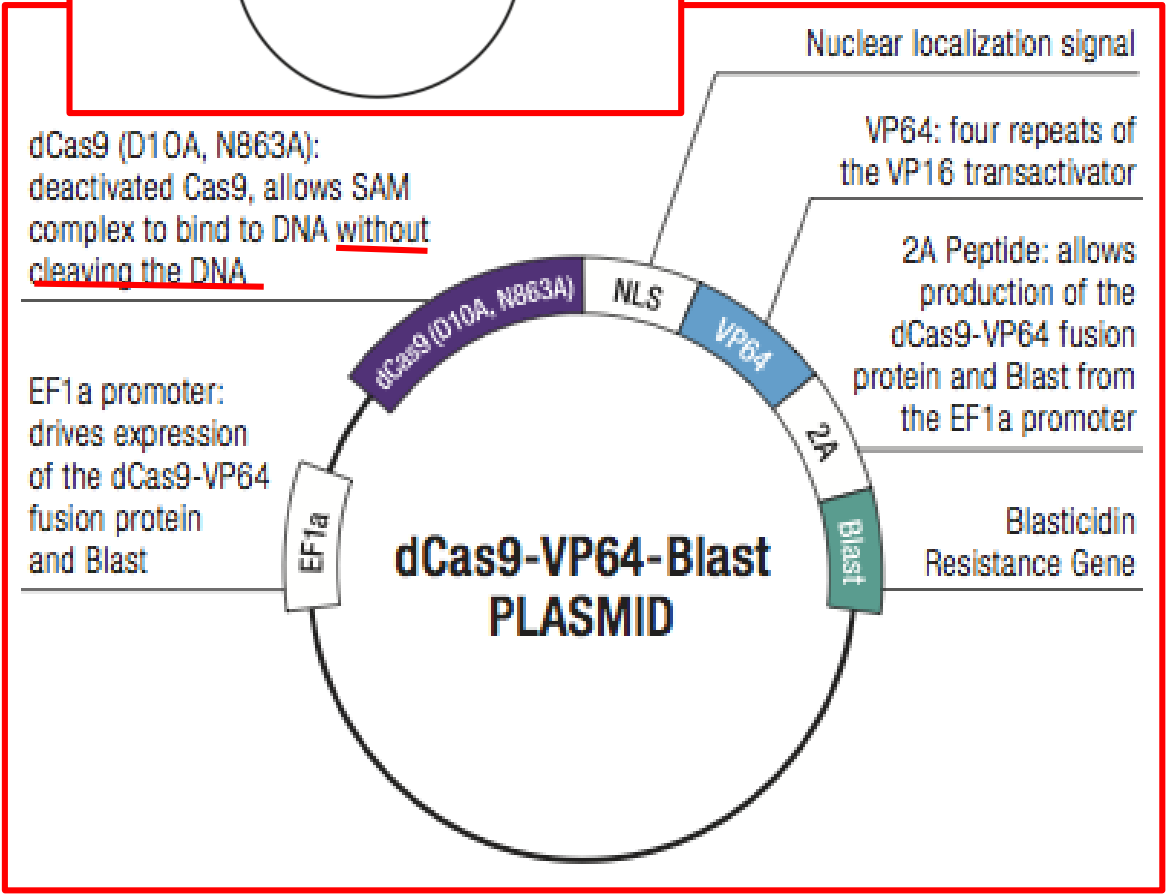
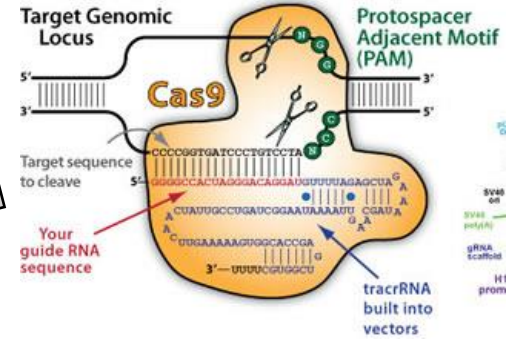
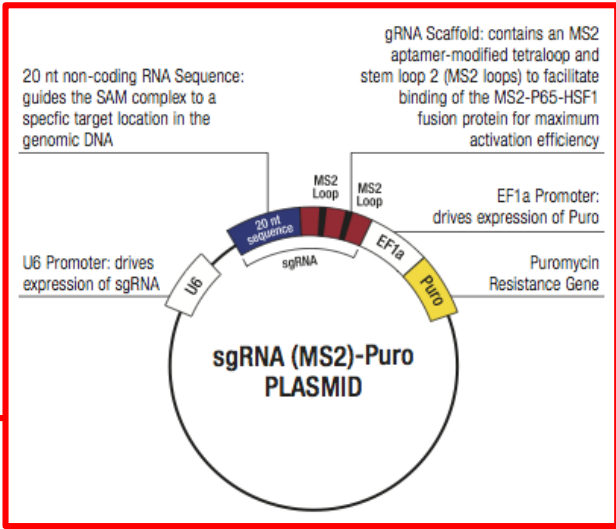
Questa tecnica si basa sull'utilizzo di particolari **endonucleasi ingegnerizzate**.

Questi enzimi possono essere costruiti in modo da tagliare sequenze di DNA stabilite dallo sperimentatore.

Sono disponibili librerie di decine di migliaia di RNA guida.

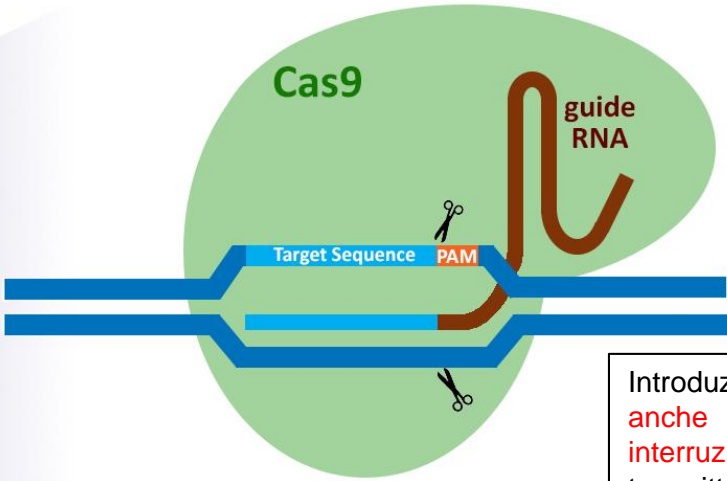
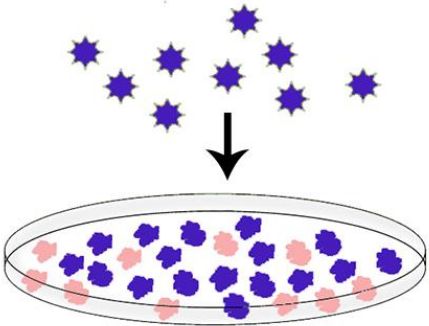


CRISPR/Cas9 vectors



Genome editing: knockout (gene silencing)

Transduce Target Cells with sgRNA and Cas9 Viruses



Introduzione di una **mutazione** (o anche di un **semplice taglio, interruzione**) che produce nel trascritto una mutazione di **stop** e la sintesi della proteina codificata da quel gene si blocca.

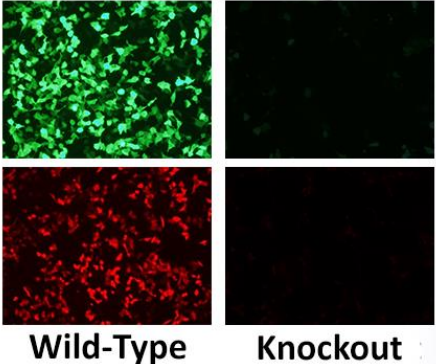
Sono quindi studiati gli effetti funzionali, in assenza di espressione della proteina d'interesse.

Double Stranded Break

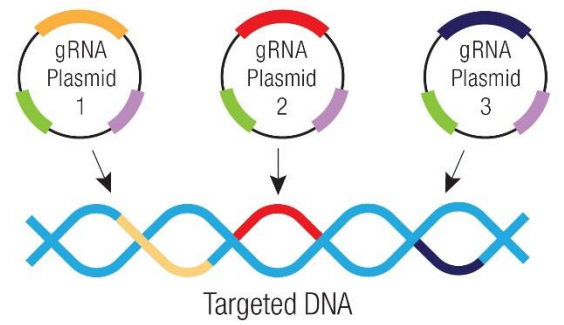
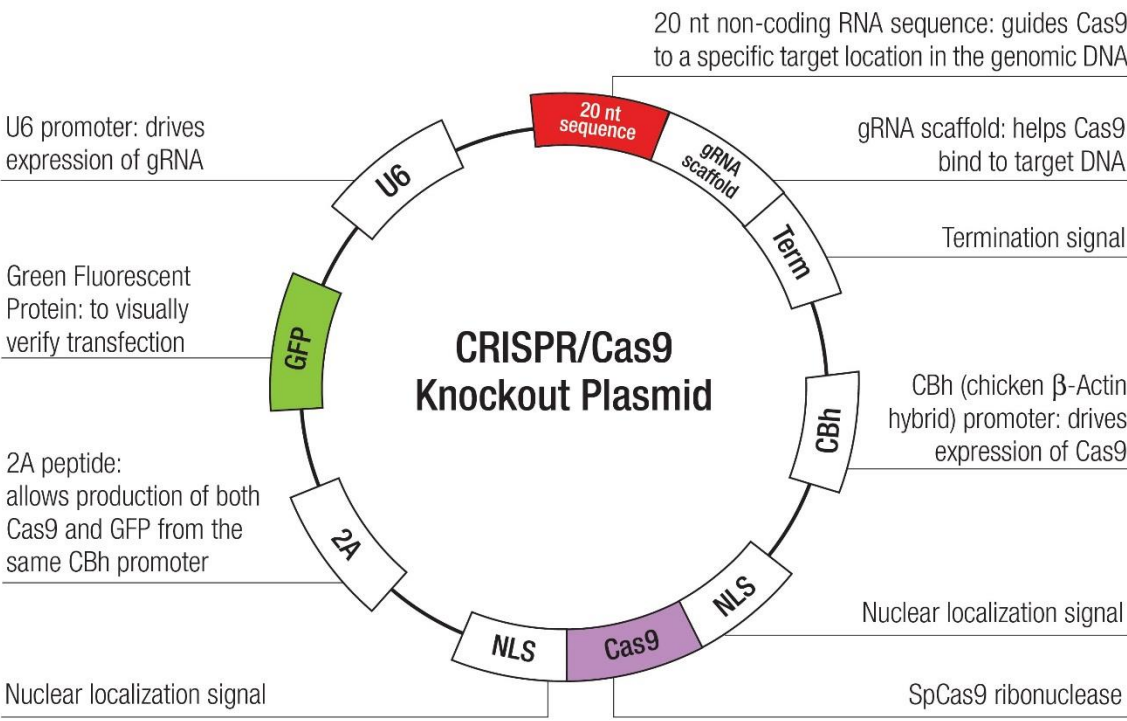
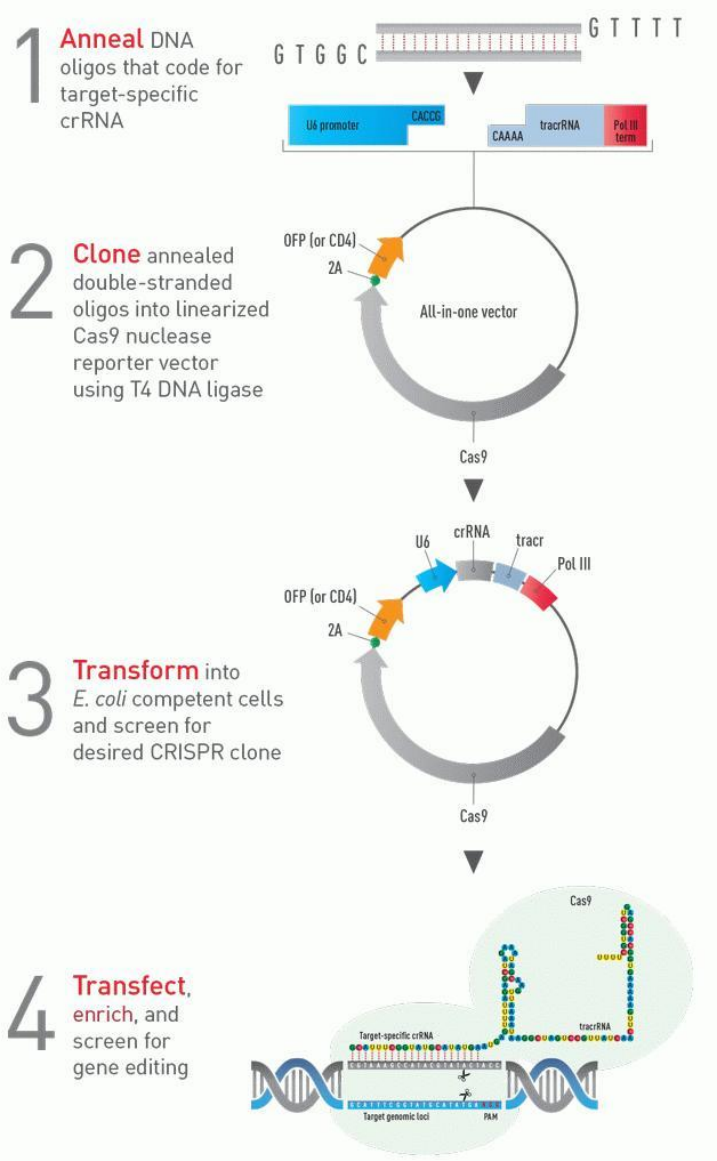


InDel Mutation After Repair by NHEJ

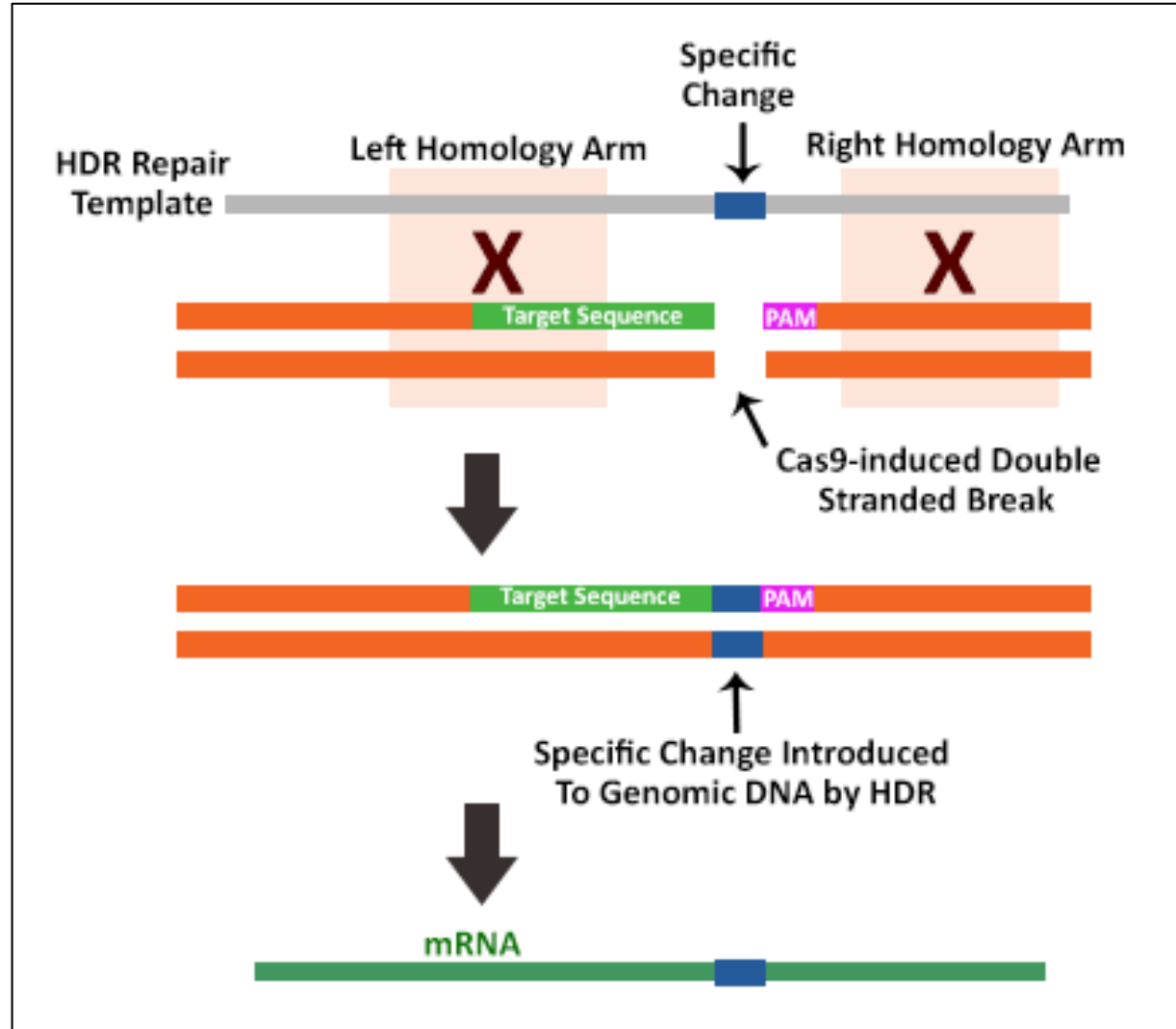
Target Gene Knockout



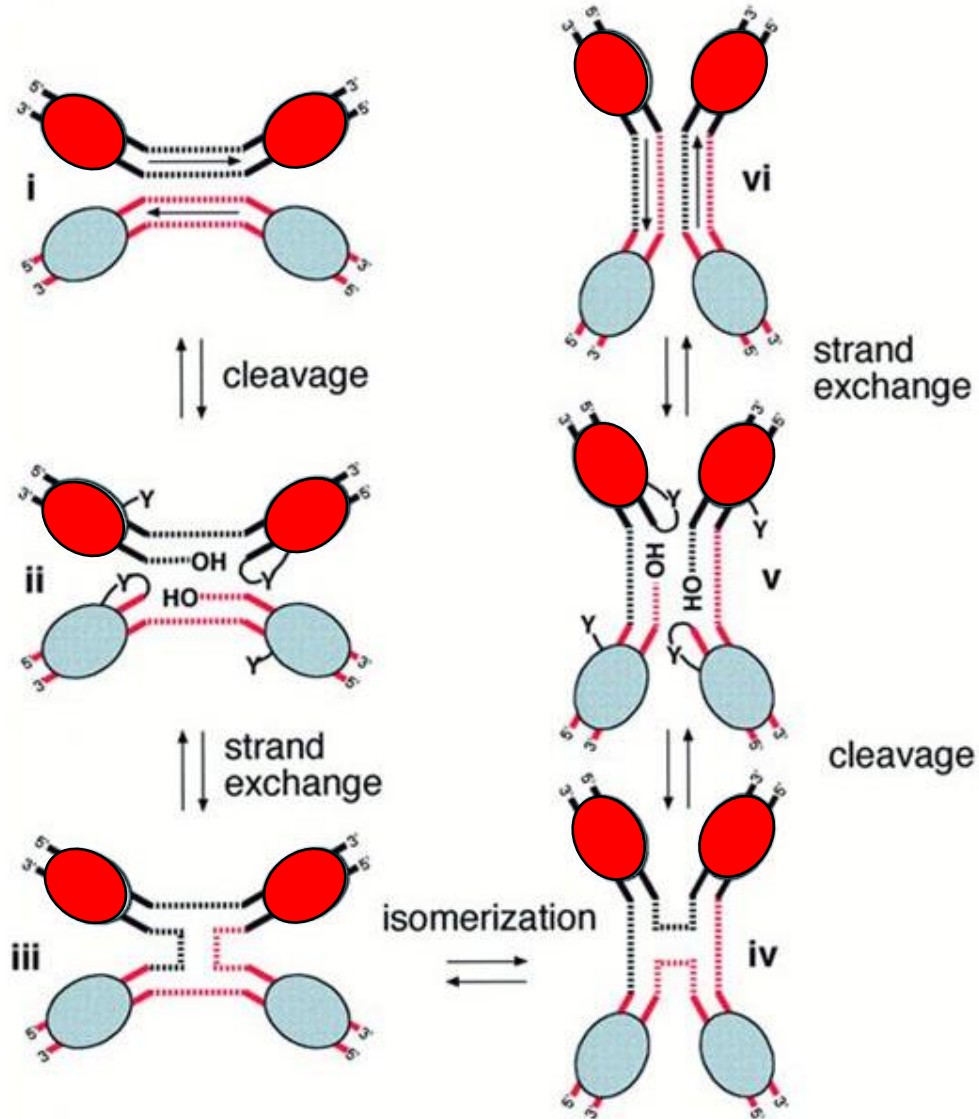
Genome editing: knockout (gene silencing)



Genome editing: Homology Directed Repair plasmid



Genome editing: Ricombinazione sequenza-specifica: modello Cre-Lox



In alcuni organismi inferiori (virus) esistono sistemi di ricombinazione sequenza-specifica. Il sistema si basa su due elementi fondamentali:

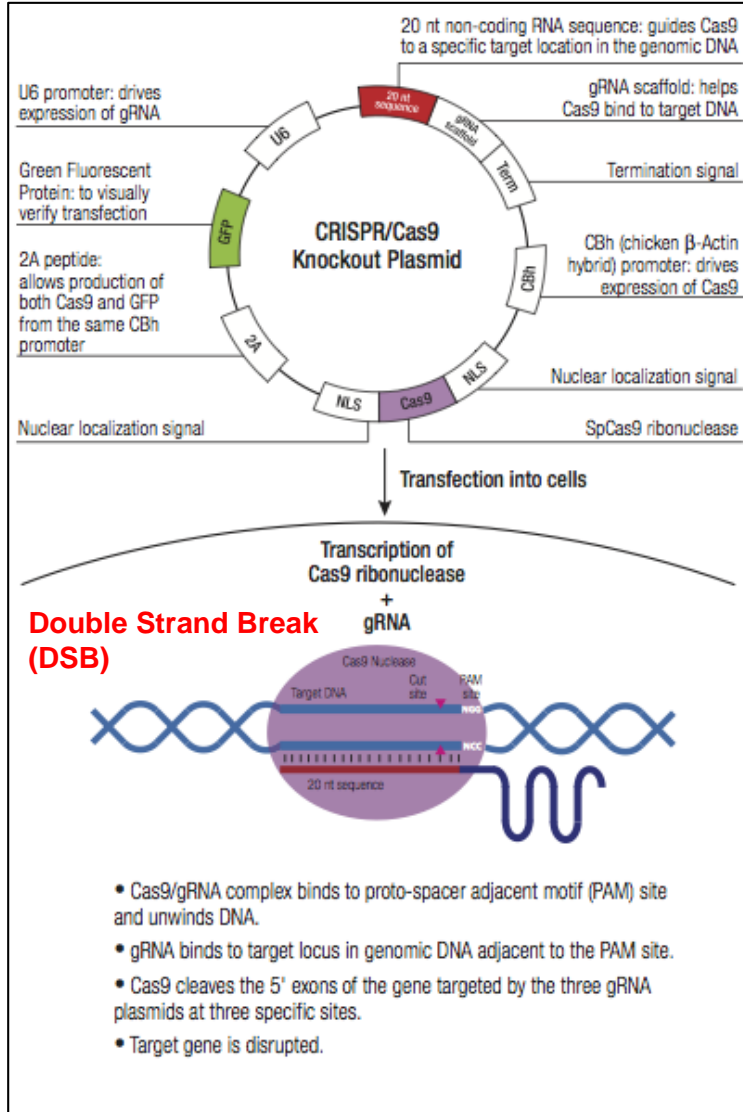
Cre è un'enzima ricombinasi e Lox la sequenza nel genoma del fago.

Cre riconosce in maniera specifica Lox ed ha bisogno di 2 sequenze Lox per fare avvenire la ricombinazione.

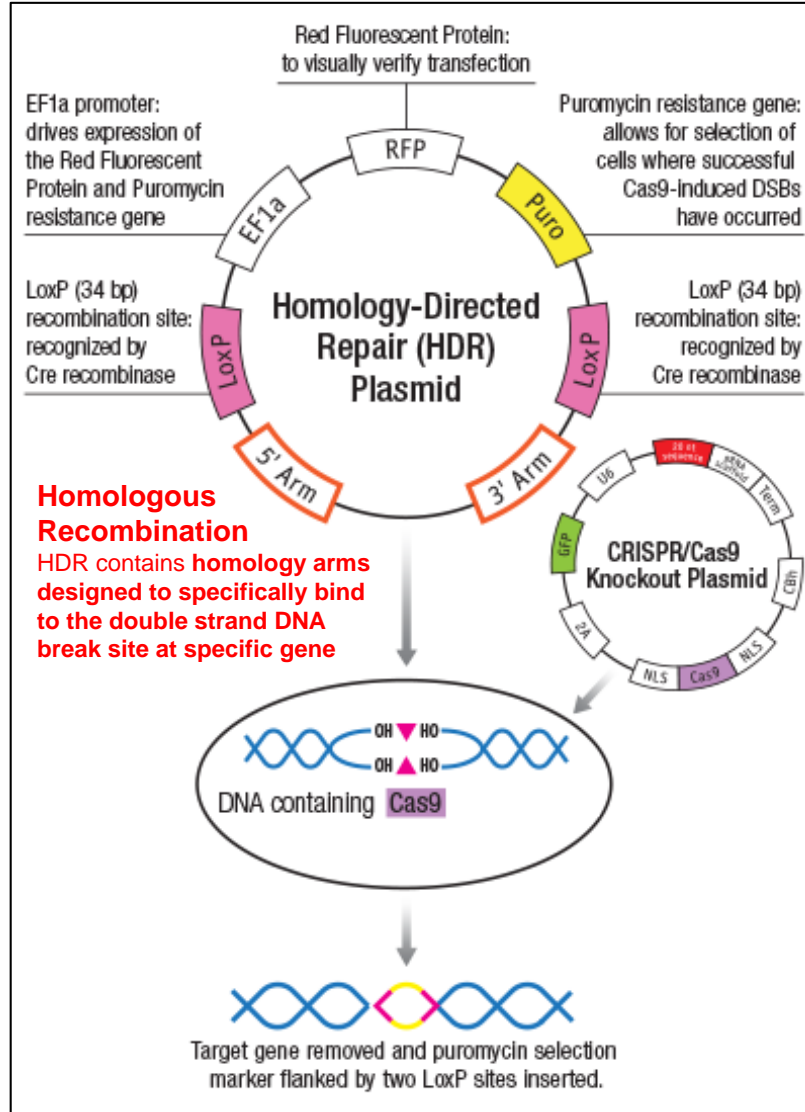


Gene editing by Homology-Directed Repair (HDR) - CRISPR/Cas9 plasmids – Cre/lox

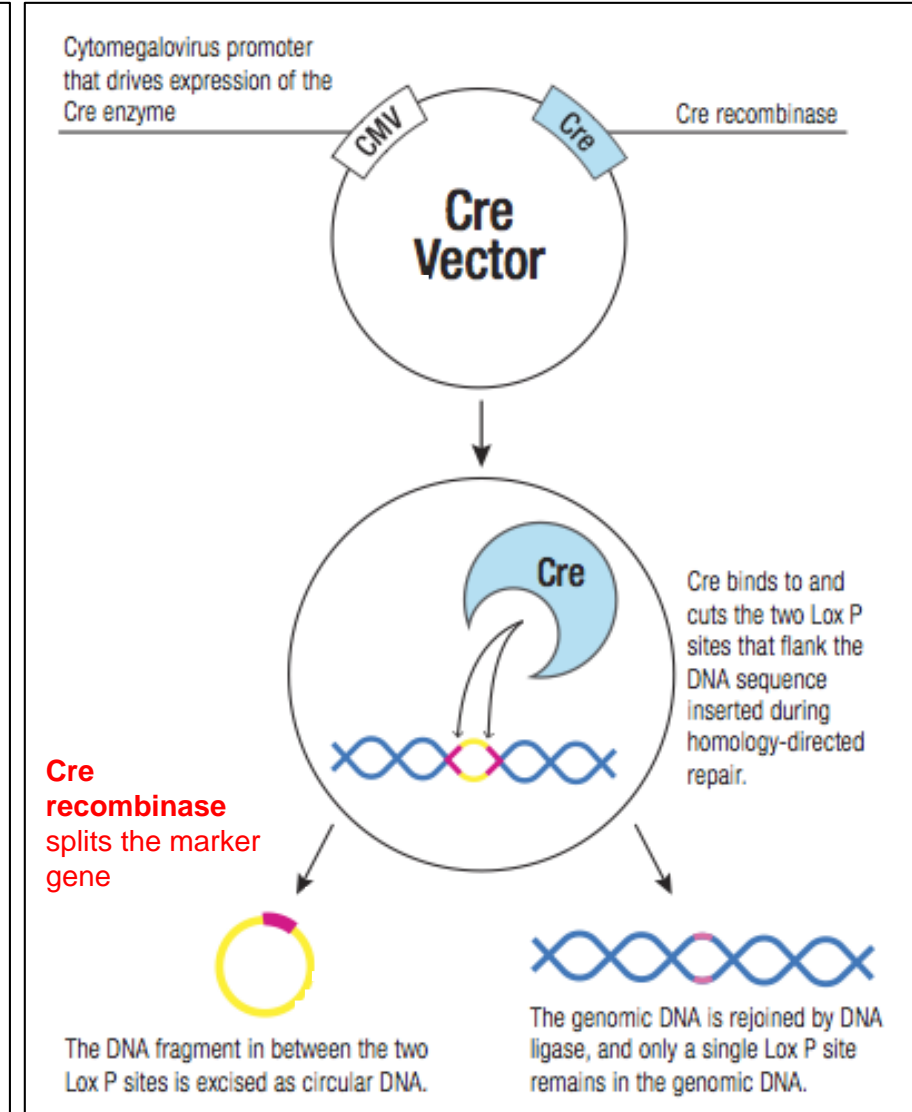
3 plasmidi in uno: CRISPR/Cas9



Correzione genica



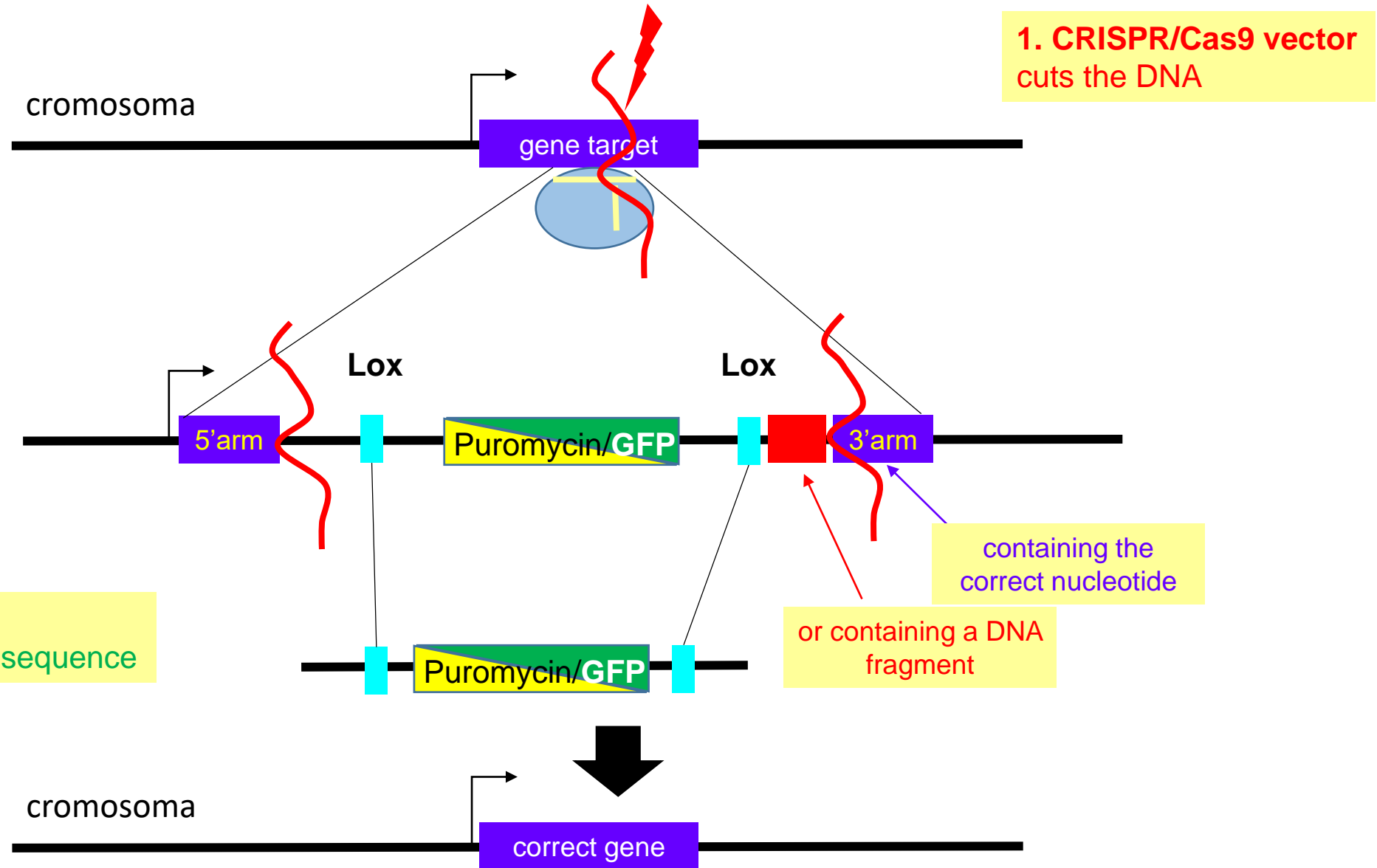
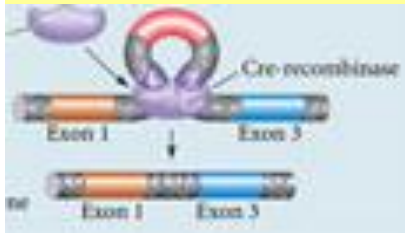
Cre Ricombinasi



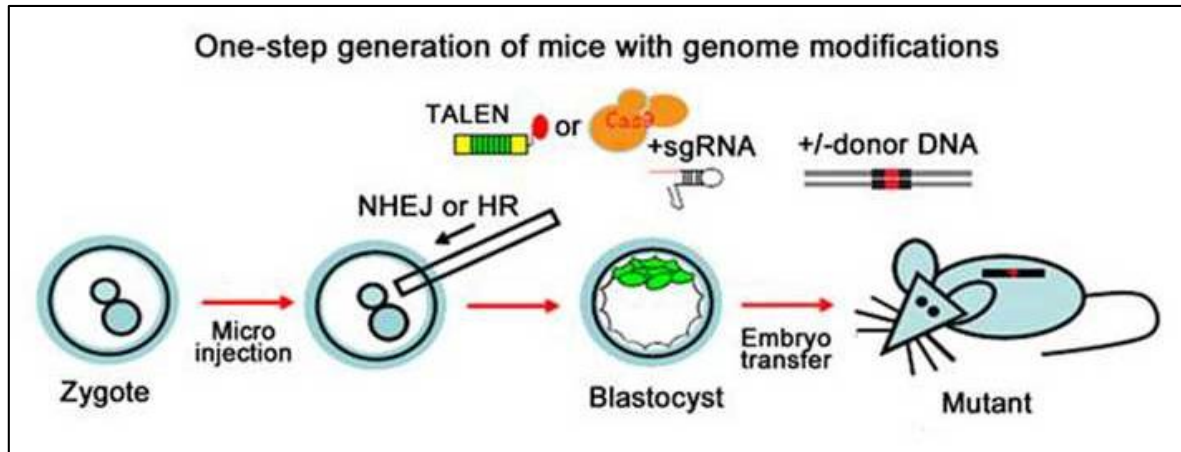
Gene editing by Homology-Directed Repair (HDR) - CRISPR/Cas9 plasmids – Cre/lox

2. Homologous recombination:
Homology Directed Repair plasmid to transfer marker gene and lox sequence

3. Cre/lox recombinase
to split marker gene and lox sequence



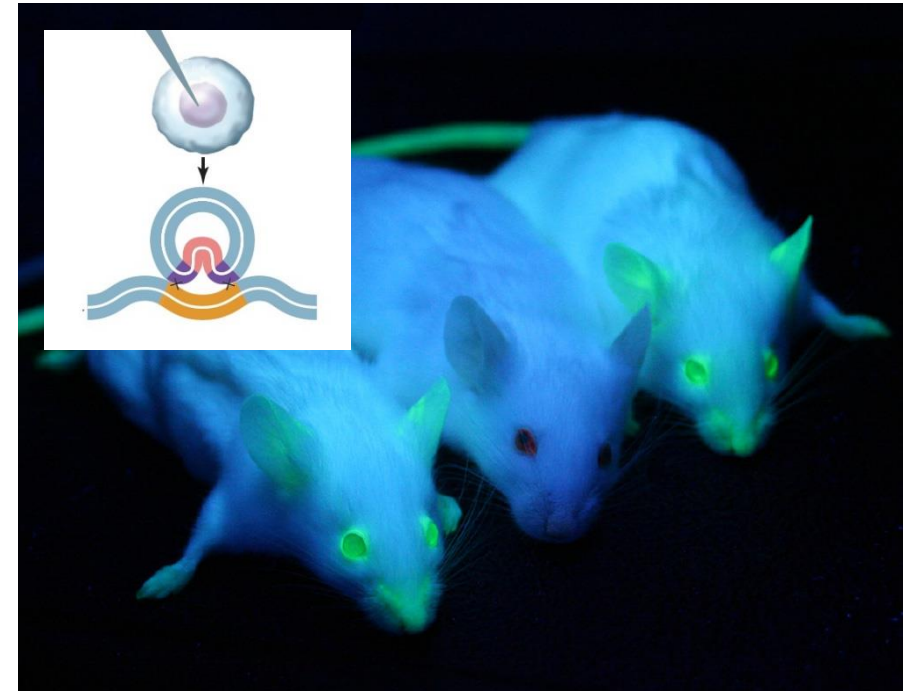
Genome editing: *knock in e knock out*



Con la tecnologia del genome editing è possibile:

- **inattivare un gene** specifico (*knock out*);
- oppure **introdurre un gene** esogeno all'interno di una cellula (*knock in*).

Queste tecniche trovano applicazione, oltre che negli studi su **cellule in coltura**, anche nella generazione di **animali transgenici**.



Le cellule dei topi possono essere rese fluorescenti ingegnerizzando il vettore per esprimere una particolare marcatore, come la proteina fluorescente chiamata GFP