



FISV – Federazione Italiana Scienze della Vita

c/o Dip.to di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin - Sapienza Università di Roma
Piazzale Aldo Moro, 5 - 00185 ROMA

Presidente: Gennaro Ciliberto - **Segretario Scientifico:** Giovanna Serino

presidente@fisv.org

segreteria@fisv.org

www.fisv.org

L'editing del genoma e il sistema CRISPR/Cas9

a cura del **Gruppo di Lavoro FISV "Nuove tecnologie e scienze della vita"**

Daniela **Barilà** - Anna **Cereseto** - Piero **Morandini** - Michele **Morgante**

Pietro **Pichierri** - Valeria **Poli** - Antonella **Russo** - Sergio **Tofanelli**

Cos'è l'editing del genoma?

Il genoma rappresenta il complesso del patrimonio genetico di ogni individuo, è contenuto principalmente nel nucleo di ogni cellula del nostro organismo, ed è costituito da sequenze di molecole dette nucleotidi o basi, vere e proprie lettere di un codice che interagiscono tra di loro formando una doppia elica.

Per editing del genoma si intende la possibilità di modificare o sostituire con grande precisione piccole parti della sequenza del DNA degli organismi viventi utilizzando diverse tecniche e senza spostarla dalla sua posizione naturale nel genoma. In pratica, gli scienziati utilizzano vere e proprie "forbici molecolari" per introdurre tagli nella sequenza del DNA e poi inserire, eliminare o sostituire porzioni di questa sequenza con altre. Gli scopi possono variare dalla pura ricerca (definire il ruolo di specifiche sequenze del DNA) alla cura di malattie, genetiche e non. Le tecniche di manipolazione del genoma vengono utilizzate da molti anni nei laboratori di ricerca, anche se solo recentemente sono balzate prepotentemente agli onori della cronaca.

Negli organismi più semplici, come i batteri ed i lieviti, la manipolazione del genoma viene praticata da numerosi decenni, mentre negli organismi superiori e nelle cellule dei mammiferi, come l'uomo, solo nell'ultimo ventennio si è diffusa grazie a nuovi sistemi e tecnologie.

Le più recenti tecnologie, che sono utilizzate anche nei processi di manipolazione del genoma delle cellule umane, sono tre: la nucleasi TALEN, la nucleasi a Zn-finger (o dita di zinco) e la nucleasi Cas9 (ovvero il sistema CRISPR, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat). In tutti questi sistemi, ad una proteina che ha funzione di nucleasi, ovvero è in grado di introdurre tagli nel DNA, viene associata una funzione di "selettore" molecolare capace di indicare alla nucleasi dove tagliare; quest'ultima funzione è alla base della capacità dei sistemi di manipolazione del genoma di introdurre i cambiamenti in una specifica sequenza. La riparazione del taglio si affida quindi ai sistemi di riparazione del DNA che ogni nostra cellula possiede e può portare, a seconda degli obiettivi e quindi della strategia adottata, all'introduzione di piccole mutazioni o alla sostituzione di una precisa sequenza con una sequenza differente scelta dall'operatore.

Come funziona CRISPR/Cas9?

Il sistema CRISPR/Cas9 sfrutta i meccanismi naturali, caratterizzati negli anni '90, con i quali i batteri si difendono dall'infezione di virus. L'enzima che è il fulcro del processo di editing genomico è chiamato Cas9 ed è una endonucleasi, ovvero una proteina in grado di introdurre tagli all'interno della doppia elica del DNA. Poiché la Cas9 si associa a delle corte sequenze di RNA che sono capaci di appaiarsi con il DNA da essere tagliato, il processo non è casuale ma viene indirizzato a posizioni specifiche. In laboratorio, la sequenza di RNA, chiamata "guida" o sgRNA, da associare a Cas9 viene deliberatamente scelta in maniera



FISV – Federazione Italiana Scienze della Vita

c/o Dip.to di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin - Sapienza Università di Roma
Piazzale Aldo Moro, 5 - 00185 ROMA

Presidente: Gennaro Ciliberto - **Segretario Scientifico:** Giovanna Serino

presidente@fisv.org

segreteria@fisv.org

www.fisv.org

tale da guidare l'enzima nel punto esatto dove si vuole effettuare l'editing genomico. In pratica, Cas9 può essere diretta verso una qualunque sequenza del DNA purché essa contenga alcune basi che servono da ancoraggio all'enzima e che definiscono una sequenza detta PAM (Protospacer Adjacent Motif). Mentre l'attività dell'enzima è sufficiente per introdurre in una posizione specifica mutazioni casuali, quando l'obiettivo sia l'inserimento di una mutazione mirata devono essere fornite alle cellule sequenze esogene di DNA donatrici adeguate ai cambiamenti che si vogliono effettuare. A questo punto, sfruttando un sistema di riparazione del DNA chiamato "ricombinazione omologa", la cellula provvederà ad autoriparare la rottura utilizzando il DNA esogeno, così completando l'editing. In questo modo, è possibile ottenere la correzione di mutazioni patologiche nel DNA o l'introduzione di varianti geniche che sono conosciute per essere importanti nella prevenzione di alcune malattie.

Quali sono i vantaggi di CRISPR/Cas9 rispetto alle altre tecnologie?

I sistemi di editing genomico ci consentono di introdurre modificazioni genetiche, ma, a differenza di tecnologie già esistenti, non comportano necessariamente l'introduzione di sequenze di DNA in nuove posizioni del genoma; in pratica si interviene direttamente sul gene già presente andando, a seconda dei casi, a introdurre mutazioni o casuali o mirate per ottenere gli effetti desiderati sfruttando i meccanismi naturali di riparazione dei danni del DNA.

Tutti i sistemi di editing genomico recenti sfruttano il medesimo meccanismo: guidare un enzima che taglia la doppia elica del DNA in un sito specifico del genoma, e quindi fornire eventualmente alla cellula la sequenza donatrice per riparare il danno ed effettuare la correzione della sequenza. Il sistema CRISPR/Cas9 è però molto più facile da applicare perché richiede solamente di identificare la sequenza dove tagliare e di fornire la guida di RNA all'enzima Cas9. Quindi, la sola variabile è un piccolo frammento di RNA. Negli altri due sistemi (TALEN e Zn-finger) occorre ingegnerizzare in laboratorio intere proteine, senza contare che l'efficienza di editing risulta essere inferiore.

Inoltre, il sistema CRISPR/Cas9 è estremamente flessibile. Per esempio, studi di ricerca di base hanno dimostrato come la capacità di Cas9 di trovare il suo bersaglio attraverso l'RNA guida possa essere abbinata con la capacità di alcuni enzimi di modificare direttamente una singola base in un'altra, ed in tal modo si possa quindi correggere efficientemente il difetto all'origine di quelle malattie genetiche causate dalla mutazione di una singola base. In questo caso, l'utilizzo di una variante di Cas9 che è incapace di tagliare, abbinato al secondo enzima "correttore" diminuisce drasticamente il rischio di introdurre errori quali quelli che saranno descritti nel punto successivo.

Quali sono le limitazioni del sistema CRISPR/Cas9?

Il problema maggiore da affrontare, in particolare nelle applicazioni agli esseri umani, è la possibilità che Cas9 riconosca sequenze diverse da quella bersaglio e quindi introduca dei cambiamenti non voluti né predetti. Infatti, il frammento di RNA che guida Cas9 ammette alcuni appaiamenti scorretti, rendendo Cas9 in grado di tagliare anche regioni del DNA diverse dal bersaglio. Questa possibilità è oggetto di intensa ricerca, e può attualmente essere molto ridotta identificando degli RNA guida molto selettivi e/o sfruttando Cas9 alternative o modificate che permettano una maggiore specificità, come quella messa a punto dal gruppo italiano del CIBIO di Trento guidato da Anna Cereseto .



FISV – Federazione Italiana Scienze della Vita

c/o Dip.to di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin - Sapienza Università di Roma
Piazzale Aldo Moro, 5 - 00185 ROMA

Presidente: Gennaro Ciliberto - **Segretario Scientifico:** Giovanna Serino

presidente@fisv.org

segreteria@fisv.org

www.fisv.org

Esiste poi anche la possibilità che il taglio introdotto da Cas9 venga riparato in maniera scorretta risultando non nella correzione di un difetto genetico, ma nell'introduzione di nuove mutazioni. Nonostante questa sia un'eventualità rara, deve naturalmente essere presa in considerazione. Questo problema può essere superato, per le molte malattie genetiche associate a specifiche mutazioni che determinano la sostituzione di una sola base nella sequenza del DNA, dall'utilizzo di forme di Cas9 modificate (vedi sopra) che permettono di sostituire chirurgicamente singole basi senza bisogno di tagliare il DNA. L'utilizzo di questo nuovo approccio CRISPR, tra le altre cose, permette la correzione efficiente dei difetti genetici anche in cellule che non proliferano più, come quelle che compongono i tessuti ormai differenziati (neuroni ad esempio) e nelle quali si ritiene che la ricombinazione omologa non sia un processo attivo.

Come possiamo trarre beneficio dall'utilizzo di CRISPR/Cas9 per lo studio e la cura di malattie?

Il sistema CRISPR è già da ora, senza pensare ad applicazioni cliniche su pazienti, molto utile allo studio ed alla cura delle malattie. Infatti, grazie all'uso in laboratorio di CRISPR/Cas9 e dell'editing genomico, si possono creare dei sistemi cellulari che mimino alcune patologie, al fine di identificare con più accuratezza nuove terapie. Tutto questo in maniera molto più rapida del passato e su larga scala. Ovviamente, se pensiamo alla clinica, CRISPR/Cas9 rappresenta la via migliore per effettuare terapia genica, che si pone l'obiettivo di curare una malattia tramite sequenze di DNA.

Occorre ricordare che tecniche di terapia genica sono già state messe a punto per alcune sindromi umane ed hanno anche avuto approvazione terapeutica, come per esempio quella per risolvere la malattia dei bambini bolla (l'ADA-SCID), e sono in via di sviluppo per molte altre malattie. Quindi, approcci di modificazione genetica non sono nuovi, in particolare se utilizzati per correggere difetti genici in cellule somatiche, cioè in quelle cellule che non sono preposte alla riproduzione. In linea di principio, CRISPR/Cas9 rappresenta un approccio più avanzato di terapia genica, in quanto permette di modificare il genoma di una cellula "curando" la sequenza di DNA "malata" ma senza inserire altre alterazioni o sequenze estranee. In particolare quest'ultimo rappresenta un limite degli approcci di terapia genica attualmente utilizzati, pur con eccellenti risultati. Infatti questi si basano sull'introduzione di DNA estraneo in regioni casuali del genoma, il che crea un rischio, seppur minimo, di comprometterne le funzioni. Approcci di terapia genica tramite CRISPR/Cas9 hanno invece il potenziale di modificare selettivamente e precisamente il DNA realizzando così una vera e propria chirurgia molecolare, anche a livello di cellule germinali o embrionali.

Quali sono gli utilizzi di CRISPR/Cas9 in altri ambiti?

Il genome editing promette di avere un enorme impatto sul miglioramento genetico vegetale, grazie al fatto che può essere usato per indurre l'insorgenza di mutazioni nel DNA, del tutto analoghe a quelle spontanee o ottenute attraverso i metodi di mutagenesi chimica e fisica 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. Inoltre, oltre a evitare mutazioni indesiderate, l'editing può consentire di preservare intatta la varietà di partenza non dovendo ricorrere all'incrocio. Questo aspetto del mantenere inalterate le varietà esistenti eccetto che per la caratteristica oggetto della modificazione genetica è un aspetto fondamentale per un'agricoltura come quella italiana che si fa forte di un patrimonio varietale molto ricco e di grande valore commerciale. L'utilizzo dell'editing nel miglioramento genetico è attualmente limitato da due principali ordini di considerazioni. Il primo è rappresentato dal fatto che



FISV – Federazione Italiana Scienze della Vita

c/o Dip.to di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin - Sapienza Università di Roma
Piazzale Aldo Moro, 5 - 00185 ROMA

Presidente: Gennaro Ciliberto - **Segretario Scientifico:** Giovanna Serino

presidente@fisv.org

segreteria@fisv.org

www.fisv.org

dobbiamo conoscere i geni che devono essere oggetto della modificazione tramite editing e quindi dobbiamo conoscere i geni che controllano le caratteristiche agronomiche che si vogliono migliorare per poterle modificare in maniera precisa. Il secondo riguarda l'incertezza normativa oggi esistente nell'Unione Europea in quanto non è ancora stato chiarito se per l'editing del genoma, quando questo porti a generare modificazioni identiche a quelle ottenute spontaneamente o attraverso mutagenesi, si debba applicare la normativa esistente per questo tipo di modificazioni in virtù dell'identità del prodotto o se si debba invece applicare la normativa esistente per le piante OGM in virtù del fatto che sono state comunque ottenute attraverso un processo che richiede l'uso dell'ingegneria genetica in alcune fasi. E' chiaro che una eventuale decisione da parte della Commissione Europea nel senso di una estensione della normativa già esistente per gli OGM anche ai prodotti dell'editing avrebbe pesanti conseguenze sulla applicabilità di tale tecnologia nel campo del miglioramento genetico vegetale. La comunità scientifica si è schierata chiaramente in favore di una regolamentazione che guardi al prodotto della modificazione genetica più che al processo che ha portato ad ottenerla.

Interessanti applicazioni sono in vista per l'editing anche nel miglioramento genetico animale dove il suo utilizzo permette di accorciare i tempi della selezione di nuove razze, legati al ciclo vitale lungo di molte delle specie, e di intervenire andando a migliorare per caratteristiche specifiche razze già esistenti. Al momento le principali applicazioni sembrano essere quelle per l'introduzione di resistenze a malattie di origine virale attraverso la modificazione mirata di geni dell'animale oppure per trasferire rapidamente caratteri desiderabili come l'assenza delle corna nelle vacche al fine di evitare pratiche dolorose per gli animali e costose come la decornazione.

Il sistema CRISPR/Cas9 può poi essere utilizzato anche per generare fenomeni di cosiddetto gene drive, un meccanismo che tende a favorire la trasmissione di una delle due forme alleliche che un organismo animale o vegetale possiede per ciascun gene. In sostanza, se il gene drive è in atto, in poche generazioni una popolazione può diventare estremamente omogenea per la variante genetica che risulta favorita. Sperimentalmente perciò, è possibile sfruttare il gene drive per attuare strategie efficienti e precise che consentano ad esempio di alterare la nocività degli insetti responsabili della trasmissione di malattie (per es. la malaria), o eliminare del tutto alcuni parassiti pericolosi di altre specie.

Dobbiamo avere paura delle tecniche di editing genomico?

Le tecniche di editing genomico permettono applicazioni di una semplicità, precisione e rapidità prima impensate agli esseri umani, agli animali allevati, alle piante coltivate e alle popolazioni di insetti e parassiti. Questo impone delle serie riflessioni sui rischi, e quindi sui controlli necessari. La frequenza di modificazioni non desiderate associate ad un approccio di gene editing con il sistema CRISPR/Cas9 rappresenta la prima preoccupazione, e fino a che non siano stati perfezionati approcci per minimizzare o annullare questi effetti il sistema non potrà essere applicato con sicurezza a scopo terapeutico alla linea germinale degli esseri umani. Nelle piante coltivate il problema delle mutazioni non desiderate non sembra altrettanto rilevante in quanto da un lato sembra che la frequenza di modificazioni indesiderate sia decisamente molto più bassa che nei sistemi animali, e dall'altro la frequenza con cui tali mutazioni possono insorgere è enormemente minore di quella con cui si ottengono mutazioni indesiderate con i sistemi di mutagenesi che fino ad ora sono stati largamente usati nel miglioramento genetico vegetale.



FISV – Federazione Italiana Scienze della Vita

c/o Dip.to di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin - Sapienza Università di Roma
Piazzale Aldo Moro, 5 - 00185 ROMA

Presidente: Gennaro Ciliberto - **Segretario Scientifico:** Giovanna Serino

presidente@fisv.org

segreteria@fisv.org

www.fisv.org

Per quanto riguarda le applicazioni agli esseri umani, quando anche la tecnica sia stata resa sicura dal punto di vista di mutazioni impreviste, rimangono gli interrogativi etici della sua applicazione alla linea germinale, ovvero alle cellule destinate alla riproduzione. Senza trascurare la possibilità preoccupante di derive pericolose verso i cosiddetti “designer babies”, bambini “sculptati” geneticamente per avere determinate caratteristiche considerate desiderabili, ovviamente da contrastare legislativamente con regole precise, deve destare preoccupazione anche il tipo di malattia a cui si potrebbe pensare di applicare questa tecnologia. Se per esempio è difficile trovare obiezioni alla sua applicazione per curare una malattia pericolosa per la vita e altrimenti inguaribile, come per esempio il cancro, cosa si dovrebbe fare a riguardo di malattie croniche come l’obesità, per citarne una? Dove è lecito tracciare una linea di confine? Tutte queste domande sottolineano come sia necessario che scienziati, medici, legislatori e esperti di bioetica diano luogo a dei tavoli di lavoro atti a definire le regole entro le quali questa tecnologia possa muoversi. La percezione generale è che, come per tutte le tecnologie prima di queste, CRISPR/Cas9 sia qui per restare. Non bisogna averne paura, ma conoscerla per regolamentarla diventa un imperativo per la nostra società.

Glossario:

Terapia genica: insieme di procedimenti atti a curare o ad alleviare una malattia modificando geneticamente le cellule dei pazienti

Nucleasi: enzima in grado di tagliare gli acidi nucleici, ovvero il DNA (DNasi) oppure l’RNA (Rnasi).

Ricombinazione omologa: scambio di informazione genetica fra molecole omologhe di DNA.