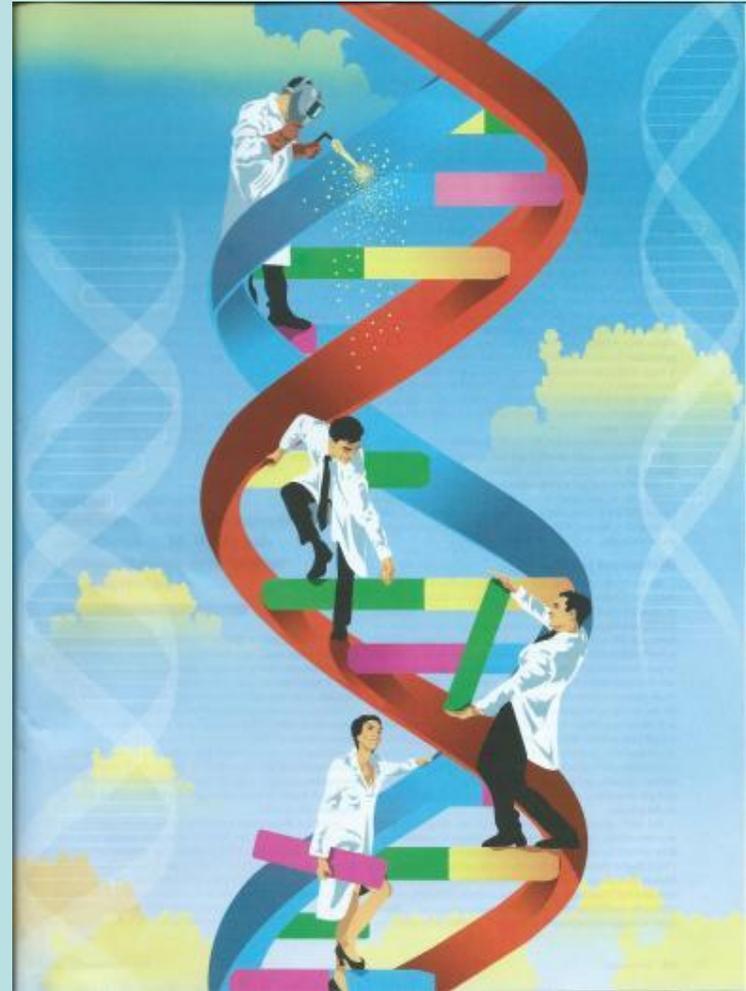


Genetica

Cosa c'è di nuovo in genetica?

Rita Dougan 2020



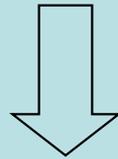
"Prime editing"

E' una variante più versatile e precisa della CRISPR
Andrew Anzalone e David Liu del Broad Institute di Boston:



Cosa è l'ingegneria genetica?

E' l'insieme delle tecniche che servono
per manipolare il DNA



Correggere o cambiare le informazioni
contenute nel DNA

Tecnologia del DNA ricombinante

Anni '70

Insieme di tecniche che permettono di isolare geni, clonarli, ed introdurli in un ospite differente

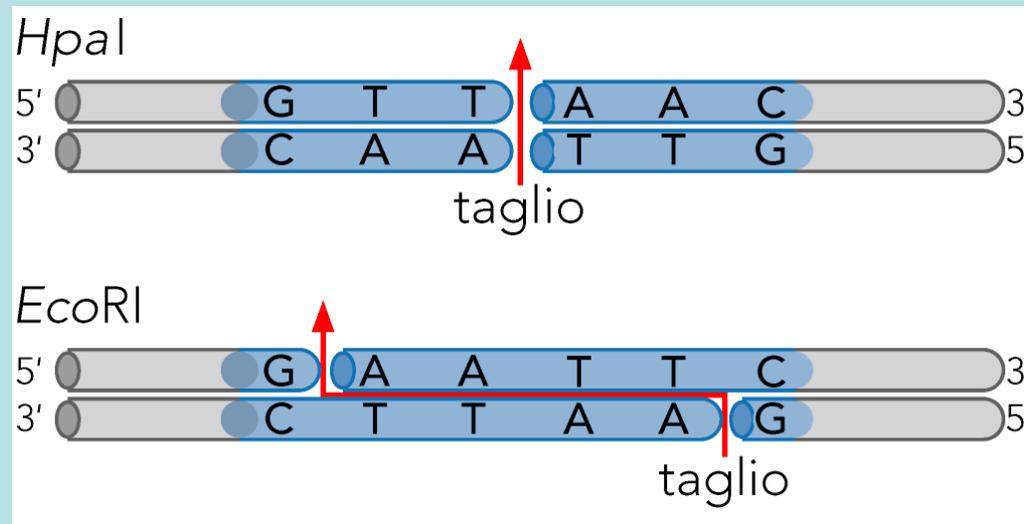
Le cellule così prodotte sono chiamate ricombinanti.

Tagliare il DNA

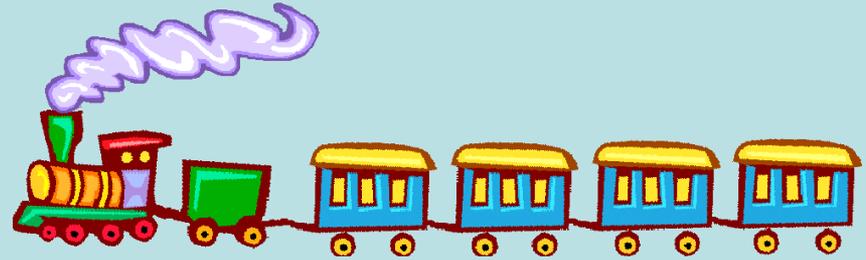


Enzima di restrizione:

taglia la doppia elica di DNA in punti specifici, dove trova sequenze palindrome



Far entrare il nuovo DNA nella cellula



Plasmidi: sono piccoli anelli di DNA presenti nei batteri, possono passare da un batterio all'altro (coniugazione), trasportando così nuove informazioni

Virus modificati

Incollare i pezzi di DNA



Enzima chiamato DNA ligasi:

“incolla” tratti di DNA riconoscendo le sequenze di basi complementari

Editing genetico

2012

E' la riscrittura del DNA con la
tecnica Crispr-Cas9
che permette

- sia di distruggere un gene responsabile di malattia,
- sia di sostituire un gene malato con un gene sano
- si propone per la cura non solo di malattie genetiche, ma anche di tumori.

Editing classico

2012

Cas9: Jennifer Doudna ed Emmanuelle Charpentier

- usa una molecola di RNA per guidare Cas9 verso la sequenza genomica da modificare
- recide entrambe le eliche del DNA
- consente ai ricercatori di inattivare il gene preso di mira sfruttando i meccanismi di riparazione del DNA

CRISPR

Clustered **R**egularly **I**nterspaces **S**hort
Palindromic **R**epeats

Cas9 (enzima)

CRISPR **a**ssociated **p**rotein **9**

Pro e contro

E' un metodo poco costoso

Può agganciarsi a un frammento di DNA simile, ma non proprio uguale a quello del gene-bersaglio: basta che ci siano pochi nucleotidi (cioè le unità che compongono il genoma) diversi e l'RNA si confonde.

Nel frattempo l'enzima Cas9 entra in azione e taglia il DNA anche in punti non voluti

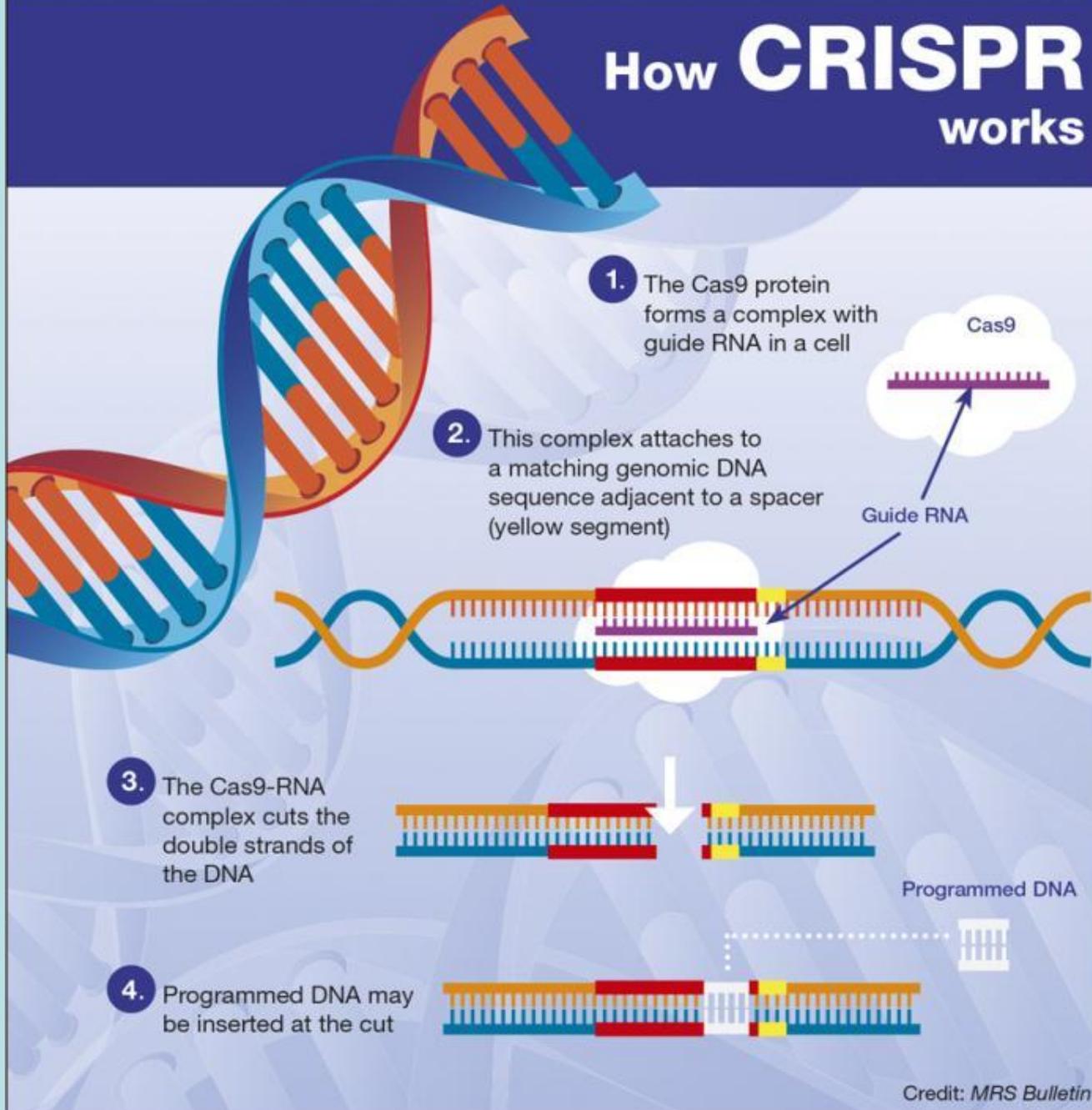
CRISPR

Clustered Regularly Interspaces Short Palindromic Repeats

Tecnica CRISPR (piccolo RNA) + Cas9 (enzima)



How CRISPR works



Novità della settimana

- Nasce l'arma che curerà il DNA
(Il Piccolo - 31/1/2018)

Nasce l'arma che curerà il DNA

Una nuova "macchina molecolare" che permette di modificare la sequenza del DNA

La ricerca è stata svolta integralmente al Cibio

Centro di Biologia integrata dell'Università di Trento

Brevettata e pubblicata sulla rivista Nature Biotechnology

Il "correttore" perfetto del DNA

- La scoperta dei ricercatori trentini sta, invece, nel fatto di avere "costruito" un Cas9, chiamato **evo-Cas9**, capace di entrare in azione, cioè di tagliare il frammento di DNA (cioè il gene) soltanto quando l'RNA lo identifica con una precisione assoluta.
- «In questo momento la nostra **evoCas9** è la macchina molecolare migliore al mondo per il genome editing» - professoressa Anna Cereseto

Base editing

Modello sviluppato da Liu a partire dal 2016:

- l'enzima Cas9 è ancora presente
- resta programmabile attraverso la molecola guida di RNA
- ma è stato privato delle forbici
- fuso con un altro componente che converte chimicamente le lettere del DNA

Vantaggi e svantaggi

VANTAGGI

maggior sicurezza
maggior precisione

SVANTAGGI

è in grado di compiere solo
4 conversioni di basi su 12

Prime editing

21 ottobre 2019

La parola "prime" sta per "avvio"

- Il **prime editing** potrebbe correggere l'89 % delle mutazioni che causano malattie genetiche nell'uomo.

Prime editing

- L'ingrediente chiave è lo stesso degli altri sistemi CRISPR, ovvero l'enzima Cas9,
- ha il pregio di scorrere fino a posizionarsi nel punto prescelto del genoma.

Prime editing in funzione

Nel prime editing si usa un **RNA** detto **peg** (da prime editing guide) che indica:

- il sito prescelto sul genoma
- suggerisce quali errori correggere.

Quindi il sistema è doppiamente programmabile.

Prime editing in funzione

- l'enzima Cas9, ha le forbici disattivate come nel base editing, ma è fuso con un enzima capace di trascrivere l'RNA in DNA
- la trascrittasi inversa legge il copione fornito dal pegRNA e lo ricopia lettera per lettera nel punto in cui si posiziona il cursore, senza bisogno di stampi aggiuntivi

pegRNA

La parte del pegRNA che specifica la sequenza può essere progettata a piacimento, allo scopo di ottenere:

- mutazioni puntiformi,
- delezioni su misura,
- inserzioni su misura ,
- tutte queste cose combinate insieme.

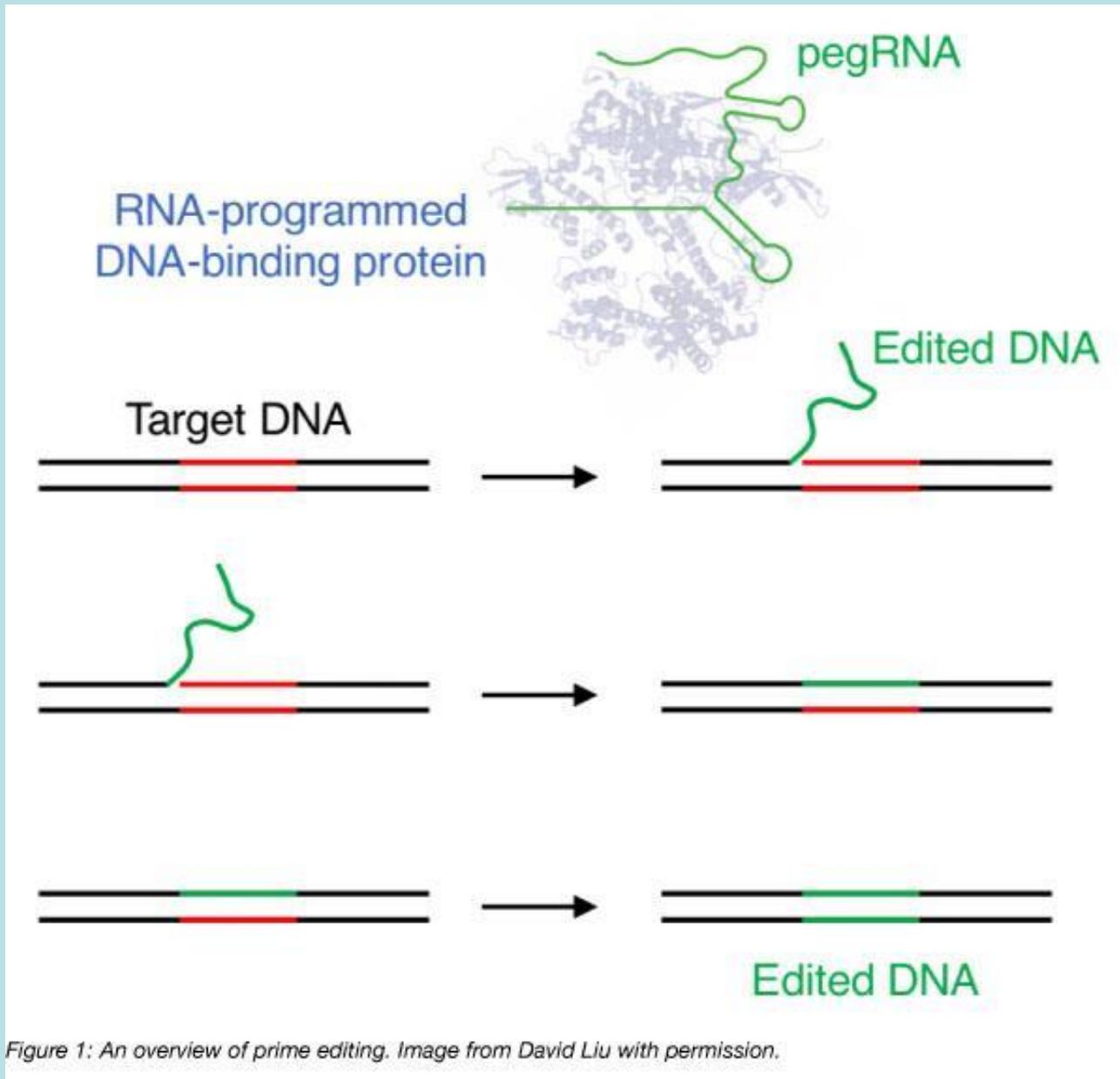
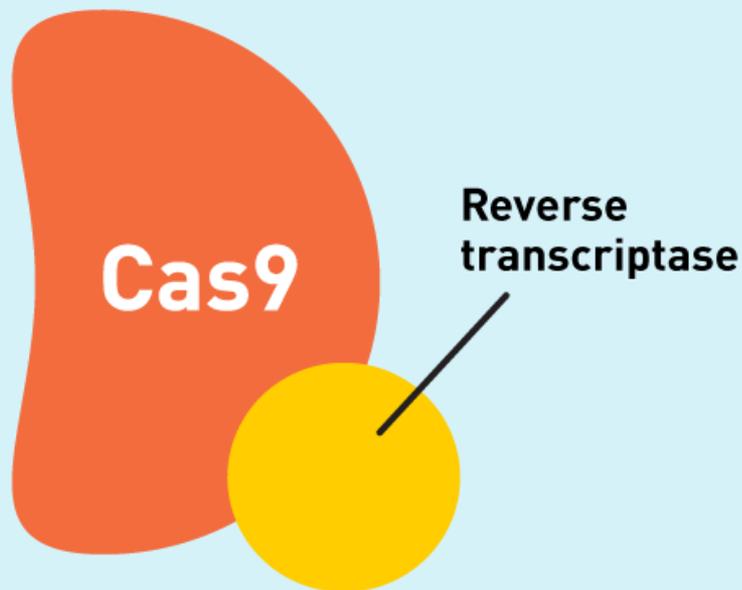


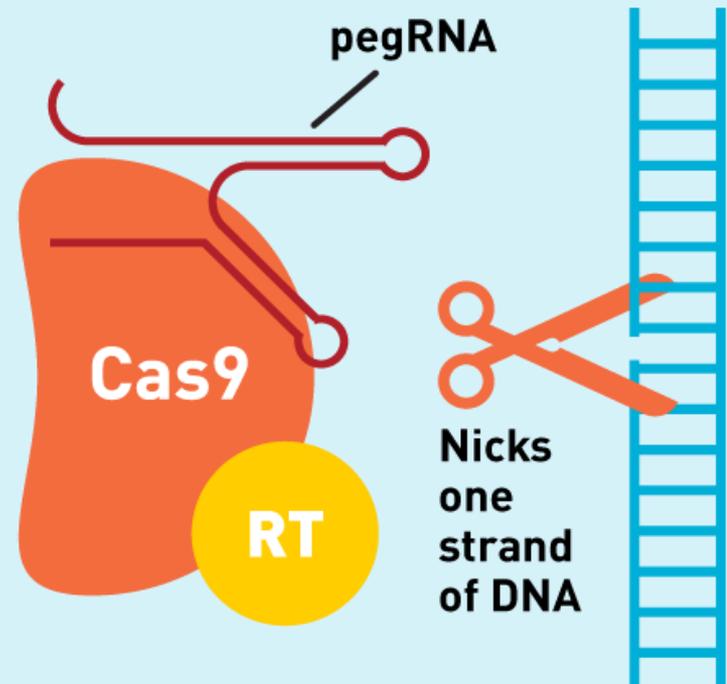
Figure 1: An overview of prime editing. Image from David Liu with permission.

Search-and-replace genome editing

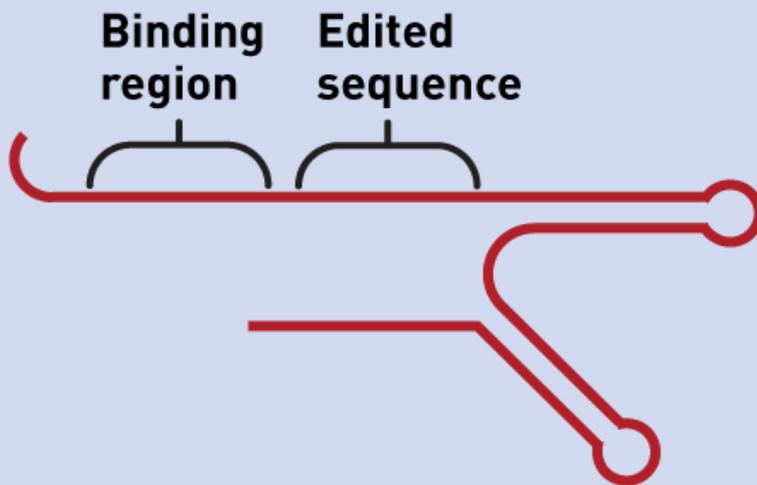
The prime editor complex includes a **Cas9 enzyme**, modified to only nick one strand of DNA, and a **reverse transcriptase enzyme**, which can generate new DNA by copying an RNA template.



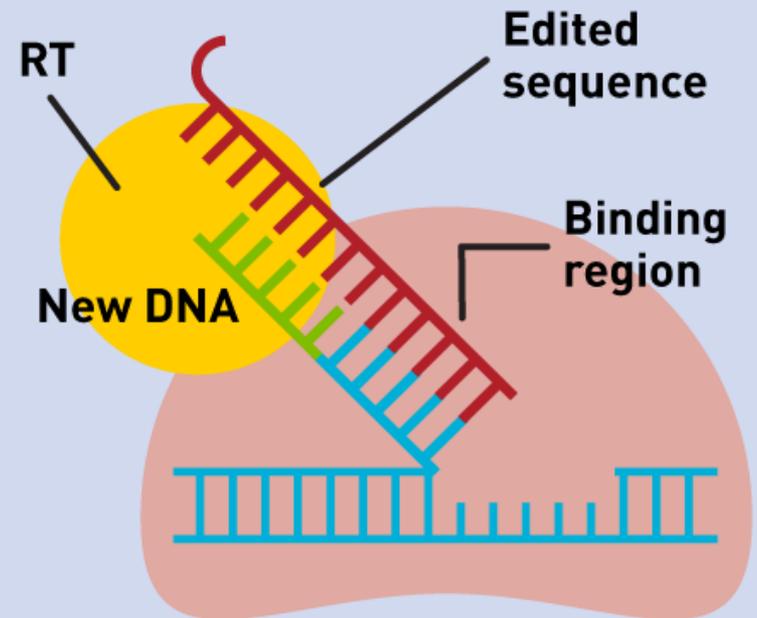
An **engineered “pegRNA”** (prime editing guide RNA) sends the editor to its target, where **Cas9 nicks the DNA**.



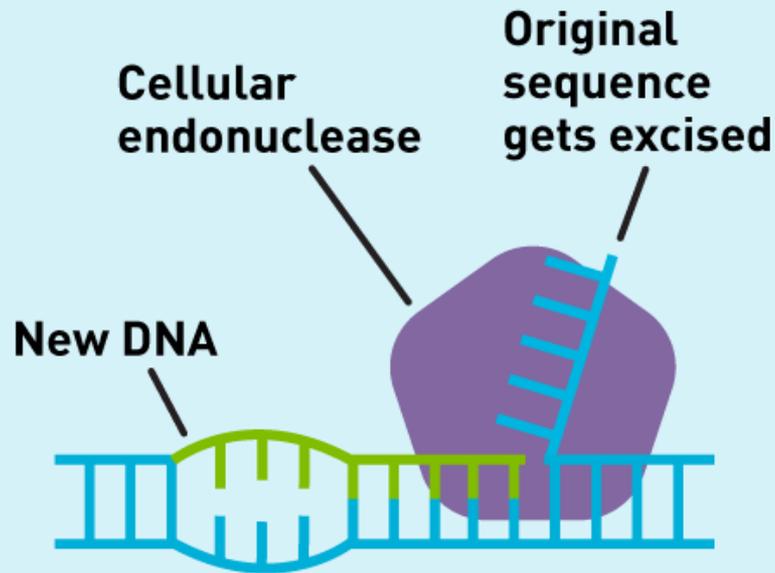
The **pegRNA** has two special components: **a section that binds to the nicked DNA**, preparing the nicked strand to have new DNA letters added, and a **section of RNA letters** that encode the desired edit.



To transfer the edited sequence from the pegRNA to the target DNA, the **reverse transcriptase** reads the **RNA** and attaches the corresponding DNA letters to the end of the **nicked DNA**.



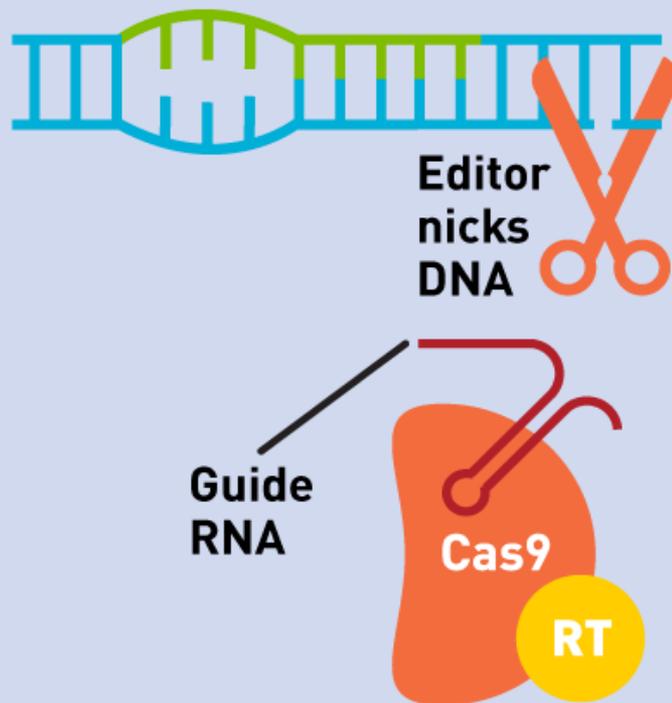
An **endonuclease** in the cell naturally excises the **old segment** of DNA and seals the **new letters** into the genome.



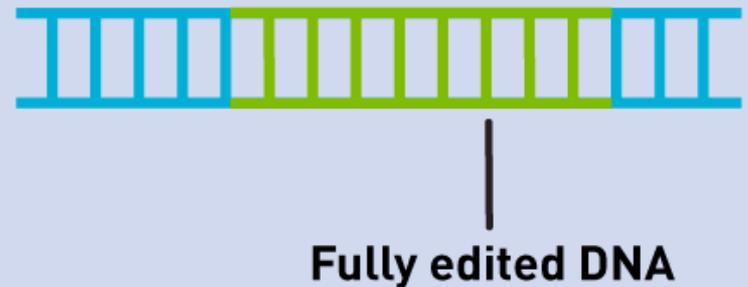
Now, the target site is left with **one edited strand** and **one unedited strand**.



To resolve the mismatch, favoring the permanent installation of the edited DNA, a **different guide RNA** directs the **prime editor** to nick the unedited strand.



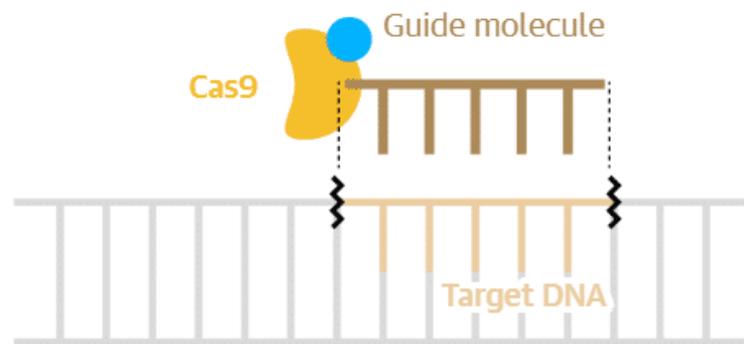
This nick prompts the cell to remake that nicked strand, using the **edited strand** as a template, thus completing the edit.



Prime editing, a new DNA editing tool, can mend most mutations that cause human disease

1

The prime editor contains an engineered protein that guides it to its target. On arrival, the editor uses an enzyme called **cas9** to nick one strand of the DNA



2

The prime editor then churns out **fresh DNA** to be inserted at the site



3

Another guide protein then directs the prime editor to nick the unedited DNA strand



4

The cell repairs the nick by copying the edited strand, completing the edit

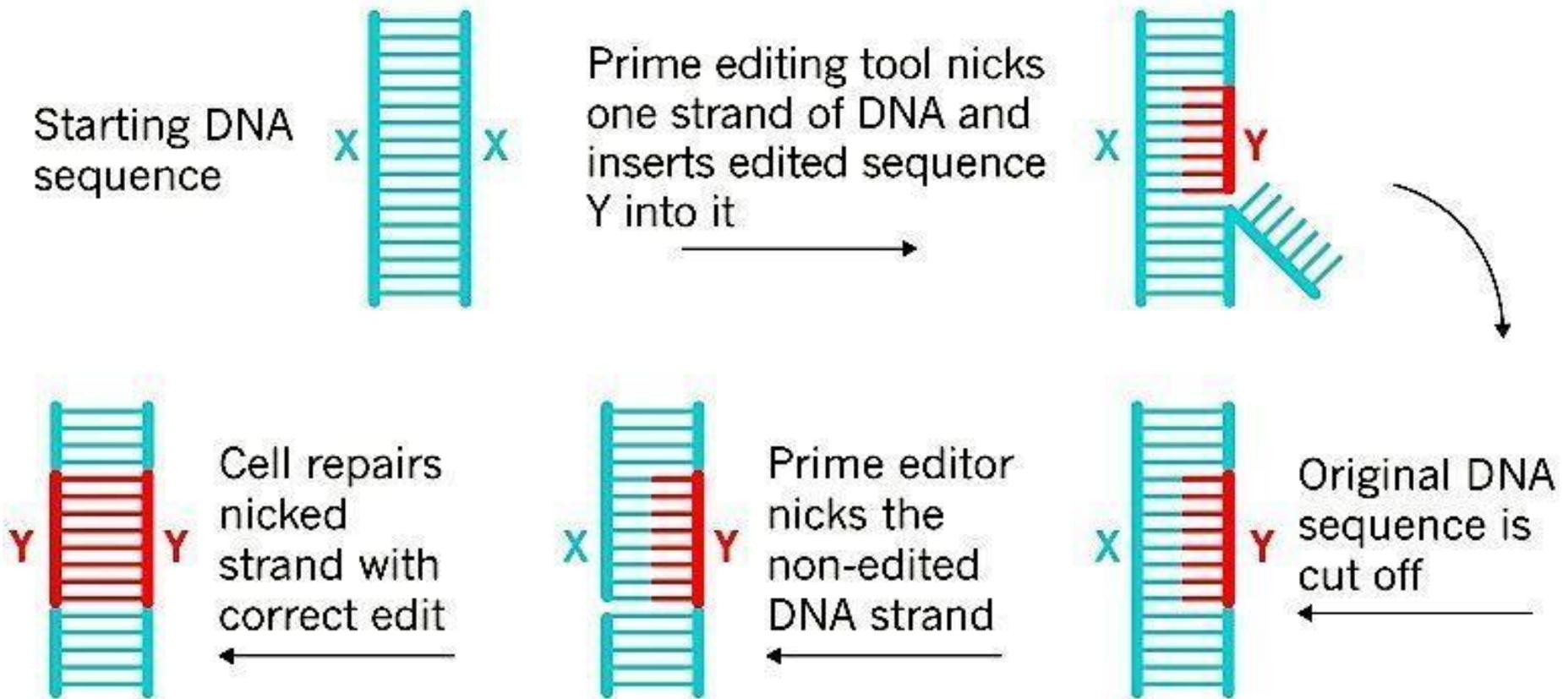


Guardian graphic. Source: Nature

Prime editing can 'nick' and replace sections of mutated DNA strands

PRECISION EDITOR

Prime editing reduces the number of unintended changes to a genome by inserting the edits researchers want to make into the DNA itself. This contrasts with CRISPR-Cas9, which relies on the cell's repair system to make the changes.



Esempi in vitro

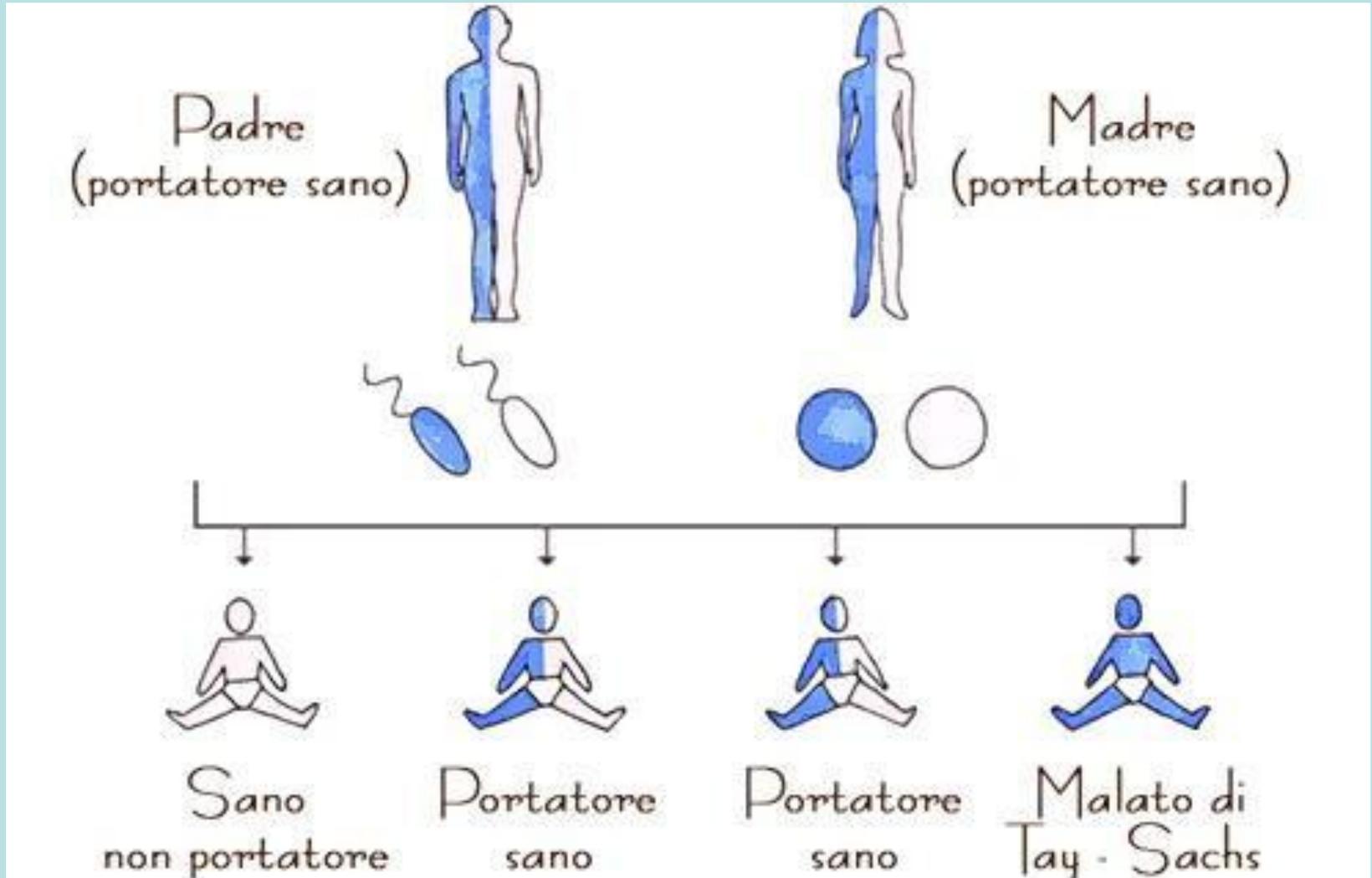
- Anemia falciforme: una mutazione trasforma una specifica A in una T
- Malattia di Tay-Sachs, una condizione nervosa rara e fatale, è spesso causata dall'aggiunta di quattro lettere extra di codice

Anzalone, Liu e colleghi hanno riparato le mutazioni:

dell'anemia falciforme, efficienza del 55%

della malattia di Tay Sachs efficienza del 35%

Malattia ereditaria autosomica recessiva



Futuri sviluppi

Bisognerà ottimizzare il **prime editing** per il maggior numero possibile di specie e linee cellulari, oltre a individuare i vettori più adatti per trasportare i prime-editor dentro le cellule (Liu e colleghi finora hanno usato con successo transfezione e lentivirus)

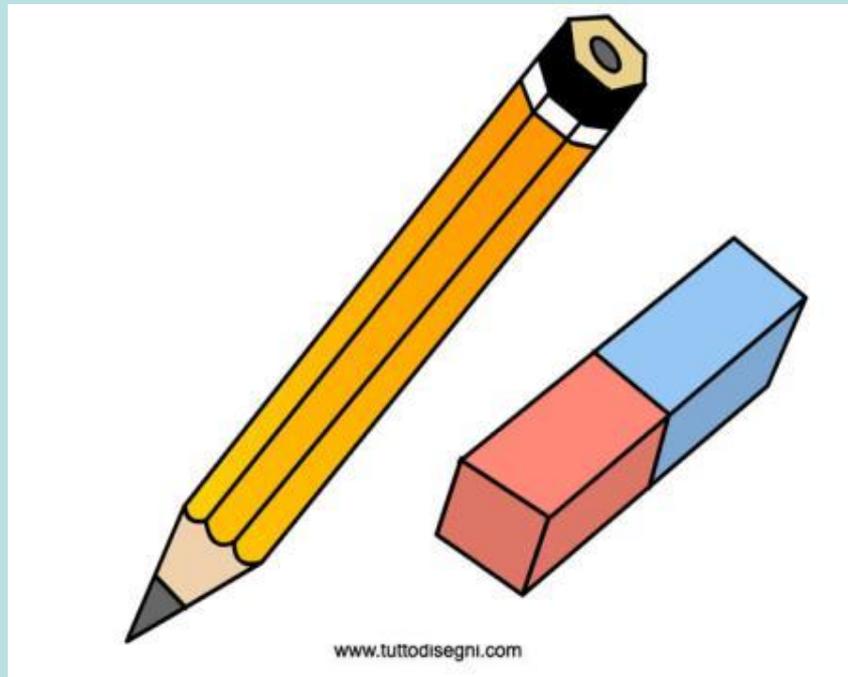
Editing classico

Forbici che tagliano il DNA



Base editing

Paragonato alla correzione manuale di un testo, fatta con gomma e matita.



Prime editing

Programma di videoscrittura (Es.Word)



Il futuro

- È probabile che in futuro ognuna delle tre vie all'editing troverà impieghi utili, perché ogni strumento ha i suoi punti forti e i suoi punti deboli. Ma i prime-editor sembrano destinati a primeggiare nelle applicazioni terapeutiche perché, come spiega Liu, "offrono una maggiore flessibilità nella scelta dei bersagli e maggiore precisione nell'editing"

Biodiesel

6 luglio 2017

Craig Venter Synthetic Genomics

- La micro-alga "Nannochloropsis gaditana" modificata produce una gran quantità di doppia di grassi facilmente convertibili in biodiesel.

Topi di Beethoven

21 dicembre 2017

Broad Institute guidato dal chimico David Liu

- Fermato il processo degenerativo, causato da un difetto genetico, che inizia nell'infanzia e rende sordi entro pochi anni.
- Il risultato è stato ottenuto su topi modificati per essere usati come modello per lo studio della sordità genetica e si spera che possa essere sperimentato presto anche su esseri umani

Bistecche editate?

11 aprile 2018

Quando arriveranno le bistecche editate?

- Maiali resistenti alla peste suina,
- polli immuni all'influenza aviaria
- mucche adattate alle regioni tropicali.

Minicervelli di Neanderthal

26 giugno 2018

- Combinando gli approcci di paleogenomica, organoidi ed editing genomico, alcuni gruppi di ricerca stanno producendo minicervelli umani "neanderthalizzati" con l'obiettivo di mettere a fuoco le differenze biologiche rispetto all'organizzazione cerebrale tipica della nostra specie

Regole e Leggi

26 luglio 2018

- Una sentenza della Corte Europea ha stabilito che le piante modificate con CRISPR/Cas9 devono essere considerate come OGM e regolamentate di conseguenza.
- Le argomentazioni della Corte però sono in netto contrasto con i pareri espressi dalla comunità scientifica

Distrofia di Duchenne

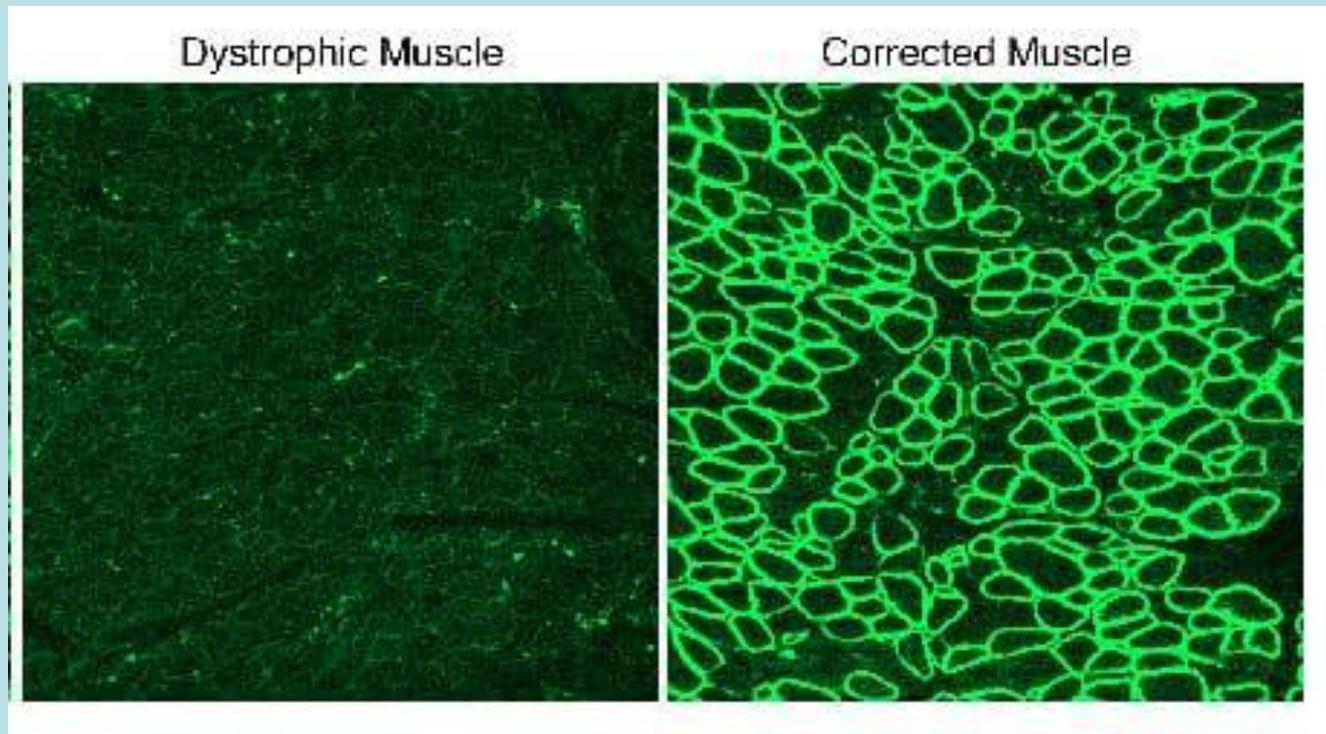
31 agosto 2018

Gruppo di Eric N. Olson dell'UT Southwestern
Medical Center di Dallas

- Dopo il successo ottenuto su topi di laboratorio, i ricercatori sono ora riusciti a correggere la mutazione responsabile della distrofia di Duchenne in alcuni cani.
- La sperimentazione, che rappresenta un importante passo avanti nella lotta contro questa malattia fatale e attualmente senza cura, ha ottenuto un recupero fino al 90 per cento dei normali livelli di distrofina

Nelle immagini, assenza di distrofina (in verde) nei muscoli di un modello canino affetto da distrofia muscolare di Duchenne (a sinistra) e il ripristino della distrofina negli animali trattati con CRISPR/Cas9 (a destra).

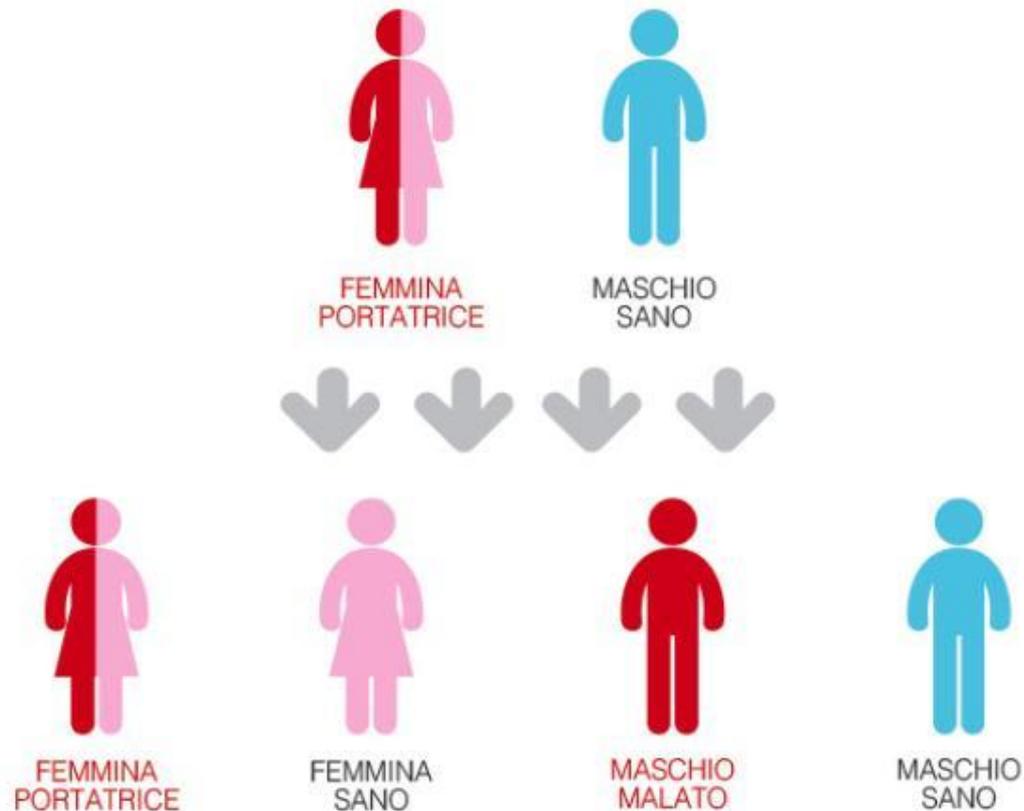
Credit: UT Southwestern Medical Center



Distrofia di Duchenne

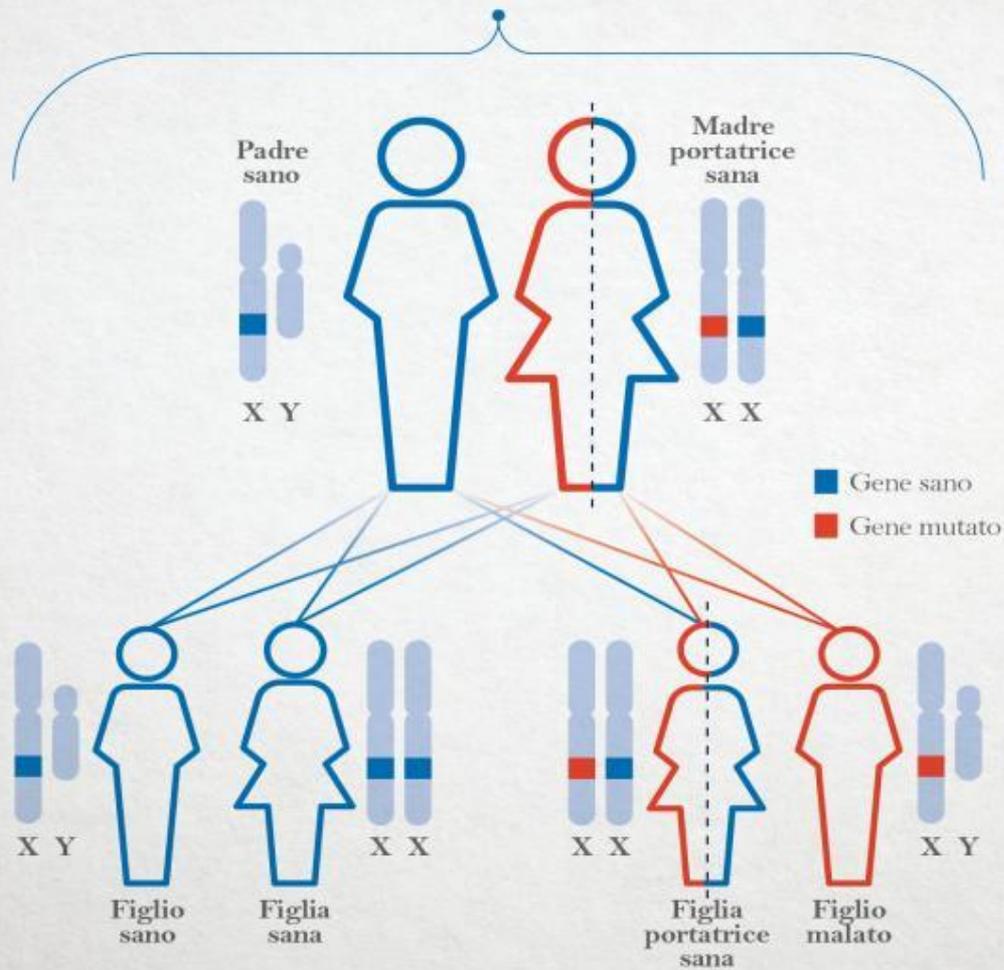
- Come tutte le malattie a trasmissione recessiva legate al cromosoma X la DMD si manifesta solo nei maschi e viene trasmessa da donne sane portatrici del gene difettoso.
- E' però possibile stabilire se un malato di DMD ha ereditato la malattia dalla madre o se si tratta di una nuova mutazione
- Frequenza:
1,5/10.000 nati vivi

Trasmissione recessiva legata al cromosoma X di una donna portatrice



Se una femmina portatrice ha un figlio trasmetterà o il cromosoma X con il gene normale o l'altro cromosoma X con il gene mutato. Ciascun figlio ha quindi **1 probabilità su 2 (il 50%) di ereditare il gene mutato** ed essere affetto dalla malattia. C'è anche 1 probabilità su 2 (il 50%) che il figlio erediti il gene normale: in questo caso il figlio/a non sarà affetto dalla malattia.

Eredità X recessiva



Il super pomodoro

02 ottobre 2018

Gruppo di ricercatori brasiliani, statunitensi e tedeschi guidati da Jörg Kudla dell'Università di Münster

- Ha prodotto una varietà di pomodoro molto ricca di **licopene**, una sostanza antiossidante.
- Il risultato è stato ottenuto in **1 sola generazione** a partire dalla specie selvatica sudamericana *Solanum pimpinellifolium*.

Ultima notizia

18 OCTOBER 2019

- Russian 'CRISPR-baby' scientist has started editing genes in human eggs with goal of altering deaf gene
- Denis Rebrikov also told Nature that he does not plan to implant gene-edited embryos until he gets regulatory approval

Genetica

Cosa c'è di nuovo in
genetica?

Grazie

Rita Dougan 2020

