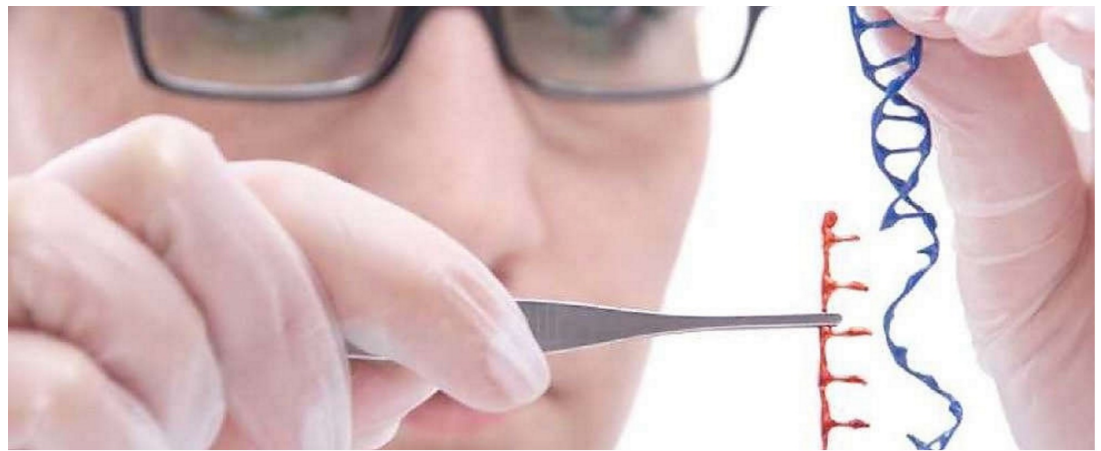




07 aprile 2015

Nuove forbici molecolari per l'editing genetico



Specifici geni possono essere modificati *in vivo* grazie a una versione più piccola dell'enzima Cas9, una forbice molecolare già utilizzata per ingegnerizzare il genoma. In uno studio sui topi, i ricercatori sono riusciti a modificare l'attività del gene che controlla il colesterolo, diminuendone i livelli nel sangue

03 dicembre 2015

Interventi di editing genetico sempre più mirati e sicuri



Cambiando solo tre amminoacidi dei 1400 circa che formano la proteina Cas9 - le "nanoforbici" usate nella nuova tecnica di modificazione del genoma chiamata CRISPR/Cas9 - è possibile assicurarsi che l'enzima non sbagli bersaglio e vada a colpire una parte indesiderata del DNA (*red*)

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats



Tecnologie per
“genome editing”

Genome editing tools are sequence-specific nucleases

Genome editing tools have two features:

- 1) Recognize specific DNA sequences (i.e. specific genes or non-coding elements)
- 2) Cut DNA (“nuclease”), then a scar is left behind

THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2020



Emmanuelle
Charpentier

Jennifer A.
Doudna

"for the development of a method
for genome editing"

THE ROYAL SWEDISH ACADEMY OF SCIENCES

OCTOBER 17, 2016

Next Generation Leaders

TIME

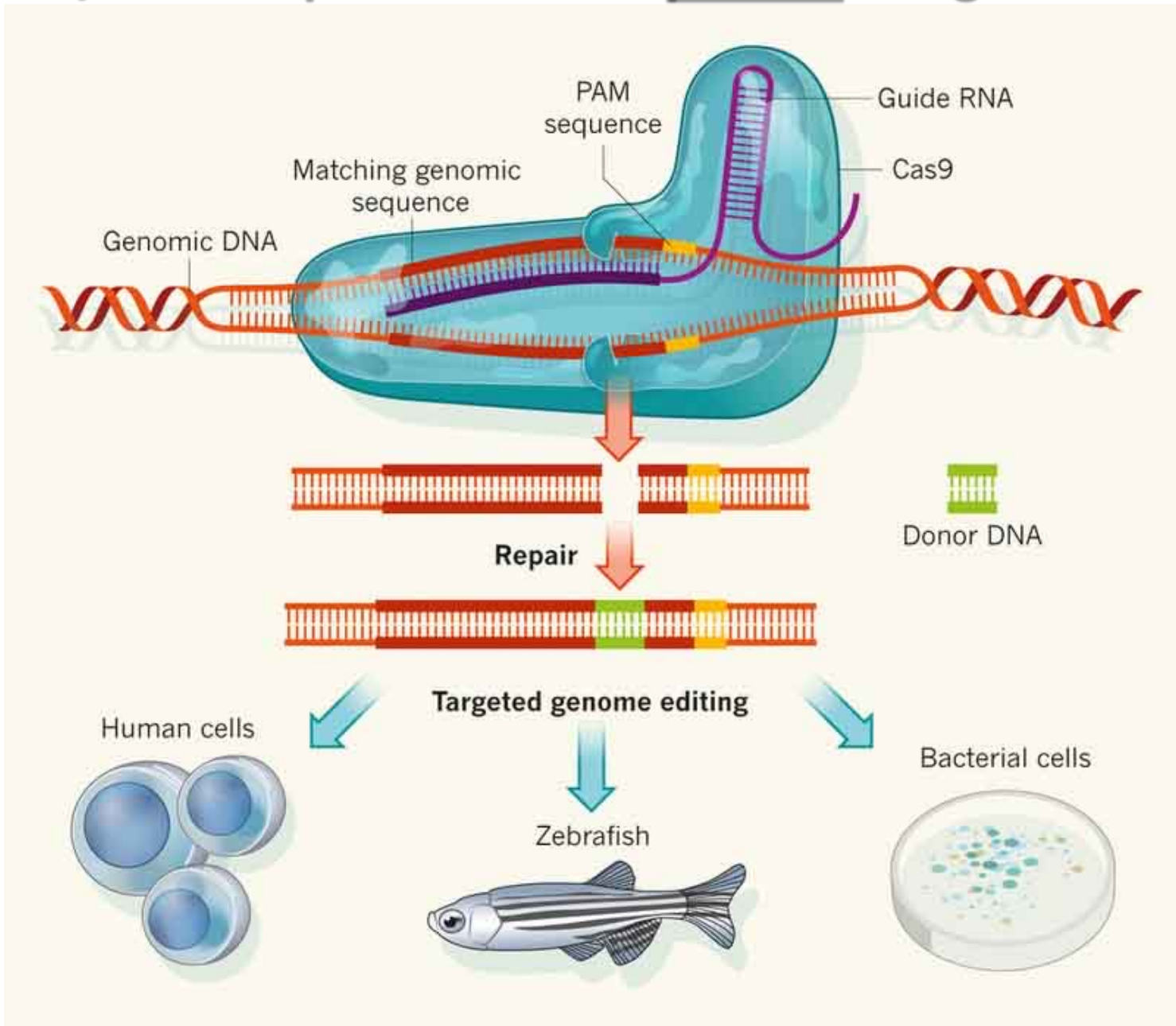
**Feng
Zhang,**
Biomedical
pioneer &
nine others
who are
remaking
the world



Feng Zhang named a runner-up for TIME's 2016 Person of the Year

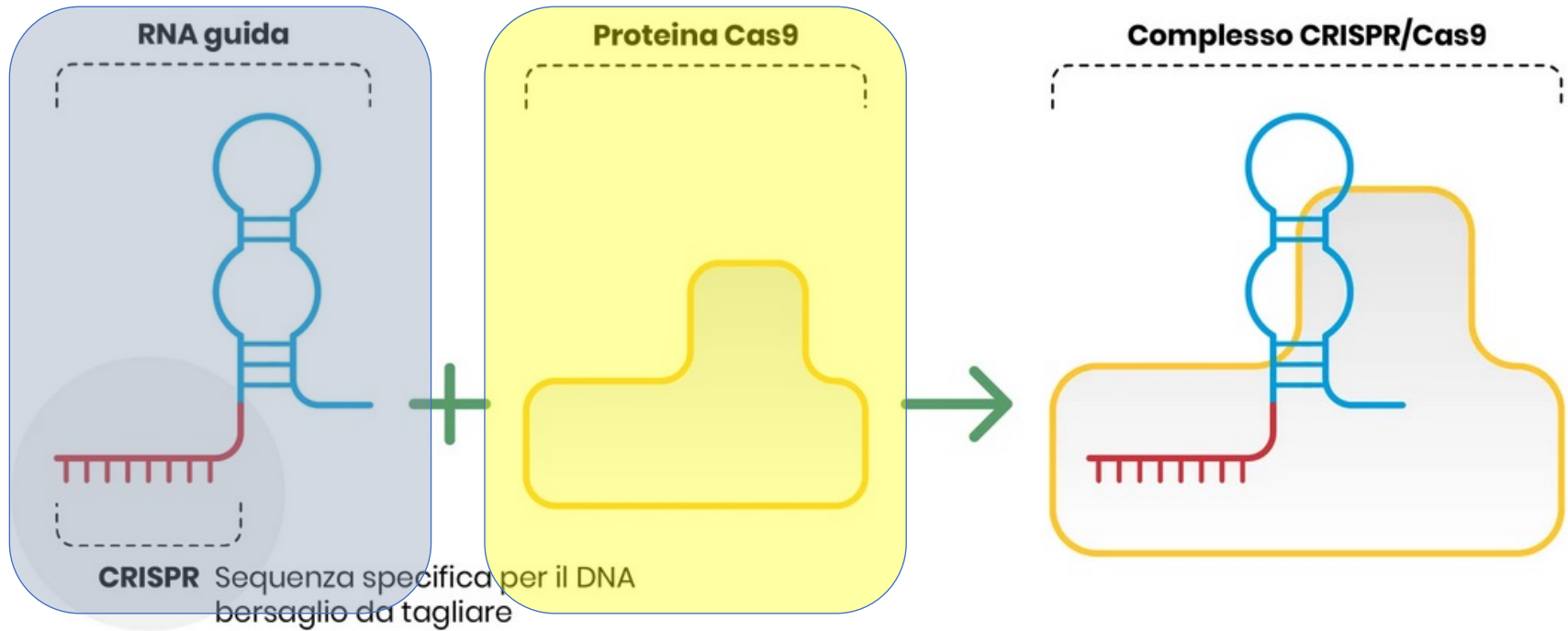
MIT and Broad Institute scientist shares recognition with four other scientists for developing CRISPR gene-editing systems.

CRISPER/CAS9: il primo sistema preciso di “gene editing”



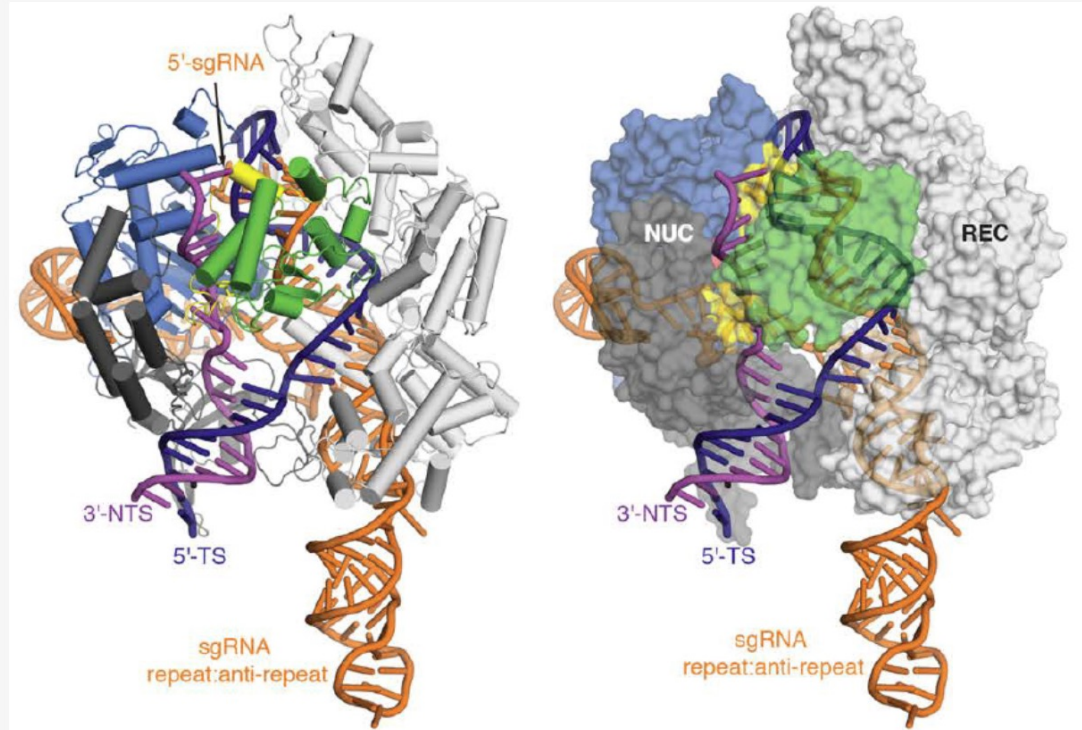
CRISPR/CAS9

Assemblaggio complesso CRISPR/Cas9



CRISPR/CAS9

Proteína Cas9



Cas9 bound to target DNA. Crystal structure of Cas9-guide RNA complex primed for DNA cleavage. [Read more...](#)

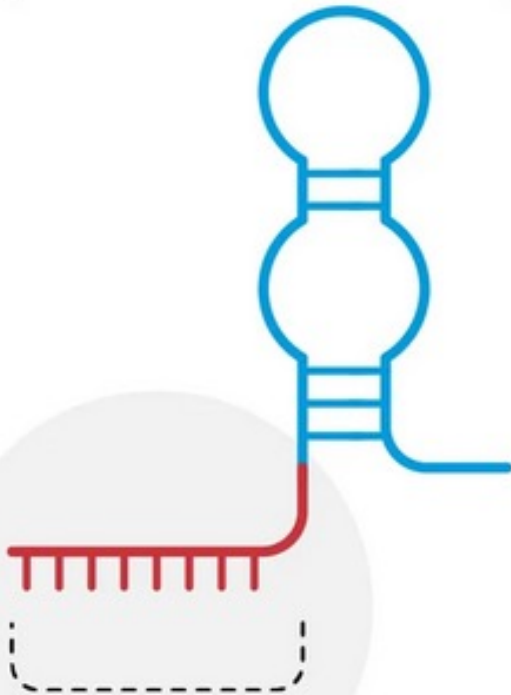
Cas9 proteins are RNA-guided endonucleases able to generate “double strand breaks” in invasive DNA during and adaptive bacterial response.

CRISPR/CAS9

RNA guida

RNA GUIDA

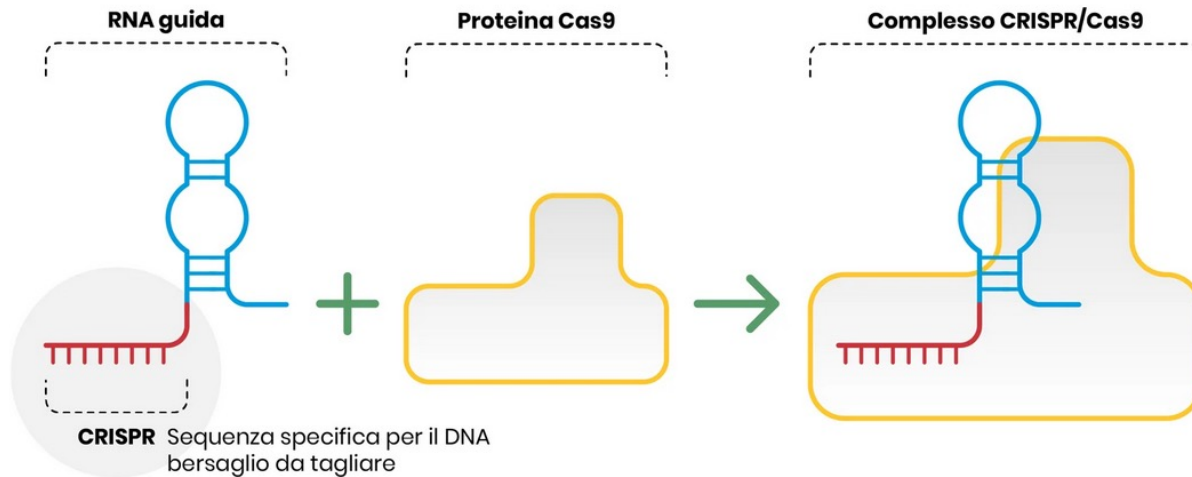
una molecola di RNA con una definite struttura tridimensionale, in grado di guidare la proteina CAS9 sul sito preciso del DNA da tagliare, complementare all a sequenza **CRISPR**, che può essere facilmente modificata in laboratorio.



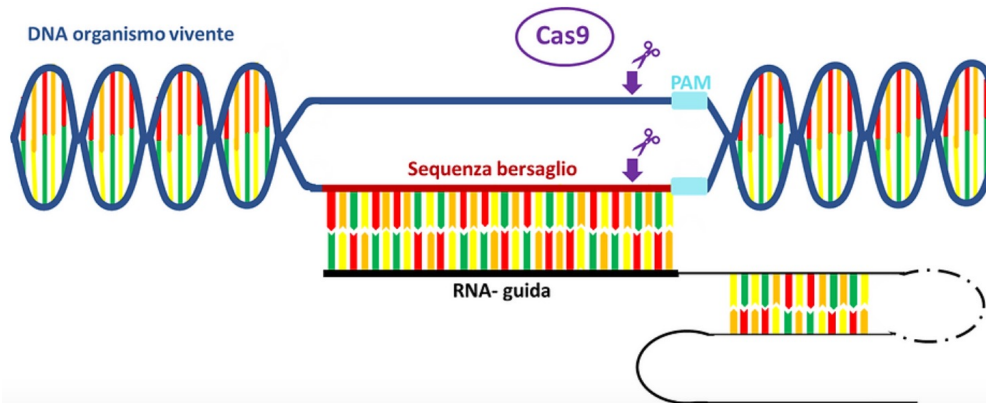
CRISPR Sequenza specifica per il DNA bersaglio da tagliare

CRISPR/CAS9

Assemblaggio complesso CRISPR/Cas9

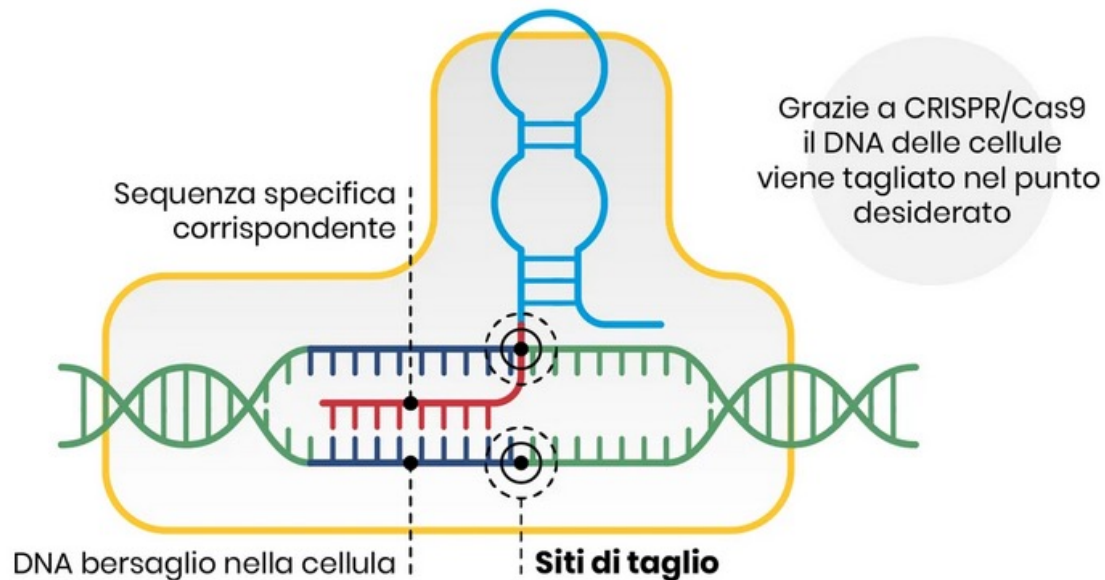


L'azione di CAS9 e' strettamente dipendente dalla presenza di un "protospacer adjacent motif (PAM) in the target DNA, che assicura il corretto posizionamento di CAS9 sul DNA bersaglio



CRISPR/CAS9

Associazione al DNA bersaglio

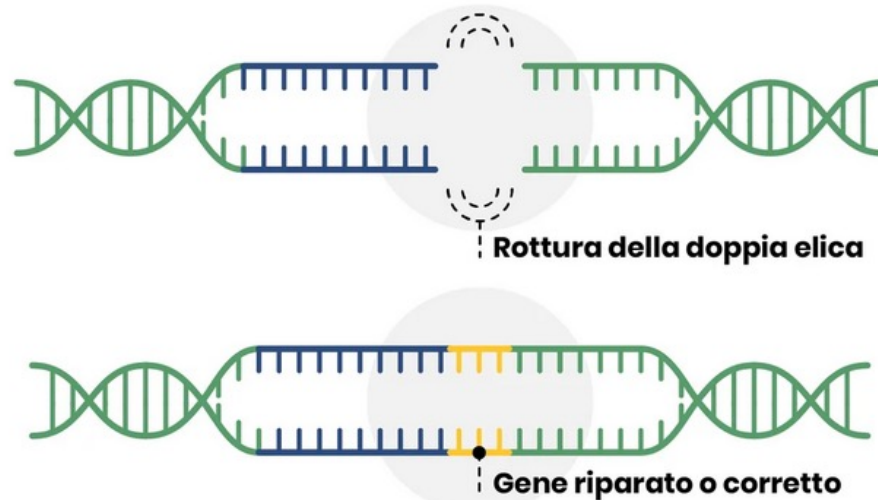


L'RNA guida "orienta" Cas9 indicandole dove effettuare il taglio. Una volta associata a Cas9, l'RNA guida agisce come una specie di "ancora", fermando Cas9 sulla sequenza di DNA scelta.

Cas9, il cui nome sta per *CRISPR-associated**, **introduce una rottura della doppia elica** nel sito prescelto, e può essere programmata per effettuare specifiche modifiche al genoma di una cellula.

CRISPR/CAS9

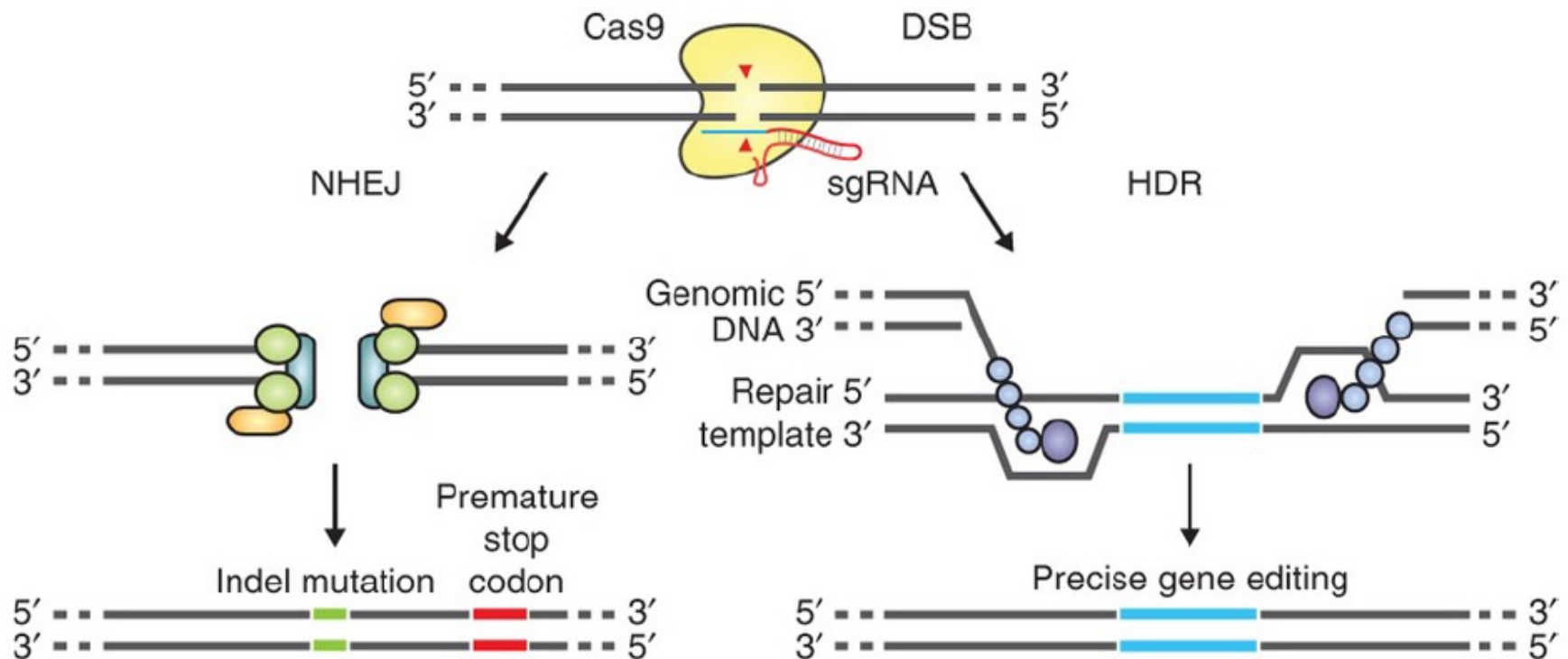
Correzione del DNA



Una volta tagliata, la sequenza di DNA può essere riparata per inserire nuove "informazioni" geniche o per correggere mutazioni patologiche

Una volta tagliato, il DNA può essere aggiustato dai naturali meccanismi di riparazione della cellula; in alternativa, è possibile **eliminare** sequenze di DNA dannose dal genoma bersaglio oppure **sostituire** delle sequenze, andando ad esempio a correggere delle mutazioni causa di malattie

How can cells repair double strand breaks?



Using the **Cas9** endonuclease is possible to induce precise DSBs and this greatly **stimulate genome editing through HR-mediated recombination** events

Despite this, **HDR is a very inefficient mechanism**. The percentage of homologous recombination can be lower in resting cells, as in cardiomyocytes

Batteri e strategie di difesa

In natura sono sempre esistiti prede e predatori. Nel mondo microscopico dei batteri, i predatori, o meglio gli invasori, sono rappresentati dai **batteriofagi**: sono virus che attaccano i batteri, nei quali iniettano il proprio materiale genetico per iniziare la replicazione.

Per difendersi da questo attacco indesiderato, i batteri hanno sviluppato un sistema ingegnoso: delle **“forbici” molecolari estremamente precise** che **tagliano** il DNA dell'invasore e lo inattivano, **impedendo così l'infezione**.

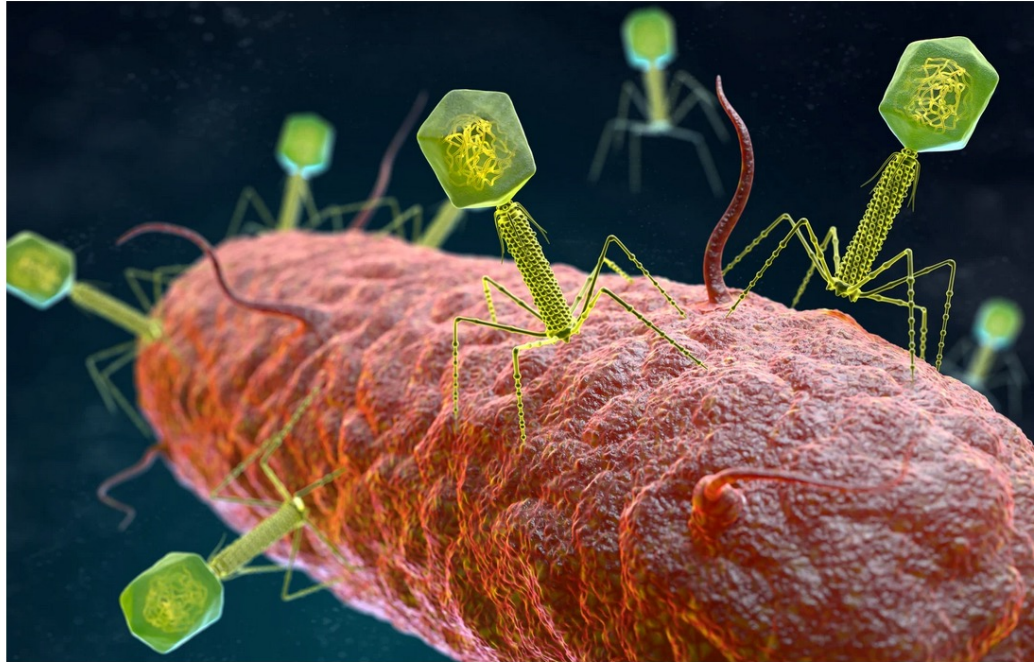


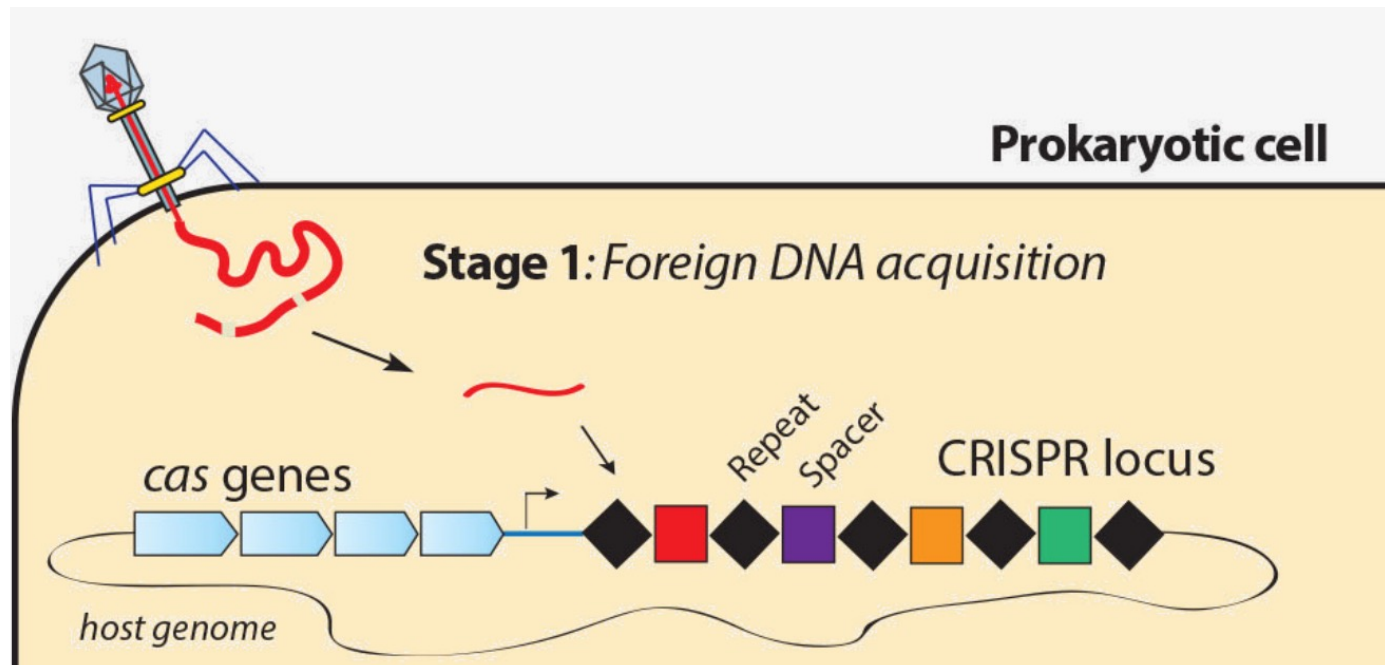
Illustrazione che mostra l'infezione di un batterio da parte di alcuni batteriofagi. I batteriofagi (in verde) si “aggrappano” alla membrana del batterio (in arancione) e iniettano al suo interno il proprio acido nucleico. Per difendersi, il batterio ha sviluppato il sistema CRISPR/Cas9, che taglia l'acido nucleico del batteriofago in punti specifici.

Ancora più sorprendente è il fatto che, mediante il sistema CRISPR/Cas9, i batteri siano in grado di **memorizzare geneticamente le infezioni già avvenute**, permettendo quindi al batterio di rispondere prontamente ad un eventuale secondo incontro con il patogeno e di tramandare questa risposta alla loro progenie.

Cosa significa CRISPR? L'acronimo **CRISPR** sta per **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats, cioè brevi sequenze di **DNA**, ripetute e palindrome (lette al contrario rimangono invariate) ed interspaziate in modo regolare da sequenze di **DNA** non ripetute.

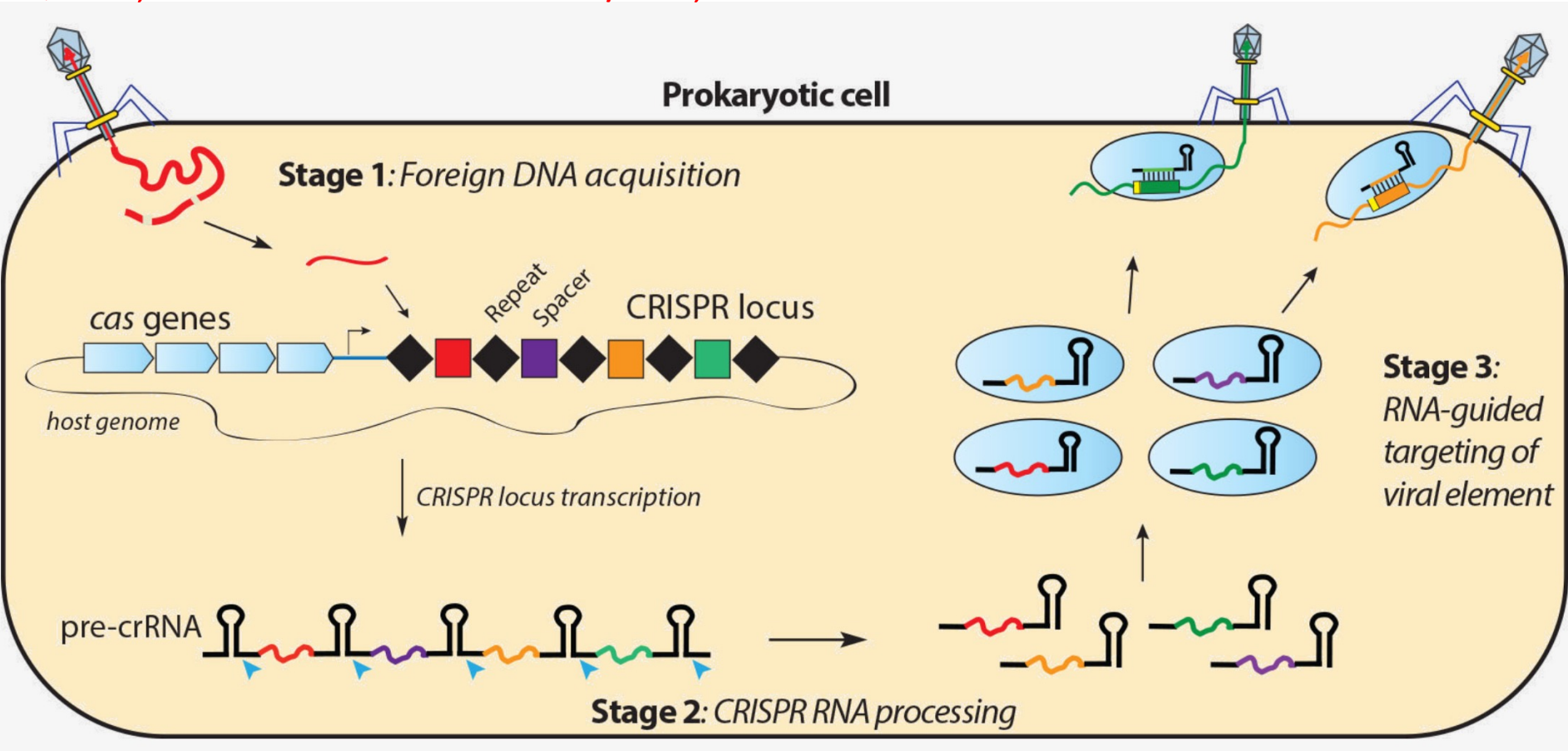
Cosa significa CRISPR? L'acronimo **CRISPR** sta per **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats, cioè brevi sequenze di **DNA**, ripetute e palindrome (lette al contrario rimangono invariate) ed interspaziate in modo regolare da sequenze di **DNA** non ripetute.

- In molti ceppi batterici, sono stati identificate regioni costituite da brevi sequenze ripetute (**Repeats**), intervallate regolarmente da sequenze non ripetute (**Spacers**).
- Gli spacers sono frammenti di DNA derivanti da VIRUS che, in precedenza, hanno infettato la cellula batterica.
- Vicino alle sequenze spacer e repeat, sono presenti i geni per le proteine Cas le quali, identificato il DNA del virus nemico, lo frammentano e incorporano i frammenti di DNA virale nel cromosoma batterico.



- Ad una seconda infezione da parte di uno stesso virus, viene trascritto un RNA, codificante per le proteine CAS e per REPEATs e SPACERS. L'RNA sarà frammentato in segmenti corrispondenti ai singoli spacer derivanti dai frammenti virali.
- Ogni frammento si lega ad una proteina CAS. Una volta formata questa macchina molecolare, il DNA virale verrà analizzato e se al DNA del virus corrisponde una delle sequenze spaziatrici della cellula batterica, essa lo taglia, sopprimendone l'attacco.

Quindi, tramite il sistema CRISPR/CAS, il batterio riesce a difendersi da attacchi virali.



Applicazioni di CRISPR-Cas9

Il sistema di editing genomico permette di:

1. Produrre mutazioni
2. Correggere i difetti di un gene
3. Inserire nel genoma un nuovo segmento di DNA utile alla cellula.
4. Eliminare un gene dal genoma di una cellula

AGRICOLTURA

Si sta cercando di rendere alcune coltivazioni più resistenti, in modo da ridurre fino ad eliminare l'uso di pesticidi

MEDICINA

Prevenzione e trattamento di diverse patologie, tra cui Corea di Huntington, Fibrosi Cistica, Distrofia Muscolare di Duchenne, Atrofia Muscolare Spinale, Sclerosi Laterale Amiotrofica e molte altre

Ethical concerns

Scientists and all of us should carefully consider the many ethical concerns that can emerge with genome editing, including safety. First and foremost, genome editing must be safe before it is used to treat patients. Some other ethical questions that scientists and society must consider are:

1. Is it okay to use gene therapy on **an embryo** when it is impossible to get permission from the embryo for treatment? Is getting permission from the parents enough?
2. What if gene therapies are too expensive and only wealthy people can access and afford them? That could worsen existing health inequalities between the rich and poor.
3. Will some people use genome editing for traits not important for health, such as athletic ability or height? Is that okay?
4. Should scientists ever be able to **edit germline cells**? Edits in the germline would be passed down through generations.

Most people agree that scientists should not edit the genomes of germline cells at this time because the safety and Scientific communities across the world are approaching germline therapy research with caution because edits to a germline cell would be passed down through generations. Many countries and organizations have strict regulations to prevent germline editing for this reason. The NIH, for example, **does not fund research to edit human embryos.**

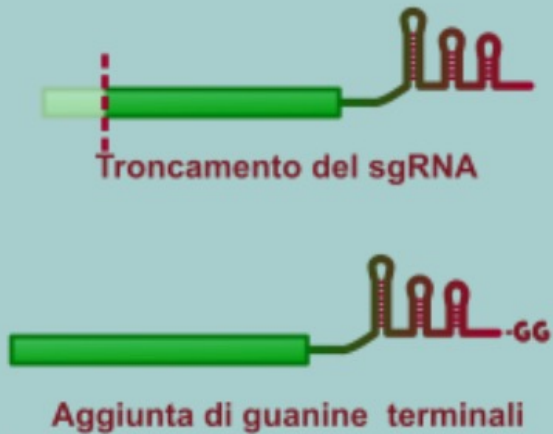
Scientists across the world held a conference to talk about these and similar ethical issues at the **International Summit on Human Gene Editing.**

Gli effetti collaterali di CRISPR/Cas9 e le attuali strategie per mitigarli.

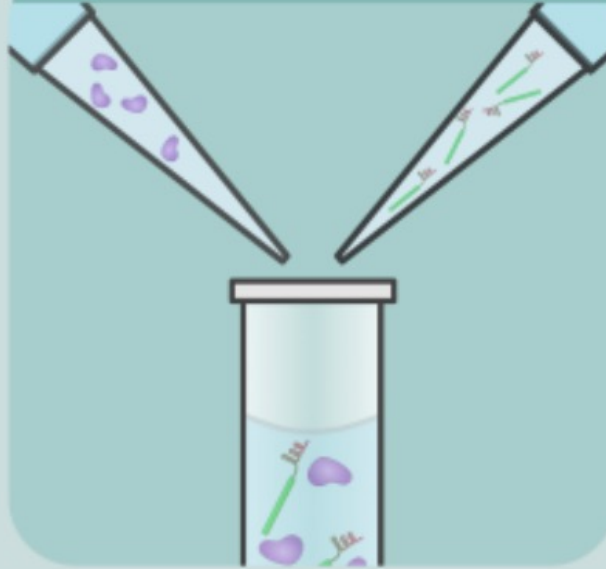
- Il sistema CRISPR/Cas9 spesso non solo taglia esclusivamente nel sito del genoma previsto, ma anche in altri punti indesiderati, chiamati **target aspecifici** (dall'inglese off-targets) con frequenza molto elevata (>50%) ;
- I target aspecifici sono principalmente dovuti ad omologie di sequenza tra sgRNA e sequenze di DNA genomico diverse da quella target, nonché al grado di purezza e stabilità del complesso sgRNA/Cas9 all'interno delle cellule;
- È stato riportato che il tempo che Cas9 trascorre all'interno delle cellule è direttamente proporzionale all'aumento degli eventi di taglio aspecifici, quindi sarebbe vantaggioso che il complesso sgRNA/Cas9 tagliasse il DNA bersaglio immediatamente dopo l'iniezione nella cellula per degradarsi subito dopo.
- I ricercatori hanno implementato numerose strategie per ridurre al minimo i target aspecifici e aumentare la sicurezza del sistema CRISPR/Cas9.

Strategie di minimizzazione degli effetti fuori bersaglio

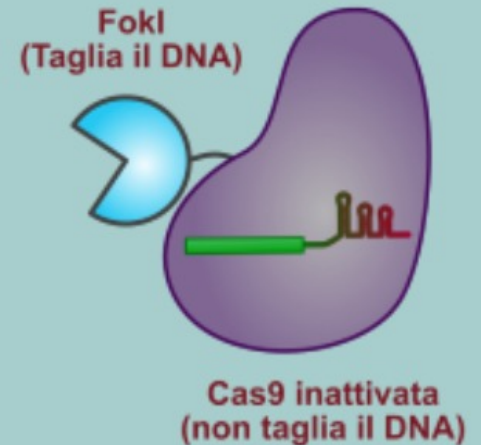
Modifica del sgRNA



Concentrazione/ Formulazione



Modifica della Cas9



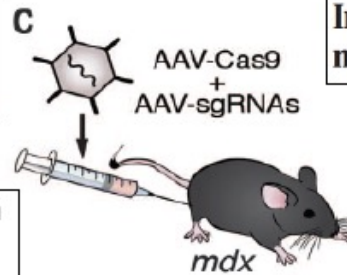
1. Alterare la sequenza di sgRNA. In particolare, il troncamento del sgRNA o l'aggiunta di due [nucleotidi](#) specifici chiamati guanine alla fine di sgRNA sono in grado di aumentare la specificità verso il bersaglio, diminuendo le mutazioni indesiderate in siti aspecifici al di sotto dell'1%.
2. Controllare la concentrazione e la formulazione del complesso sgRNA/Cas9, al fine di controllarne la stabilità ed il comportamento all'interno delle cellule.
3. Modificare la stessa Cas9, per migliorare ulteriormente la specificità del taglio del DNA (fusione della Cas9 inattiva con il [dominio nucleasico FokI](#)).
4. I progressi della bioinformatica e dell'ingegneria genetica stanno fornendo strumenti per migliorare sgRNA e Cas9 in termini di efficacia e sicurezza.

Systemic delivery of CRISPR-Cas9 restores dystrophin expression in mouse

Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy

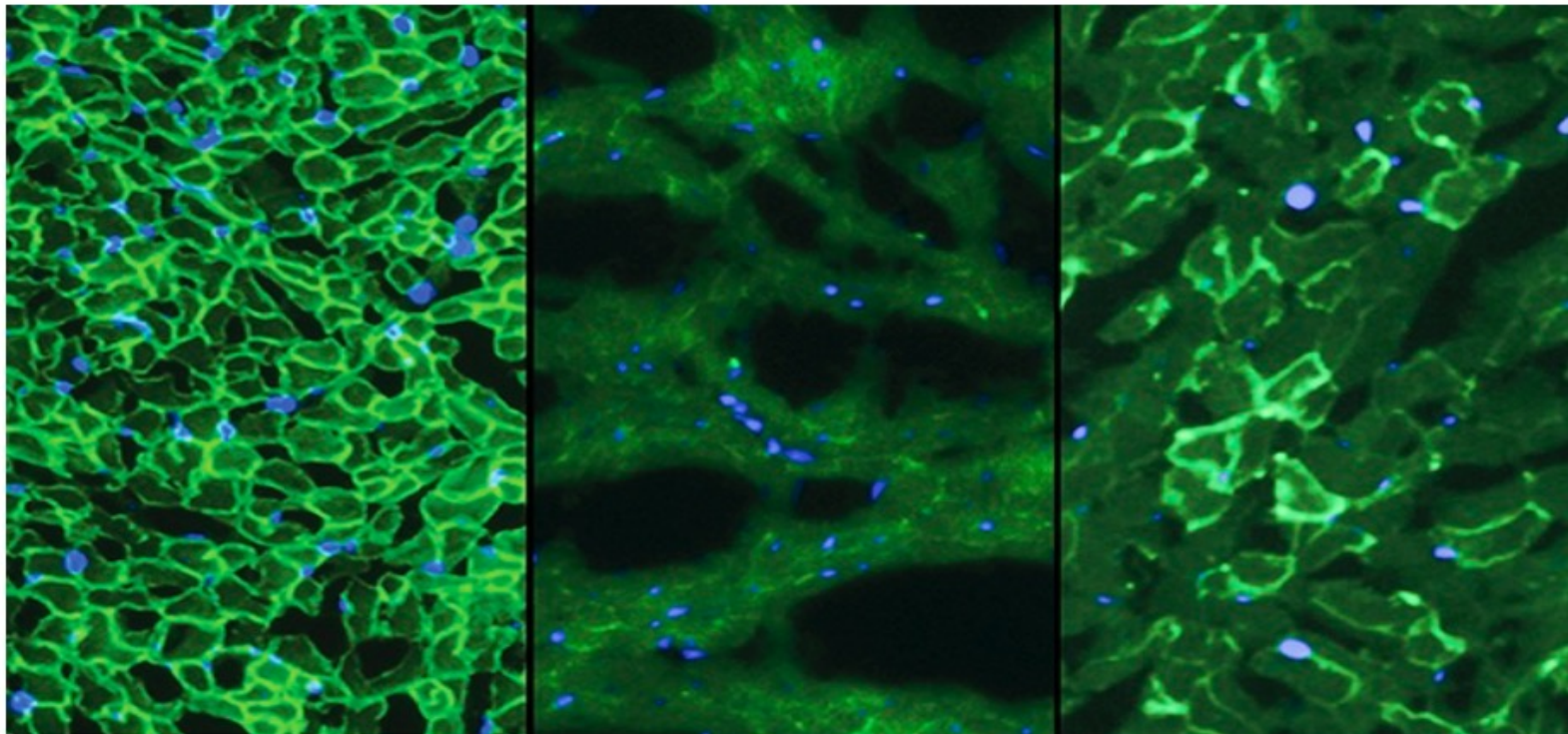
In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells

Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA



In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy

Science
AAAS



WT

Muscular Dystrophy

Muscular Dystrophy +
CRISPR/Cas 9

CRISPR/Cas9 system possible application

Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA

Chengzu Long,^{1*} John R. McAnally,^{1*} John M. Shelton,² Alex A. Mireault,¹ Rhonda Bassel-Duby,¹ Eric N. Olson^{1†}



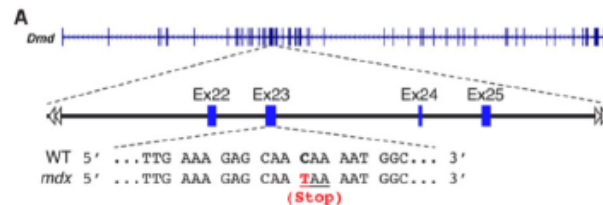
Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)

It's a **X-linked pathology**, caused by a point mutation in the gene of Dystrophin (*Dmd*). This gene codifies for a large cytoskeletal structural protein, crucial for muscle cells and membrane integrity.



Animal model

mdx mice carrying a single point mutation (nonsense mutation) in the exon 23 of *Dmd* gene.



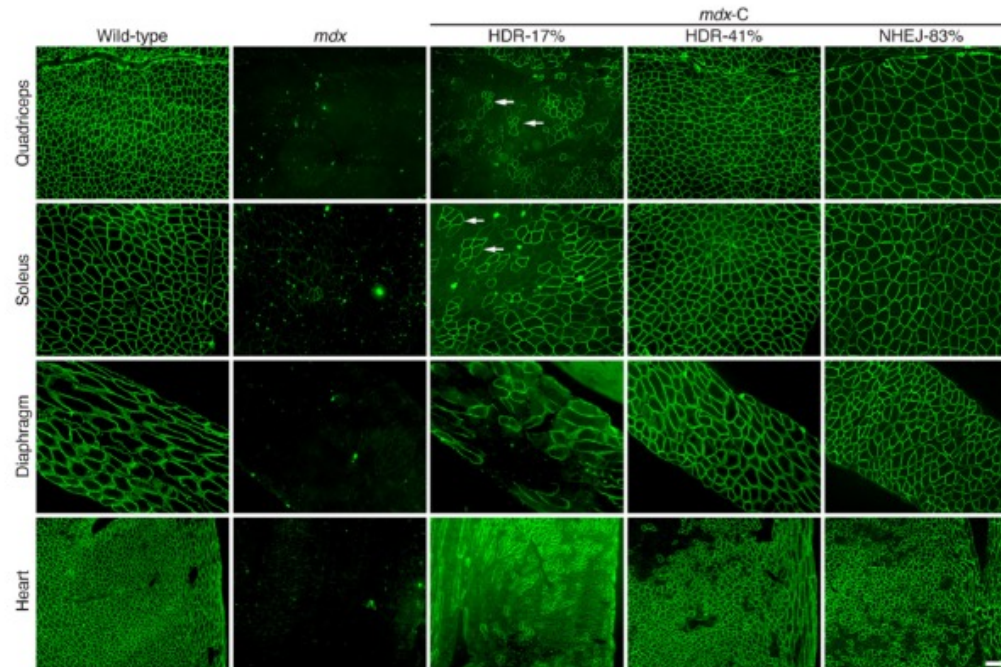
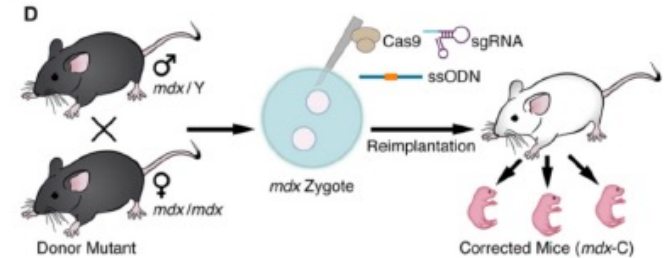
CRISPR/Cas9 system to correct the mutation

Cas9 mRNA, the sgRNA against *Dmd* exon 23 and ss oligonucleotide (ssODN) as donor DNA for gene correction were microinjected inside mdx Zygote. This was then reimplanted in pseudopregnant female mice.

CRISPR/Cas9 system possible application

Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA

Chengzu Long,^{1*} John R. McAnally,^{1*} John M. Shelton,² Alex A. Mireault,¹ Rhonda Bassel-Duby,¹ Eric N. Olson^{1†}

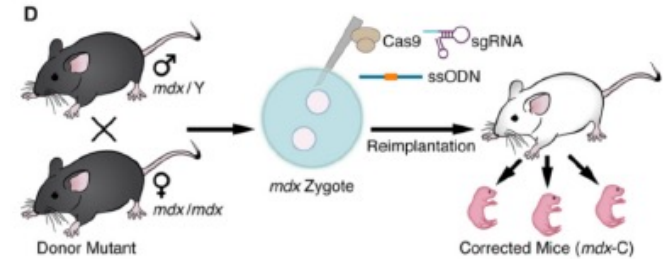


Dystrophin immunofluorescence (green) in wild-type mice is present in all muscles and is completely absent in *mdx* mice. In the HDR-41% and in the NHEJ-83% *mdx*-C mice muscles are composed by dystrophin-positive myofibers only.

CRISPR/Cas9 system possible application

Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA

Chengzu Long,^{1*} John R. McAnally,^{1*} John M. Shelton,² Alex A. Mireault,¹ Rhonda Bassel-Duby,¹ Eric N. Olson^{1†}

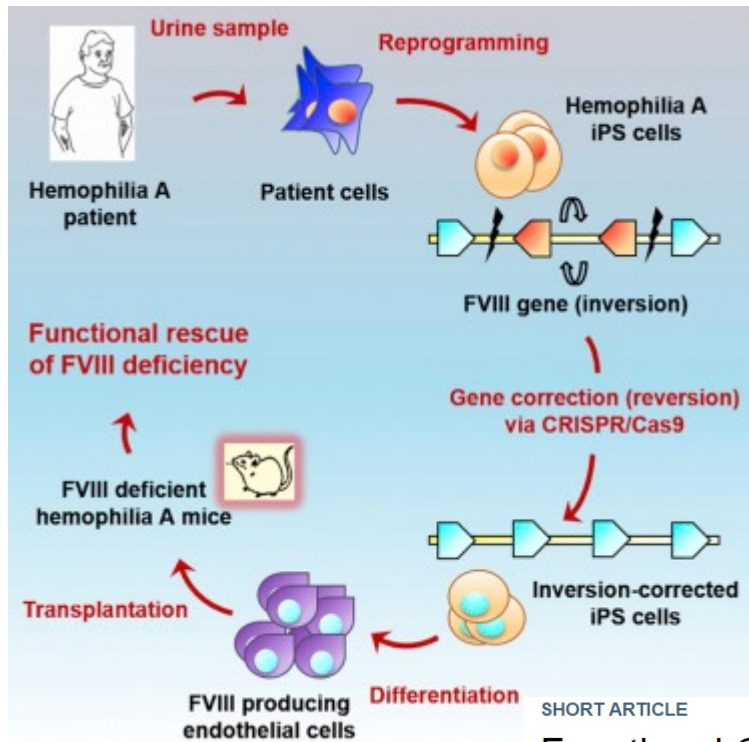


Long *et al.* apply genome editing to “correct” the disease-causing mutation in mice genetically destined to develop the disease. This germline editing strategy kept muscles from degenerating, even in mice harboring only a small percentage of corrected cells. Although not feasible for humans, this proof of concept sets the stage for applying genome editing to specific cell types involved in the disease.

CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse

Yuting Guan, Yanlin Ma, Qi Li, Zhenliang Sun, Lie Ma, Lijuan Wu, Liren Wang, Li Zeng, Yanjiao Shao, Yuting Chen, Ning Ma, Wenqing Lu, Kewen Hu, Honghui Han, Yanhong Yu, Yuanhua Huang, Mingyao Liu, Dali Li

Author Affiliations



SHORT ARTICLE

Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9

Chul-Yong Park⁶, Duk Hyoung Kim⁶, Jeong Sang Son⁶, Jin Jea Sung, Jaehun Lee, Sangsu Bae, Jong-Hoon Kim⁷, Dong-Wook Kim⁷  , Jin-Soo Kim⁷  

Curare l'emofilia?

The X-linked genetic bleeding disorder caused by deficiency of coagulator factor IX, hemophilia B, is a disease ideally suited for gene therapy with genome editing technology.

These studies suggest that CRISPR/Cas-mediated *in situ* genome editing could be a feasible therapeutic strategy for human hereditary diseases, although an efficient and clinically relevant delivery system is required for further clinical studies.

Cell 2015

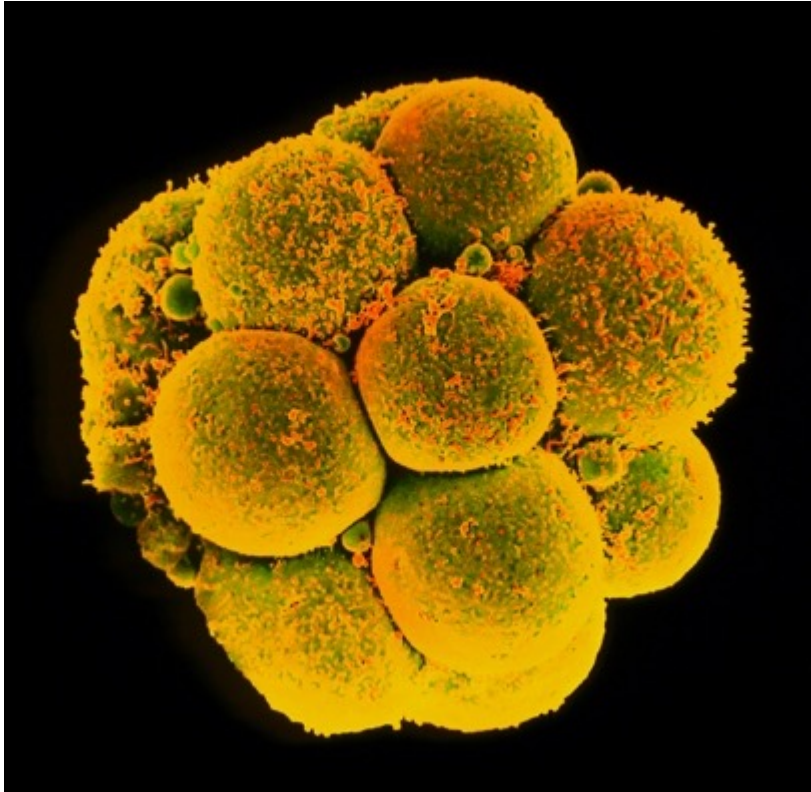
Editing humanity

The prospect of genetic enhancement



CRISPR debate fueled by publication of second human embryo–editing paper

By [Jocelyn Kaiser](#) | Apr. 8, 2016, 3:45 PM



NATURE | NEWS

Second Chinese team reports gene editing in human embryos

Study used CRISPR technology to introduce HIV-resistance mutation into embryos.

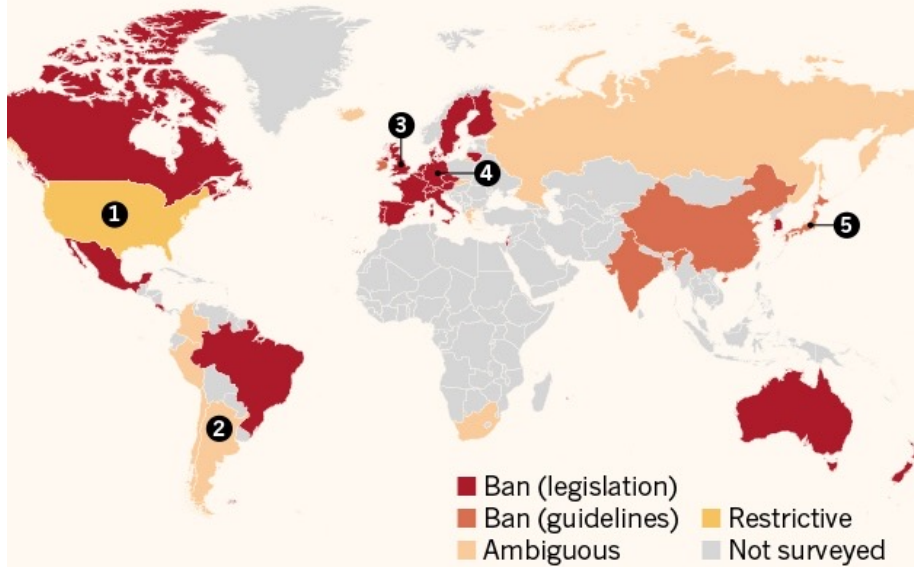
[Ewen Callaway](#)

A far scattare il cortocircuito tra ricerca scientifica ed etica è stato il passo compiuto da un gruppo di ricercatori cinesi che nell'aprile del 2015 ha annunciato di aver preso un'ottantina di embrioni umani (ancorché difettosi e destinati comunque a distruggersi) e di averli sottoposti al taglia e incolla per correggere il gene responsabile della talassemia.

L'esperimento, ripetuto un anno dopo per rendere gli embrioni resistenti all'Hiv, ha violato la moratoria che qualche mese prima gli stessi ricercatori pionieri della tecnica si erano autoimposti.

CRISPR EMBRYOS AND THE LAW

Regulations governing genetic modification in human embryos vary. Some countries ban the practice through legislation that carries criminal penalties; others have unenforceable guidelines.



1. THE UNITED STATES does not allow the use of federal funds to modify human embryos, but there are no outright genome-editing bans. Clinical development may require approval.

2. ARGENTINA bans reproductive cloning, but research applications of human-genome editing are not clearly regulated.

3. THE UNITED KINGDOM's independent Human Fertilisation and Embryology Authority may permit human-genome editing for research, but the practice is banned in the clinic.

4. GERMANY has strict laws on the use of embryos in assisted reproduction. It also limits research on human embryos, and violations could result in criminal charges.

5. JAPAN, like China, India and Ireland, has unenforceable guidelines that restrict the editing of a human embryo's genome.

Where in the world
could the first
CRISPR baby be
born?

A look at the legal
landscape suggests
where human genome
editing might be used in
research or
reproduction

Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering

Patrick D. Hsu,^{1,2,3} Eric S. Lander,¹ and Feng Zhang^{1,2,*}

¹Broad Institute of MIT and Harvard, 7 Cambridge Center, Cambridge, MA 02141, USA

²McGovern Institute for Brain Research, Department of Brain and Cognitive Sciences, Department of Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA

³Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

*Correspondence: zhang@broadinstitute.org

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>



Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering

Patrick D. Hsu,^{1,2,3} Eric S. Lander,¹ and Feng Zhang^{1,2,*}

¹Broad Institute of MIT and Harvard, 7 Cambridge Center, Cambridge, MA 02141, USA

²McGovern Institute for Brain Research, Department of Brain and Cognitive Sciences, Department of Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA

³Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

*Correspondence: zhang@broadinstitute.org

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>

GENETICA

Gran Bretagna, via libera alla modifica genetica di embrioni umani

Si studieranno i primi sette giorni di vita degli embrioni modificati (che non potranno essere impiantati in una donna). L'obiettivo degli scienziati è capire quali sono i geni cruciali per sviluppare bambini sani e prevenire aborti spontanei

UK scientists gain licence to edit genes in human embryos

Team at Francis Crick Institute permitted to use CRISPR-Cas9 technology in embryos for early-development research.