

Dopo la clonazione della pecora Dolly (1996) è la più promettente scoperta scientifica degli ultimi anni in campo biologico. Si sta parlando della tecnica Crispr (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, in italiano: Gruppi di ripetizioni palindrome brevi interspaziate regolarmente) che ha messo a disposizione del mondo scientifico la possibilità di modificare, rimuovere e riorganizzare in modo preciso e rapido il Dna di quasi tutti gli organismi viventi, compresi gli esseri umani.

a cura di **CARLO SBIROLI**

CRISPR-CAS9

ULTIMA FRONTIERA DELLA BIOLOGIA. UNA POSSIBILE NUOVA ARMA CONTRO IL CANCRO

Negli ultimi tre anni un gran numero di progetti di ricerca sono stati avviati con la tecnica Crispr. S'intravedono già gli enormi vantaggi che si otterranno non solo in campo biologico e in medicina, ma anche nel modificare l'ambiente e per sviluppare varietà alimentari più resistenti

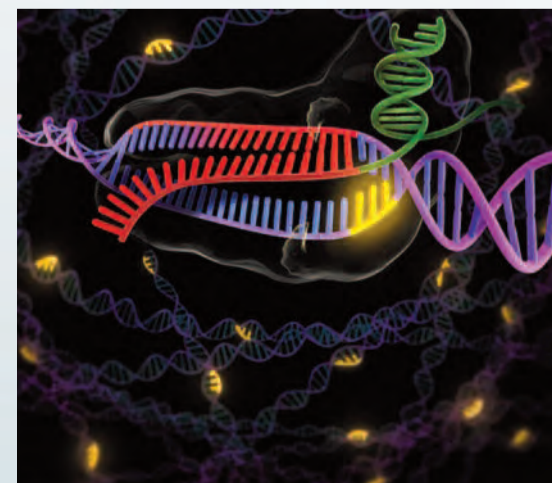
ALL'INIZIO C'È UNO YOGURT. Tutto parte infatti dal tentativo di rendere i batteri di questo alimento più resistenti ai virus. In questo modo EMMANUELLE CHARPENTIER, microbiologa francese, ora al Max Planck Institute for Infection Biology di Berlino, s'imbatte nel sistema Crispr-Cas9. Intuisce subito la grande portata di questa scoperta. Capisce che può diventare "un nuovo strumento di editing genetico" per la riscrittura del Dna, in grado di correggere errori genetici, e quindi potenzialmente capace di curare malattie e modificare alcune caratteristiche dell'individuo. Il suo studio è pubblicato sulla rivista *Science* nel 2012 ed è co-firmato da **Jennifer Doudna** dell'Università di California a Berkeley.

Negli ultimi tre anni un gran numero di progetti di ricerca sono stati avviati con la tecnica Crispr. S'intravedono già gli enormi vantaggi che si otterranno non solo in campo biologico e in medicina, ma anche nel modificare l'ambiente e per sviluppare varietà alimentari più resistenti (vedi *tabella*). Intanto entusiasmano i primi significativi risultati che si stanno raggiungendo in diversi ambiti della medicina, come nelle malattie genetiche, nei difetti delle staminali, nella cura dell'Aids. E s'intravede già un'altra possibile e importante applicazione di questa tecnica nel campo degli xenotrapianti: modificare geneticamente i maiali in modo che i loro organi, una volta trapiantati nell'uomo, non siano rigettati.

Negli ultimi anni c'è stata una vera e propria corsa alla tecnica Crispr. Tutta la sperimentazione è stata condotta esclusivamente su modelli animali e vegetali. Dal novembre scorso questa tecnica ha la sua prima "cavia umana". Per la prima volta è stata utilizzata su un malato di cancro. È successo all'Università cinese di Sichuan. Responsabile un team di oncologi, guidato da **Lu You**. Questi hanno prelevato i linfociti dal sangue di un paziente con cancro polmonare metastatico, hanno modificato il loro genoma con la tecnica Crispr e, dopo averli coltivati per moltiplicarli (in modo da aumentare la risposta immunitaria antitumorale), sono stati re-iniettati nel malato. In questo modo i ricercatori hanno utilizzato Crispr per annullare nelle cellule linfocitarie il gene che codifica per la proteina PD-1 (Programmed Cell Death Protein-1). Questa, nella sua normale attività, limita la risposta immunitaria antitumorale delle cellule, permettendo così al cancro di diffondersi facilmente. Ne consegue che l'annullamento da parte di Crispr della proteina PD-1 potenzia la risposta immunitaria antitumorale "Il trattamento è andato a buon fine e il paziente riceverà presto una seconda iniezione", ha precisato sul sito di *Nature News* Lu You. Il team ha

La sperimentazione è stata condotta esclusivamente su modelli animali e vegetali

Dal novembre scorso questa tecnica ha la sua prima "cavia umana". Per la prima volta è stata utilizzata su un malato di cancro. È successo all'Università cinese di Sichuan. La rivista *Nature* ha dedicato uno speciale al metodo CRISPR, dopo l'uscita di un articolo nell'aprile 2015 in cui il metodo è stato utilizzato per modificare uno zigote umano. Qui gli scienziati di tutto il mondo discutono per arrivare ad una regolamentazione dell'utilizzo di questa potente tecnologia.



Come funziona Crispr-cas9

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Polindromic Repeats) è il cardine intorno a cui ruota un preciso meccanismo immunitario che alcuni organismi unicellulari (come i batteri) utilizzano per difendersi dai virus.


IN PARTICOLARE, Crispr è l'acronimo del nome che è stato dato a segmenti di Dna contenenti brevi sequenze ripetute. Queste funzionano come "sentinelle molecolari": riconoscono le sequenze di un Dna estraneo agendo come se avessero acquisito una sorta di immunità. In particolare, quando un virus aggredisce un batterio, quest'ultimo cattura e incorpora frammenti di Dna del virus, creando una specie di "schedario identificativo" genetico. Qualora lo stesso virus dovesse attaccare le generazioni successive del batterio, questo userà i dati memorizzati per guidare un enzima killer (una endonucleasi) - **Cas9** - verso l'identica sequenza nel nuovo invasore che

aveva memorizzato in precedenza. Per arrivare sul bersaglio Cas9 utilizza Crispr, costituito da un Rna, che lo guida verso il frammento di genoma che ha subito la modificazione. Raggiunta il bersaglio l'enzima Cas9 taglia con precisione la sequenza di Dna che deve essere eliminata. A questo punto ci possono essere due possibilità. La prima: eliminazione, e quindi distruzione, del pezzo di Dna tagliato. In questo modo è possibile eliminare il materiale genetico di un virus infettante (ad esempio, Aids, Hcv) dal Dna umano ottenendo una risposta terapeutica senza l'uso di farmaci. La seconda: il gene selezionato viene sostituito con uno sano e quindi "riparato".

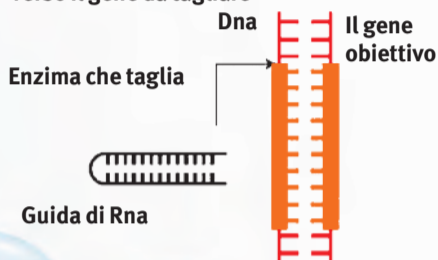


LA TECNICA

- 1 Un enzima "taglia" il Dna nel punto voluto. Per guidarlo verso l'obiettivo viene creata in laboratorio una molecola di Rna che funge da guida

 La "guida" fatta di Rna

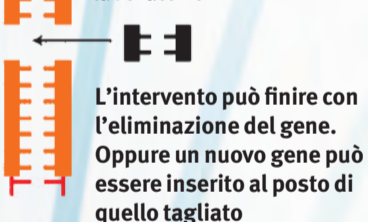
- 2 L'enzima è guidato dal Rna verso il gene da tagliare



- 3 L'Rna si lega al gene da tagliare. L'enzima taglia nel punto voluto.



- 4 Il gene tagliato viene sostituito con un gene sintetizzato in laboratorio



in programma di arruolare un totale di dieci pazienti (tutti con carcinoma polmonare metastatico), ciascuno dei quali riceverà fino a quattro infusioni di linfociti modificati con tecnica Crispr. Saranno successivamente monitorati per sei mesi per controllare l'eventuale comparsa di effetti collaterali.

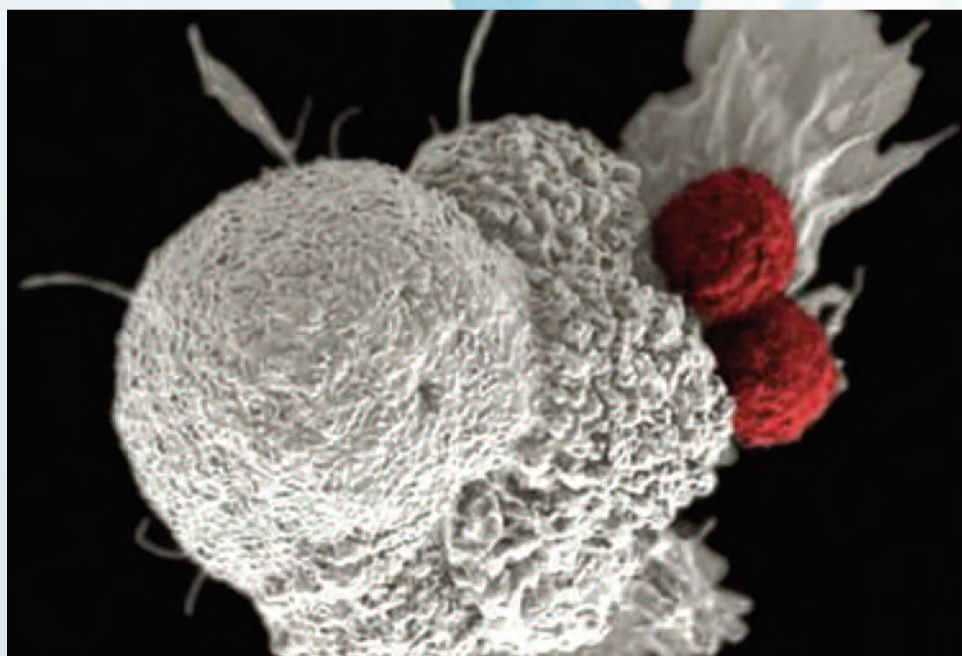
Lo studio cinese è di fase 1. Questo significa che si è ancora agli inizi del lungo iter della sperimentazione clinica. Non si conosce quale sia la dose migliore di linfociti modificati da somministrare, né il numero di infusioni necessarie per ottenere un buon risultato terapeutico. E non tutti gli oncologi ritengono che i risultati saranno migliori rispetto a quelli della terapia con anticorpi monoclonali. Innanzitutto "dobbiamo capire qual è il prezzo da pagare in termini di tossicità sistemica", precisa **Antonio Russo** professore ordinario di oncologia medica al dipartimento di discipline chirurgiche, oncologiche e stomatologiche dell'Università di Palermo. Certo, la prospettiva terapeutica è entusiasmante e il razionale molto forte, anche se basato su dati preliminari ottenuti esclusivamente da colture cellulari e modelli animali. Sul 'sistema uomo' potrebbero esserci molte variabili che saranno conosciute solo al termine del lungo iter di questa prima fase di sperimentazione clinica".

Uno dei maggiori timori dei ricercatori è la possibilità che l'annullamento del gene PD-1 nei linfociti con la Crispr possa provocare una grave reazione auto-immunitaria con gravi ripercussioni sull'organismo del paziente. Quali i costi di una eventuale terapia anticancro basata sulla tecnica Crispr? Molti ricercatori prospettano spese piuttosto alte. "È incredibile come questa tecnica possa riuscire a fare questo" spiega Naiyer Rizvi oncologo della Columbia University Medical Center di New York City. "Il processo di estrazione, di modificazione genetica e di ampliamento delle cellule è compito enorme. A meno che non mostri un grande aumento di efficacia, sarà difficile giustificare l'andare avanti". Alcuni oncologi dubitano che questa tecnica si dimostrerà superiore agli anticorpi monoclonali.

La ricerca sulla Crispr ha già innescato un'accesa competizione in campo biomedico tra Cina e Stati Uniti. Uno studio analogo a quello di Lu You sta per essere iniziato all'Università della Pennsylvania a Filadelfia, dove l'immunologo **Carl June** prevede di utilizzare Crispr in pazienti con mieloma multiplo, melanoma e sarcoma. Un altro team di ricercatori, presso l'Università di Pechino, ha in programma di utilizzare questa stessa tecnica in pazienti con cancro alla vescica, alla prostata e al rene. "In questa prima fase, precisa Russo, sembra che i cinesi siano stati più rapidi nell'avvio della sperimentazione clinica, ma sono certo che informazioni importanti arriveranno anche dagli studi americani. Al di là del prestigio e del merito attribuibile al paese che per primo riuscirà a pubblicare risultati scientificamente validi, considero questo un esempio di sana competizione da cui può trarre beneficio l'intera comunità scientifica e in particolare i pazienti oncologici". Non sarà importante chi vincerà la gara. L'importante è che sia il cancro a uscirne sconfitto.

Cellula di carcinoma a cellule squamose del cavo orale (in bianco) aggredita da due linfociti T (in rosso).

(Cortesia National Cancer Institute \ Duncan Comprehensive Cancer Center at Baylor College of Medicine/Rita Elen Serda)



CRISPR-CAS9

PROBLEMI ETICI

L'editing genetico e la scienza per tutti

La tecnologia Crispr ha aperto un ampio dibattito etico perché consente la manipolazione genetica nella ricerca biomedica

DOPO APPENA CINQUE ANNI dalla sua messa a punto, la tecnica Crispr è oggi adottata nei laboratori di tutto il mondo diventando strumento importante nella ricerca biomedica e nella biotecnologia. "In pochi anni la tecnologia Crispr ha rivoluzionato le scienze della vita", ha commentato il genetista **Edoardo Boncinelli**. "Prima se ne parlava solo nei corridoi, ma ora l'editing genetico è esploso. La Crispr è stata utilizzata per mimare l'evoluzione della specie. Quel che la natura ha impiegato millenni a selezionare può essere riprodotto in un batter d'occhio in laboratorio". Ricercatori dell'università di Chicago, per esempio, hanno inserito in alcuni pesci di *zebrafish* varie versioni del gene Hox con l'intento di determinare la trasformazione delle pinne in zampe. Piccole ossa simili a dita si sono effettivamente sviluppate ai lati del corpo. E all'Università di Harvard **George Church**, uno dei più importanti biologi del mondo, ha usato Crispr per inserire dei geni di mammoth (conservati nel permafrost nonostante l'estinzione avvenuta 3-4mila anni fa) in alcune cellule di elefante. Nessun cucciolo preistorico è nato dall'esperimento. "Ma contiamo di riuscirci, una volta superate le difficoltà", ha assicurato Church dopo il primo fallimento.

La tecnologia Crispr è facile da usare e costa poco. "Non deve stupire", scrive Elena Dusi su *Repubblica*, "che Crispr abbia attirato l'attenzione degli scienziati fai-da-te: quegli appassionati che si divertono a fare piccoli esperimenti nel garage di casa o in laboratori affittati a ore. Chi vuole, può provare anche a casa propria, ordinando un kit da 130 euro tramite Internet". Pipette, provette, proteine taglia-Dna e molecole di Rna-guida stanno tutte in una ventiquattre e permettono di creare a casa propria, ad esempio, un batterio *Escherichia Coli* Ogm. Questo fai-da-te, questa facilità di utilizzazione della tecnica Crispr ha sollevato non pochi problemi di ordine pubblico (bioterrorismo) e sul piano etico.

Cosa si può fare di pericoloso in laboratori un po' più attrezzati? "Tutto quello che ti viene in mente", spiega Church. "Nei nostri laboratori le regole sono ferree, e i controlli frequenti. Ma non è ovunque così. Volendo, si potrebbero ingegnerizzare i virus per renderli pericolosi, o i batteri per renderli resistenti ai farmaci. E perfino manipolare un embrione per donargli gli occhi azzurri o renderlo immune dall'Aids". Proprio questa possibilità di poter "manipolare facilmente" gli embrioni umani ha fatto scattare il cortocircuito tra ricerca scientifica in campo biomedico ed etica. Tutto è nato dall'annuncio di un gruppo di ricercatori cinesi dell'Università Sun Yat-sen di Canton che nell'aprile del 2015, utilizzando la tecnica Crispr, cercò di correggere in ottantasei embrioni umani (difettosi e destinati comunque a essere distrutti) il difetto che determina la beta talassemia. Di questi embrioni modificati ne sopravvissero settantuno e solo in una piccola percentuale si ottenne la modifica voluta, mentre diversi altri riportarono alterazioni indesiderate. L'esperimento, fu ripetuto un anno dopo su altri embrioni con l'obiettivo di renderli resistenti all'Aids. Quest'ultima sperimentazione fu fatta in violazione della moratoria che qualche mese prima gli stessi ricercatori si erano autoimposti. A parte queste due sperimentazioni dei ricercatori cinesi, non sono state segnalate altre ricerche su embrioni umani.

"Se qualcuno volesse compiere un passo decisivo, come ri-



Quel che la natura ha impiegato millenni a selezionare può essere riprodotto in un batter d'occhio in laboratorio



Possibili campi di applicazione della tecnologia Crispr*

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Terapia cancro | La tecnica Crispr permette di creare cellule immunitarie (linfociti), geneticamente modificate, di pazienti con cancro che, reiniettati nel malato, attaccano e distruggono le cellule tumorali |
| Malattie genetiche | Esperimenti su embrioni non vitali hanno dimostrato che è possibile con Crispr agire sul Dna delle cellule "sbagliate" correggendole. Entro il 2017 si prevede di usare Crispr per curare una rara forma di cecità chiamata "amaurosi congenita di Leber" |
| Diagnostica | L'editing genetico, eseguito con Crispr, può mettere in evidenza le sequenze di Dna modificate che sono responsabili di malattie come Aids |
| Biotechologie agroalimentari | Crispr può essere usata per modificare geni di piante senza dover ricorrere al Dna di altre specie, come invece avviene nelle Ogm tradizionali |
| Modificazioni dell'ambiente | La diffusione di malattie trasmesse da vettori (come la malaria) può essere ridotta o eliminata introducendo geni resistenti alla patologia negli insetti in natura. In questo caso è utilizzata l'applicazione Crispr-cas9 gene drive |
| Xenotrapianti | Crispr può essere utilizzata per modificare geneticamente i maiali in modo che i loro organi, una volta trapiantati nell'uomo, non siano rigettati |

* Tutte le applicazioni sono ancora in fase di sperimentazione o di progettazione



scrivere la linea germinale”, dice **Eric Lander**, direttore del Broad Institute di Harvard, biologo al MIT e che in passato è stato a capo del Progetto Genoma Umano, “dovrà avere degli ottimi motivi per farlo ed essere in grado di spiegarli e dovrà avere anche il pieno sostegno della società”. Le principali preoccupazioni etiche derivano dal fatto che una eventuale sperimentazione sulla linea germinale umana produrrebbe delle modifiche che sarebbero trasmesse a tutta la discendenza senza possibilità di ritorno. E a questo si deve aggiungere che utilizzando la tecnica chiamata “*gene drive*” (permette di portare le mutazioni di Crispr a entrambe le coppie di cromosomi di un individuo) i cambiamenti, indotti nel genoma, si possono estendere all’intera specie nel giro di poche generazioni. Sfruttando queste caratteristiche è stato proposto, ad esempio, di utilizzare Crispr per “eliminare le zanzare” o almeno alcune specie (come Zika in Sudamerica). Tutto questo oggi è tecnicamente possibile. Ma con quali conseguenze sull’ecosistema?

Nel marzo 2015 con un appello su *Nature* e *Science* due gruppi di scienziati hanno chiesto di porre un limite a questo tipo di ricerche con l’obiettivo di vietare la modifica della linea germinale in embrioni umani, in quanto “l’eugenetica è un rischio”, ha spiegato il Nobel **Paul Berg**. “L’umanità ha bisogno di diversità genetica e il metodo di procreazione tradizionale è il miglior metodo per garantirla. Vogliamo impedire ogni tentativo prematuro e sconsiderato di alterare la linea germinale dell’uomo”. Da qui è partita una richiesta di moratoria internazionale degli stessi scienziati contro l’uso di questo nuovo metodo sugli esseri umani. Molti paesi europei hanno già ratificato la convenzione per la protezione della dignità umana vietando la manipolazione del genoma di spermatozoi e uova per scopi non medici. Negli Stati Uniti invece questi interventi non sono proibiti. È necessaria però l’autorizzazione della Food&Drug Administration. Ma è soprattutto in Asia che la legislazione è carente.

L’accessibilità di Crispr è contemporaneamente un grosso punto di forza ma anche una grande minaccia, in quanto più è elevato il numero di strutture che può praticarlo e più sarà difficile controllarne il buon uso, in quanto il metodo consente con soli 4-5 tentativi (mentre prima erano necessari migliaia) di colpire con estrema precisione il gene che si vuole modificare. Tutto ciò non mette però al riparo da errori imprevedibili.



L’accessibilità di Crispr è allo stesso tempo un grosso punto di forza ma anche una grande minaccia, in quanto più è elevato il numero di strutture che può praticarlo e più sarà difficile controllarne il buon uso

Per saperne di più

Boroviak K, Doe B, Banerjee R, Yang F, Bradley A. *Chromosome engineering in zygotes with CRISPR-Cas9*. *Genesis* 2016;54:78-85

Charpentier E, Kaldy P. *L’enzima che rivoluziona la genetica*. *Le scienze* 2016; 772:28-35

Cyranoski D. *CRISPR gene-editing tested in a person for the first time*. *Nature News* 15 Nov 2016

Cyranoski D. *Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial*. *Nature* 2016;535:476-477 doi:10.1038/nature.2016.20302

Doudna J. *Genome-editing revolution: my whirlwind year with CRISPR*. *Nature* 2016;528 (7583):469-71. doi:10.1038/528469a. pmid 26701037

García-Tuñón I, Hernández-Sánchez M, Ordoñez JI, Alonso-Pérez V, Álamo-Quijada M, Benito R, Guerrero C, Hernández-Rivas JM, Sánchez-Martín M. *he CRISPR/Cas9 system efficiently reverts the tumorigenic ability of BCR/ABL in vitro and in a xenograft model of chronic myeloid leukemia*. *Oncotarget* 2017 Feb 9; doi: 10.18632/oncotarget.15215

Ge X, Xi H, Yang F, Zhi X, Fu Y, Chen D, Xu Rh, Lin G, Qu J, Zhao J, Gu F. *CRISPR/Cas9-AAV Mediated Knock-in at NRL Locus in Human Embryonic Stem Cells*. *Mol Ther Nucleic Acids* 2016;5:e393. doi: 10.1038/mtna 2016

Kaiser J. *A yellow light for embryo editing*. *Science* 17 Feb 2017;355 (6326):675

Liu T, Li Z, Zhang Q, De Amorim Bernstein K, Lozano-Calderon S, Choy E, Hornicek Fj, Duan Z. *Targeting abcb1 (mdr1) in multi-drug resistant osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system to reverse drug resistance*. *Oncotarget* 2016 Dec 13;7(50):83502-83513. doi: 10.18632/oncotarget. 13148

Liu T, Shen JK, Li Z, Choy E, Hornicek Fj, Duan Z. *Development and potential applications of CRISPR-Cas9 genome editing technology in sarcoma*. *Cancer Let* Apr 1 2016 ;373(1):109-18. doi, 2016

O’Prey J, Sakamaki J, Baudot Ad, New M, Van Acker T, Tooze Sa, Long Js, Ryan Km. *Application of CRISPR-Cas9 to autophagy research*. *Methods Enzymol* 2017;588:79-108. doi: 10.1016/bs.mie.2016.09.076, 2016

Reardon S. *First CRISPR clinical trial gets green light from us panel. The technique’s first test in people could begin as early as the end of the year*. *Nature News* (22 June 2016)

Salsman J, Dellaire G. *Precision genome editing in the CRISPR era*. *Biochem Cell Biol* Sep 29. doi: 10.1139/bcb-2016-0137, 2016

Su S, Zou Z, Chen F, Ding N, Du J, Shao J, Li L, Fu Y, Hu B, Yang Y, Sha H, Meng F, Wei J, Huang X, Liu B. *CRISPR-cas9-mediated disruption of pd-1 on human t cells for adoptive cellular therapies of ebv positive gastric cancer*. *Oncoimmunology* 2016 nov 22;6(1):e1249558. doi: 10.1080/2162402x.1249558, 2016

Wang X, Huang X, Fang X, Zhang Y, Wang W. *CRISPR-Cas9 system as a versatile tool for genome engineering in human cells*. *Mol Ther Nucleic Acids* 2016;5:e388. doi: 10.1038/mtna.2016.95, 2016 Williams Bo, Warman MI. *CRISPR-Cas9 technologies*. *J Bone Miner Res* 2017 feb 23. doi: 10.1002/jbmr.3086, 2017

Zhang Jp, Li Xi, Li Gh, Chen W, Arakaki C, Botimer Gd, Baylink D, Zhang L, Wen W, Fu Yw, Xu J, Chun N, Yuan W, Cheng T, Zhang Xb. *Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage*. *Genome Biol* 2017 feb 20;18(1):35. doi: 10.1186/s13059-017-1164-8, 2017

Zou Z, Chen F, Ding N, Du J, Shao J, Li L, Fu Y, Hu B, Yang Y, Sha H, Meng F, Wei J, Huang X, Liu B. *CRISPR-Cas9 mediated disruption of PD-1 on human T cells for adoptive cellular therapies of EBV positive gastric cancer*. *Oncoimmunology* 2016 Nov 22;6(1):e1249558

Video

What is CRISPR? feb 18, 2016; 273,488 views; by Bozeman Science

Genome Editing with CRISPR-Cas9 Nov 05, 2014; 974,834 views; by MCGovern Institute for Brain Research at MIT

How CRISPR lets us edit our DNA: Jennifer Doudna Nov 12, 2015; 307,785 views; by Ted

CRISPR - Cas9 Genome Editing System Feb 09, 2016; 21, 015 views; by Shomu’s Biology