

a cura di CARLO SBIROLI

Una tecnica innovativa che offre un maggior controllo nella correzione del DNA. Potrebbe intervenire nell'89 per cento delle 75mila varianti genetiche che causano malattie nell'uomo

PRIME EDITING

UN NUOVO STRUMENTO NEL CAMPO DELL'EDITING GENETICO



Come sempre avviene ad ogni nuova scoperta scientifica in campo genetico, si è ripresentato il dibattito sul rapporto tra ricerca ed etica

SI CHIAMA "PRIME EDITING". È la tecnica messa a punto da un team di ricercatori coordinati da David Liu del Broad Institute di Harvard e MIT di Cambridge in Massachusetts. Una tecnica che ha le potenzialità di correggere con precisione l'89% degli errori che conosciamo, presenti nel DNA, e che sono all'origine di malattie genetiche. I risultati, pubblicati sul numero di dicembre di *Nature*, hanno suscitato grande interesse nel mondo scientifico e clinico perché ampliano e migliorano il campo dell'editing genetico con notevoli vantaggi per la ricerca biologica e terapeutica. Ma, come sempre, quando si parla di manipolazione del genoma, anche questa volta sono sorti molti problemi etici. Alcuni ricercatori hanno addirittura proposto una pausa di riflessione "per capire se quel che si sta facendo migliorerà davvero la nostra esistenza".

LA PRIMA TECNICA DI EDITING GENETICO, definita CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9), che abbiamo imparato a conoscere nel 2012 con lo storico lavoro di Jennifer Doudna ed Emmanuelle Charpentier (vedi l'ampio aggiornamento su *Gynecoagoi* n. 2, pag. 19, 2017), aveva reso abbastanza facile intervenire sul DNA.

CRISPR/Cas9 era uno strumento di editing che si basava sul taglio di entrambi i filamenti della doppia elica del DNA. Il taglio veniva fatto sul punto specifico del genoma che si voleva modificare. Questa procedura si realizzava utilizzando l'enzima Cas9 (soprannominato "forbice molecolare") che era in grado di riconoscere e "tagliare" la sequenza errata di basi. Una volta avvenuto il taglio, la cellula metteva in atto i suoi normali meccanismi di autoriparazione ricongiungendo i filamenti della doppia elica. Questo sistema però si mostrò imperfetto e non sempre affidabile, perché nel punto in cui il genoma veniva tagliato spesso si inserivano elementi estranei che potevano introdurre o eliminare nucleotidi, determinando così errori di vario tipo. Tutto questo costituiva un grave ostacolo, soprattutto nei casi in cui s'interveniva in malattie che richiedevano non solo la rimozione del gene difettoso, ma anche l'inserimento di una sua copia corretta.

NEL 2016 LA METODICA CRISPR FECE UN GROSSO PASSO AVANTI. Un lavoro di David Liu, pubblicato su *Nature*, descrisse la tecnica definita *editing di base*. In sintesi, questa procedura non tagliava i due filamenti del DNA ma



utilizzava la metodica CRISPR per trasferire un enzima agiuntivo sul sito-target del genoma, dove trasformava un singolo nucleotide in un altro. In altri termini, la classica tecnica del “taglia e cuci”, descritta per CRISPR/Cas9, veniva sostituita da un correttore, paragonabile ad una “matita per correggere i refusi”. La matita, fuor di metafora, corrispondeva ad una funzione enzimatica (deaminasi), in grado di sottrarre gruppi chimici alle lettere del DNA, riuscendo a convertire un tipo in un altro. In questo modo la metodica dell’*editing di base* correggeva la sequenza errata sul DNA senza tagliare i filamenti della doppia elica. Venivano così evitati tutti quegli errori e imprecisioni legati ai meccanismi di autoriparazione della cellula, descritti in precedenza per la CRISPR/Cas9 e, nello stesso tempo, si otteneva un maggior controllo della correzione di DNA. Però anche questa tecnica presentava dei limiti perché introduceva spesso mutazioni fuori bersaglio (off-target).

LA NUOVA METODICA PRIME EDITING, messa a punto recentemente dal team di David Liu, amplia le potenzialità della CRISPR e mostra una maggiore versatilità e precisione rispetto ai due precedenti sistemi di editing del genoma. **Utilizza l’enzima Cas9**, modificato, per tagliare solo un filamento per volta dell’elica del DNA e usa un RNA (pegRNA) che contiene già la mutazione desiderata (vedi box “Come funziona Prime Editing”). Tutto questo permette di avere più controllo sulle correzioni e più precisione, rendendo questa tecnica più affidabile ed efficiente rispetto alle altre.

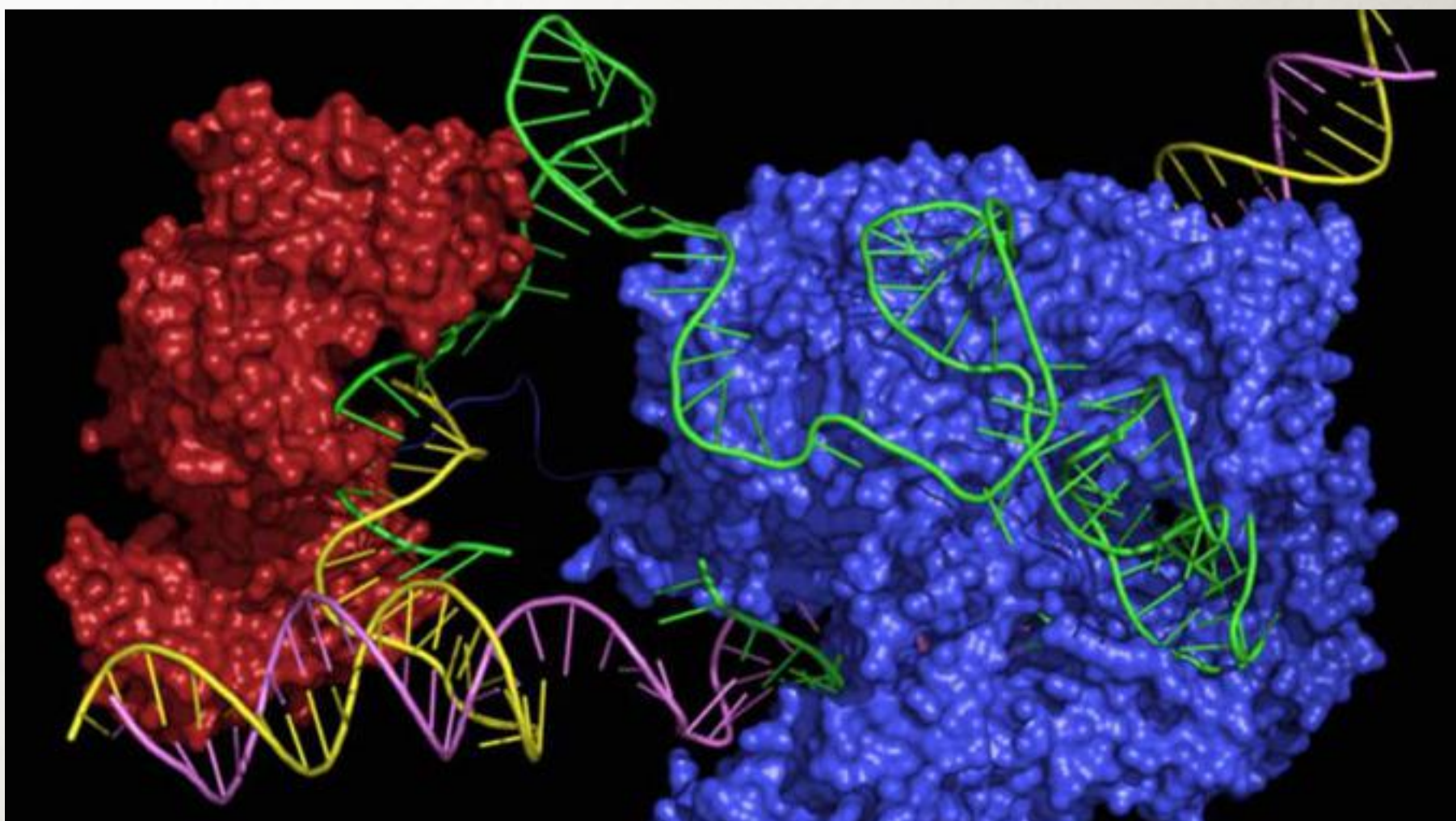
Segue a pagina 20



La nuova metodica Prime Editing, messa a punto recentemente dal team di David Liu, amplia le potenzialità della CRISPR e mostra una maggiore versatilità e precisione rispetto ai due precedenti sistemi di editing del genoma

Modello di Prime editing

Enzima Cas9 (blu), enzima Trascrittasi Inversa (rosso), pegRNA (verde). I due filamenti del DNA da modificare sono in giallo e viola (P. Randolph e A. Anzalone, nov. 2019)



LA TECNICA

Come funziona



Editing di base - correzione della sequenza errata su uno dei due filamenti del DNA senza il taglio della doppia elica

Il Prime Editing modifica il DNA copiando direttamente nuove informazioni genetiche sul sito-target. Rispetto alle altre metodiche CRISPR riduce il numero di modifiche indesiderate sul genoma che si vuole correggere.

Il Prime Editing è composto fondamentalmente da tre elementi:

Case9 - è la stessa nucleasi che veniva utilizzata nel classico sistema CRISPR (fig. 1). Ora, nel Prime Editing questo enzima viene modificato in modo da tagliare solo uno dei due filamenti della doppia elica del DNA.

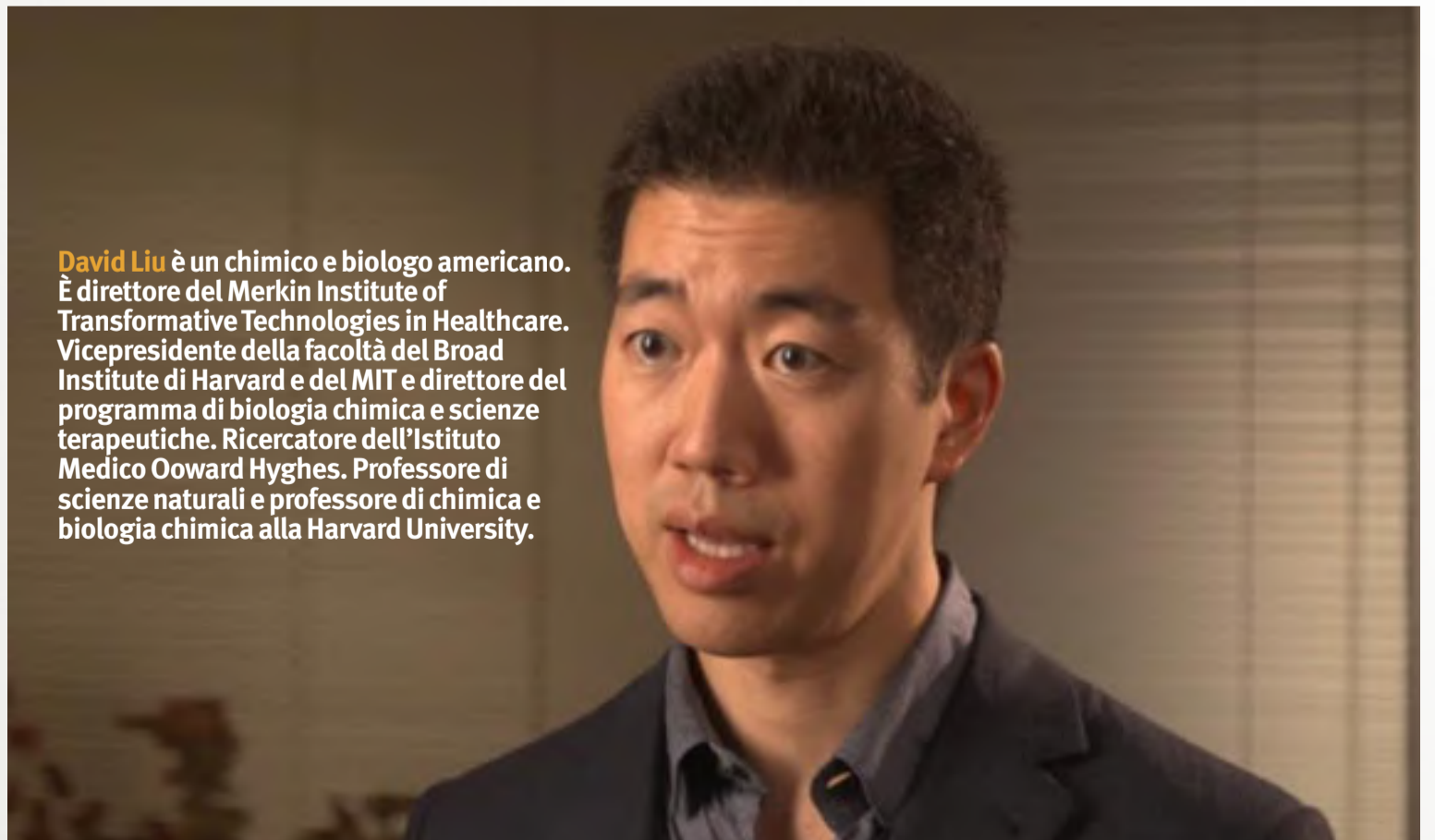
Trascrittasi Inversa (RT) - è un enzima in grado di sintetizzare DNA. Si caratterizza perché è in grado di utilizzare l'RNA come "modello" di partenza per formare la molecola di DNA corrispondente. Come tutte le polimerasi richiede però un frammento di DNA o di RNA per poter iniziare la reazione di polimerizzazione.

pegRNA (Prime Editing Guide RNA) - Può essere definito un "RNA guida" (fig. 2). È un frammento di RNA costituito da due componenti: 1) la *Binding region* che individua il punto esatto del DNA su cui si vuole intervenire; 2) *Edited sequence* è la parte di RNA codificato, corrispondente al DNA che si desidera inserire.



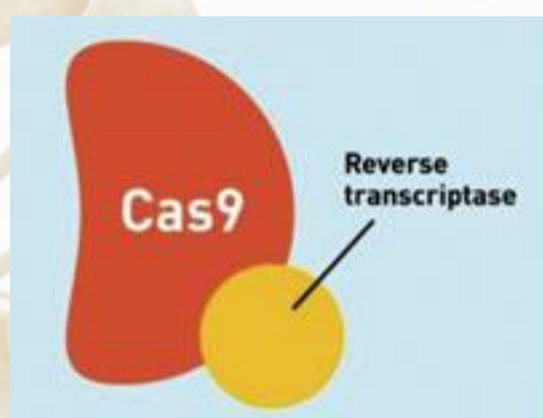
David Liu: "Avevamo delle forbici per tagliare le parti che non piacevano. Poi ci siamo dotati di una matita per fare piccole correzioni. Ora abbiamo un word processor con la funzione trova e sostituisci"

David Liu è un chimico e biologo americano. È direttore del Merkin Institute of Transformative Technologies in Healthcare. Vicepresidente della facoltà del Broad Institute di Harvard e del MIT e direttore del programma di biologia chimica e scienze terapeutiche. Ricercatore dell'Istituto Medico Ooward Hyghes. Professore di scienze naturali e professore di chimica e biologia chimica alla Harvard University.

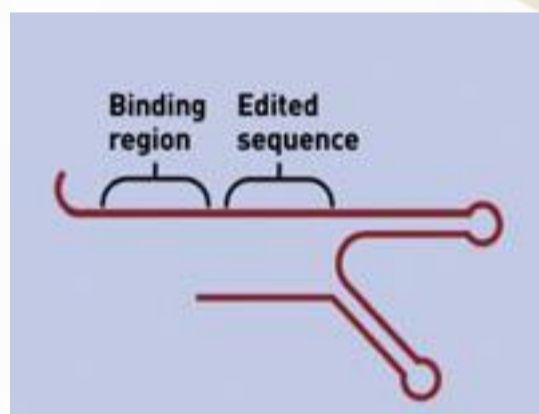


il Prime Editing

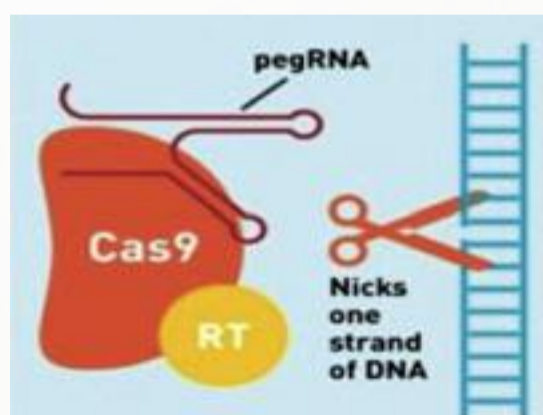
- 1** **Complesso Cas9 - Trascrittasi Inversa** comprende l'enzima *Cas9*, modificato per tagliare solo uno dei due filamenti di DNA e l'enzima *Trascrittasi Inversa* che può generare nuovo DNA copiando un modello di RNA



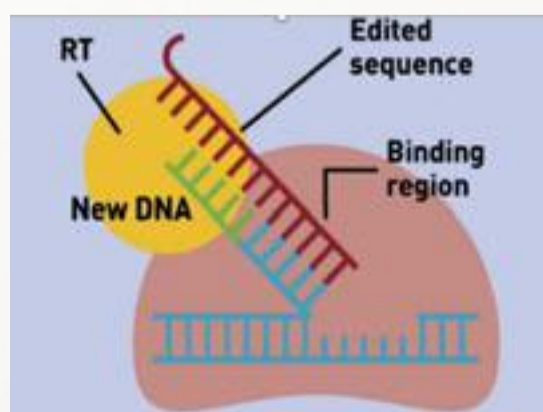
- 2** Le due componenti del **pegRNA**: *Binding region* lega il complesso Cas9-RT al DNA e la *Edited sequence* che codifica la modifica che si vuole apportare al DNA



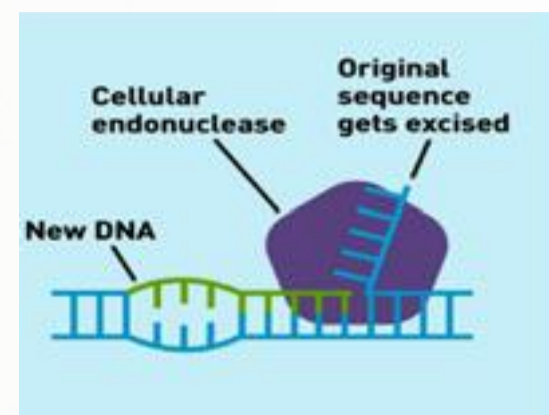
- 3** La **pegRNA** ingegnerizzata guida il complesso Cas9-RT alla zona del genoma che si vuole correggere. Una volta posizionato sul DNA, l'enzima Cas9 taglia uno solo dei due filamenti del DNA, che verrà utilizzato dall'RT come modello per sintetizzare il DNA



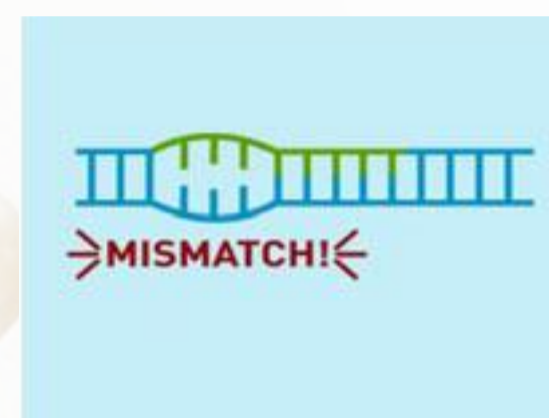
- 4** Una volta avvenuto il taglio sul filamento del DNA da parte della nucleasi Cas9, la RT utilizza l'altra estremità del pegRNA (in rosso) stesso come modello per **sintetizzare il DNA** (New DNA, in verde)



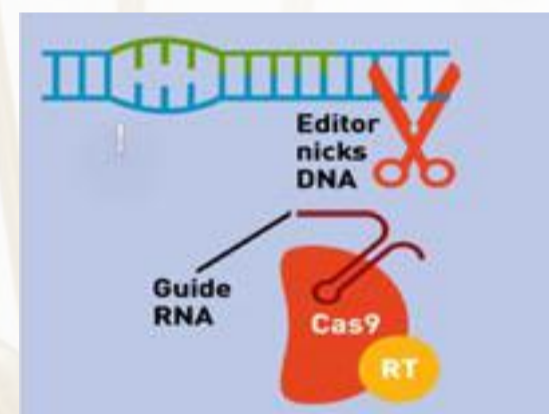
- 5** Il frammento del DNA originale, ormai inutilizzabile, viene rimosso dalle **Endonucleasi** prodotte dalla stessa cellula. Si ha in questo modo una molecola di DNA in cui i due filamenti del genoma non sono uguali, poiché uno è originale, l'altro ha subito una modifica



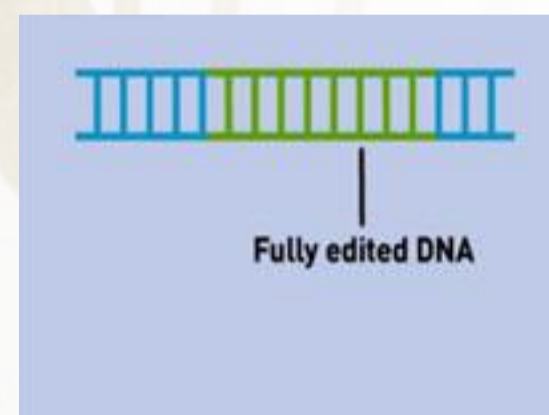
- 6** Il risultato di questa prima fase del processo Prime Editing porta alla formazione di una molecola di DNA con una posizione non corrispondente tra le due catene, che i biologi chiamano **Mismatch**. La zona del DNA dove si è intervenuto ha un filamento modificato (in verde), l'altro è invece un filamento originale, non modificato



- 7** Per risolvere il mismatch, favorendo la permanenza della correzione apportata su uno dei due filamenti, una **diversa RNA-guida** dirige il **prime editing** (editor) a tagliare il filamento non modificato, poco lontano dal punto dell'intervento



- 8** Il taglio prodotto da Cas9 sul secondo filamento stimola i processi di riparazione cellulare, che utilizzerà il filamento corretto come modello per riparare il DNA. In tal modo il DNA originale della cellula viene modificato come desiderato



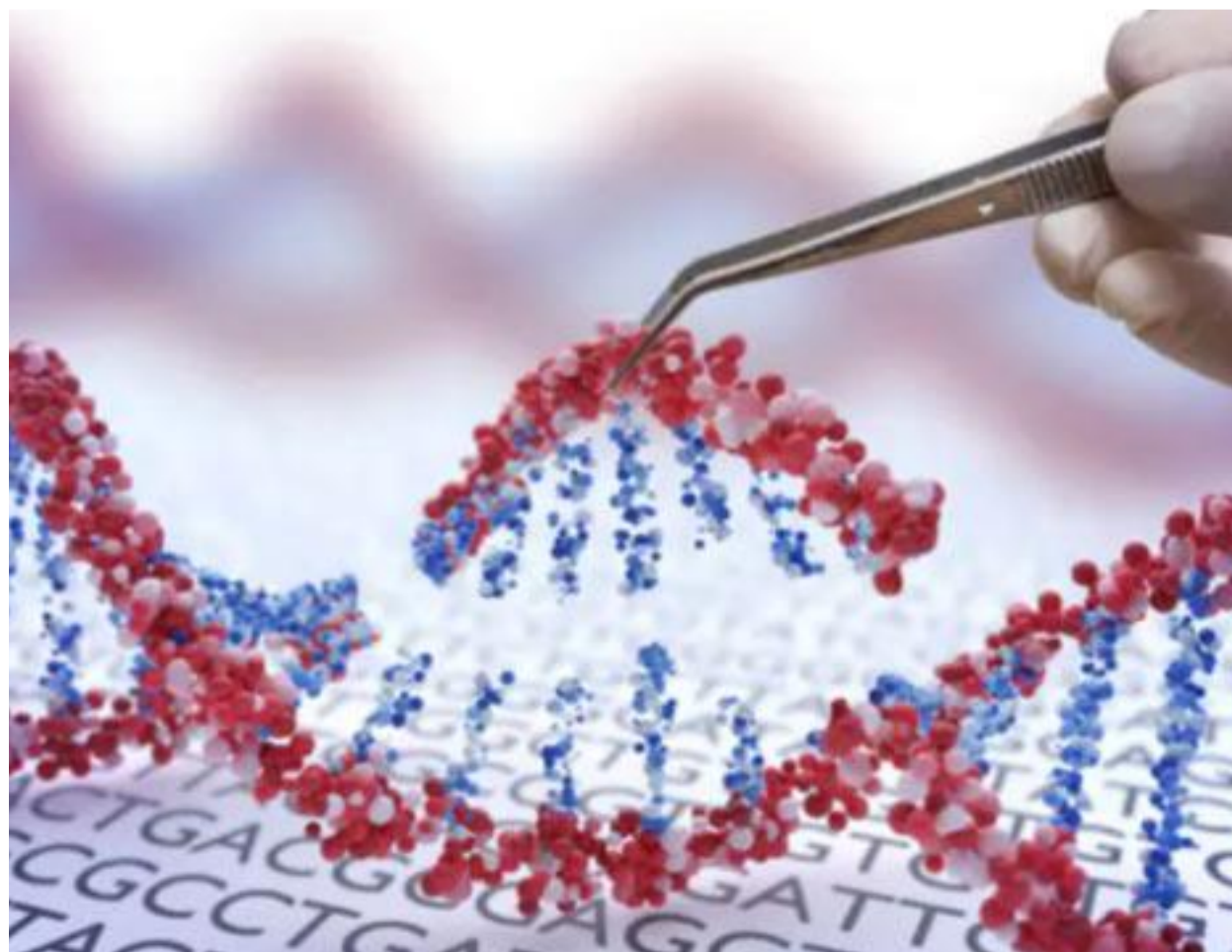
Nella conferenza stampa organizzata da *Nature* per la pubblicazione del relativo articolo, **David Liu** ha sintetizzato così i vantaggi della nuova tecnica: “Avevamo delle *forbici* per tagliare le parti che non piacevano. Poi ci siamo dotati di una *matita* per fare piccole correzioni. Ora abbiamo un *word processor* con la funzione *trova e sostituisci*. Questo permette di individuare esattamente il punto del DNA dove intervenire e quale nuova sequenza di lettere scambiare con quella originale”.

IL PRIME EDITING HA LA POSSIBILITÀ DI CORREGGERE L'89% DELLE 75.000 VARIANTI GENETICHE NOTE CHE CAUSANO MALATTIE NELL'UOMO. La sua applicazione su colture di cellule umane e di topo ha mostrato di poter determinare 175 diverse correzioni del codice genetico senza errori o imprecisioni. Inoltre, utilizzando questa tecnica, il team di Liu è riuscito a rimuovere i quattro nucleotidi di troppo che causano la malattia di Tay-Sachs, una rara condizione che causa ritardo mentale, cecità e che di solito è letale nell'infanzia. E gli stessi ricercatori sono intervenuti con ottimi risultati anche sulle mutazioni che sono all'origine dell'anemia falciforme. Il mondo scientifico ha accolto favorevolmente e con entusiasmo questo studio del gruppo del Broad Institute. “Ora è importante capire come cambierà la genetica”, ha dichiarato Fyodor Usov, direttore scientifico dell'Innovative Genomics Institute di Berkeley in California, “e, soprattutto, quali vantaggi si avranno in medicina oltre che in altri settori, come ad esempio in agricoltura”. Intanto, come sempre avviene ad ogni nuova scoperta scientifica in campo genetico, si è ripresentato il dibattito sul rapporto tra ricerca ed etica. Anche questa volta si sono levate voci, ancora timide, contro una tecnologia sempre più spinta all'estremo, senza limiti e con una possibile deriva eugenetica. “Prima che si possa anche soltanto pensare di testare il Prime Editing sull'uomo, occorrerà valutarne la sicurezza su nuove colture cellulari e su altri organismi viventi”, ha dichiarato David Liu nella conferenza stampa di *Nature*. “Questo primo studio è l'inizio, e non la conclusione, di un'aspirazione di lungo corso nelle scienze della vita, quella di poter effettuare qualunque variazione del DNA in una qualunque posizione di un organismo”. Ha continuato dicendo, “questa metodica andrà convalidata in molti laboratori su tanti tipi diversi di cellule e di modifiche genetiche, prima di capire dove può arrivare. Questo è l'inizio, non la fine, della lunga aspirazione della biologia a introdurre ogni tipo di modifica in qualsiasi posizione di una cellula”.

È molto probabile che tutto quello che è stato ottenuto finora è solo la punta di un iceberg. La rivoluzione CRISPR, iniziata nel 2012, non è ancora finita. “Questo studio è solo il primo passo lungo la strada che porta verso il raggiungimento di una delle aspirazioni più alte delle scienze della vita”, racconta David Liu. “Essere cioè in grado di apportare qualsiasi modifica al DNA, in qualsiasi posizione e in qualsiasi organismo”. Buona fortuna Dr. Liu!

“

È molto probabile che tutto quello che è stato ottenuto finora è solo la punta di un iceberg. La rivoluzione CRISPR, iniziata nel 2012, non è ancora finita. “Questo studio è solo il primo passo lungo la strada che porta verso il raggiungimento di una delle aspirazioni più alte delle scienze della vita



PER SAPERNE DI PIÙ

Anzalone AV, Randolph R, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, Chen PJ, Wilson C, Newby GA, Raguram A, Liu DR: *Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA*. *Nature* 576, 149-157, 2019.

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

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

Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J., Zhang F.: *RNA editing with CRISPR-Cas13*. *Science* 358, 1019-1027, 2017.

Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B, Taipale J: *CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response*. *Nat. Med.* 24, 927-930, 2018.

Hu JH, Miller SM, Geurts MH, Tang W, Chen L, Sun N, Zeina CM, Gao X, Rees HA, Lin Z, Liu DR: *Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity*. *Nature* 556, 57-63, 2018.

Kim YB, Komor AC, Levy JM, Packer MS, Zhao KT, Liu DR: *Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions*. *Nat. Biotechnol.* 35, 371-37, 2017.

Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR: *Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage*. *Nature* 533, 420-424, 2016.

Kosicki M, Tomberg K, Bradley A: *Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements*. *Nat. Biotechnol.* 36, 765-771, 2018.

Shen MW, Arbab M, Hsu Jy, Worstell D, Culbertson SJ, Krabbe O, Cassa CA, Liu DR, Gifford DK, Sherwood RI: *Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants*. *Nature* 563, 646-65, 2018.

Thuronyi BW, Koblan LW, Levy JM, Yeh WH, Zheng C, Newby GA, Wilson C, Bhaumik M, Shubina-Oleinik O, Holt JR, Liu DR: *Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity*. *Nat. Biotechnol.* 37, 1070-1079, 2019.