

CORSO DI LAUREA
SCIENZE BIOLOGICHE

Le promesse e la sfide del genome editing terapeutico

Tesi di Laurea di:
Samuel Rozsasi

Docente Referente
Chiar.mo Prof.ssa:
Anna La Teana

DIPARTIMENTO
SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE



UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

Sessione Autunnale
Anno Accademico 2020/2021



CRISPR-Cas nei procarioti



SISTEMA ADATTATIVO IMMUNITARIO NEI PROCARIOTI

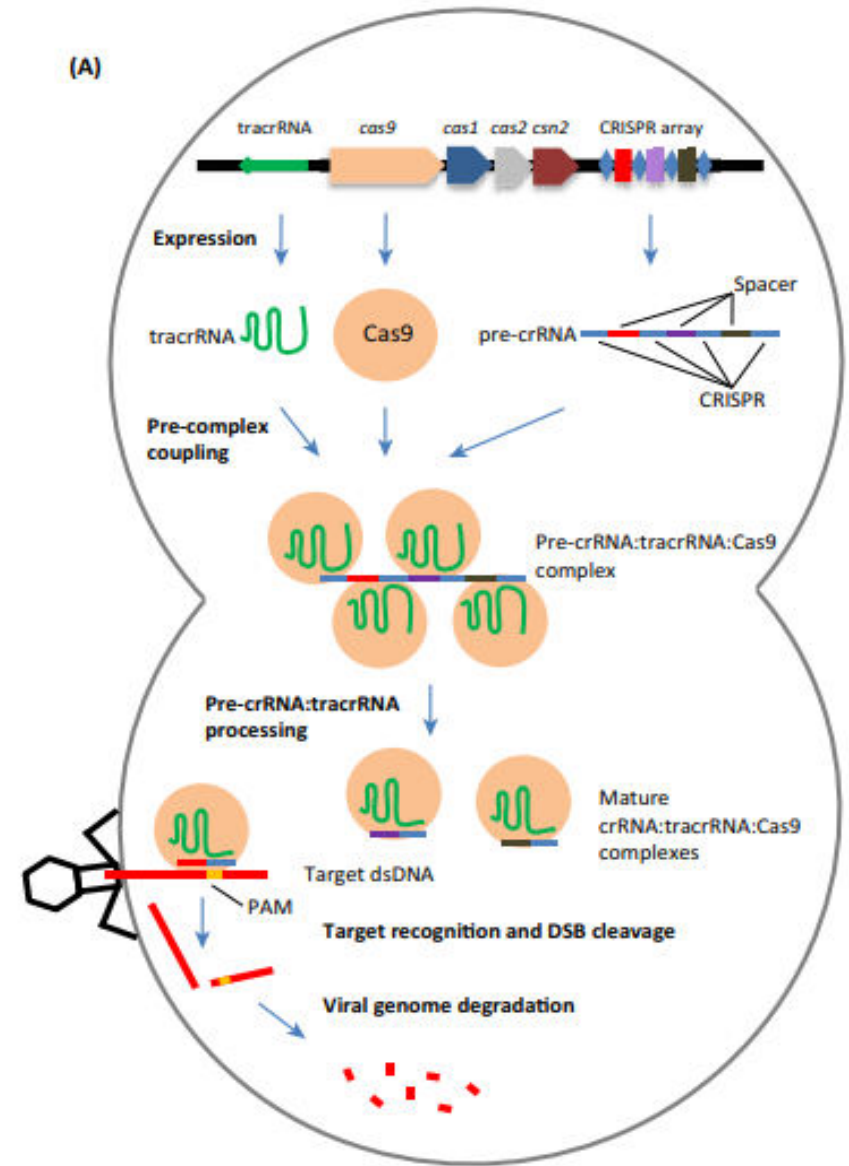


figura 1. Mojica et al. 2016

PRIME NUCLEASI SEQUENZA SPECIFICHE

- Zinc finger nucleases (ZFNs)
- Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)

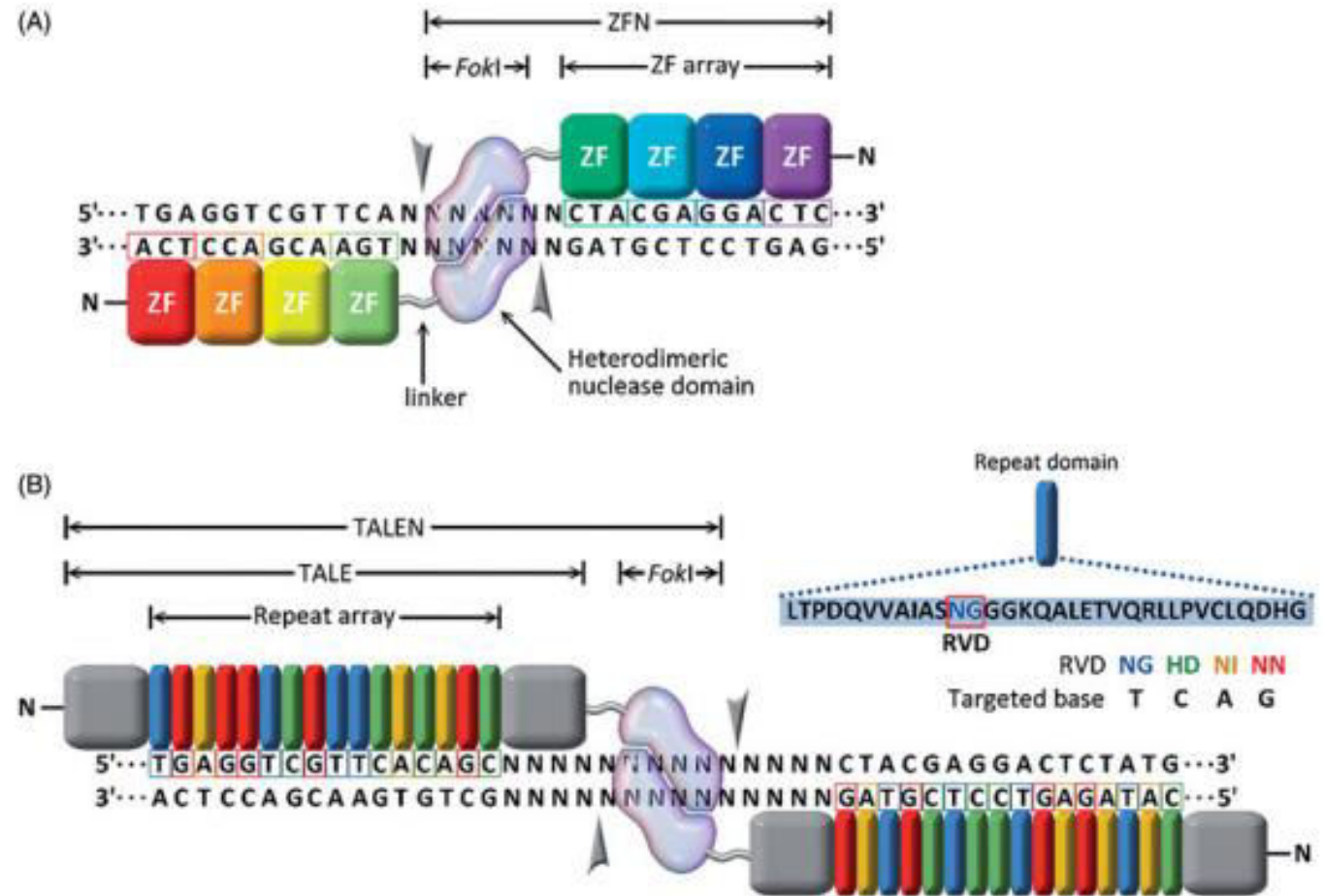


figura 2. Endonucleasi sito-specifiche fuse con proteine programmabili per legare il DNA: (A) ZFN (B) TALENS

(Lino et al, 2018)

CRISPR-CAS: MECCANISMO D'AZIONE

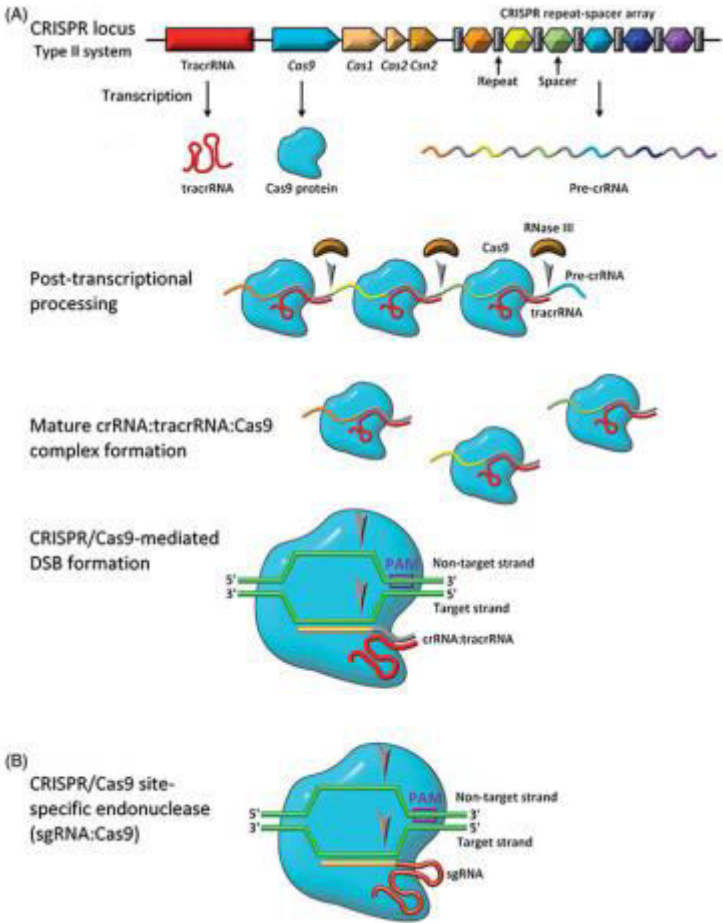


Figura 3. Meccanismo d'azione del sistema CRISPR/Cas 9 (Lino et al, 2018)

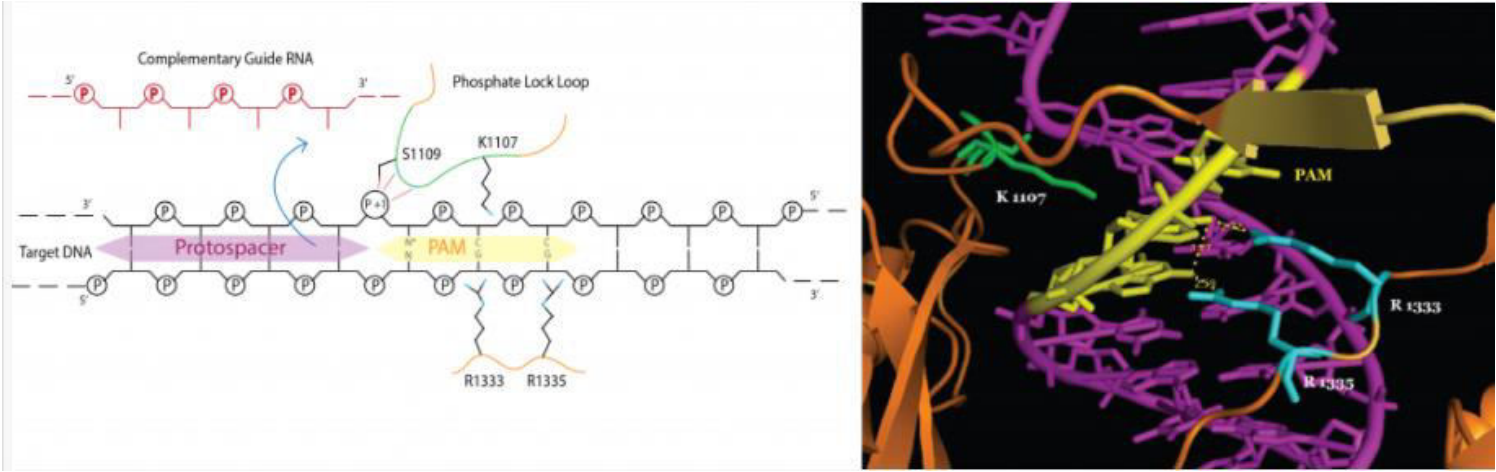


Figura 4. Legame PAM e legame Phosphate Lock Loop (Anders et al, 2014)

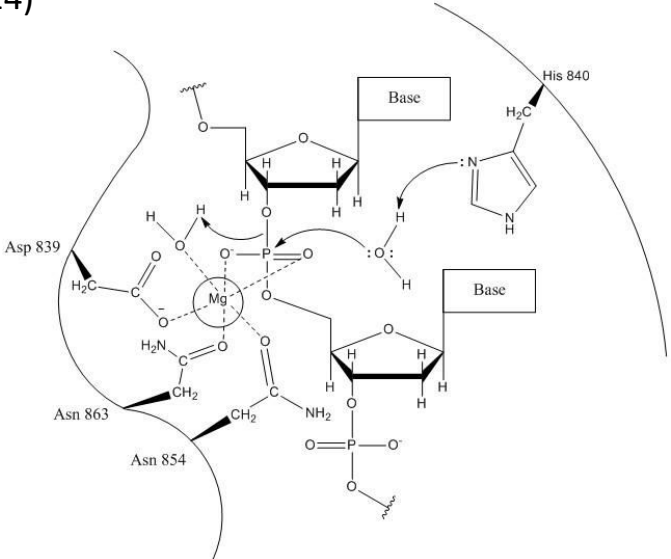


Figura 5. <https://sites.tufts.edu/crispr/crispr-mechanism/hnh-nuclease/>

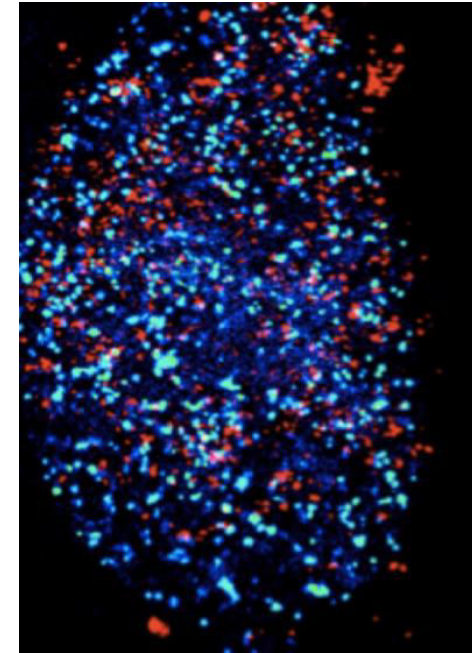
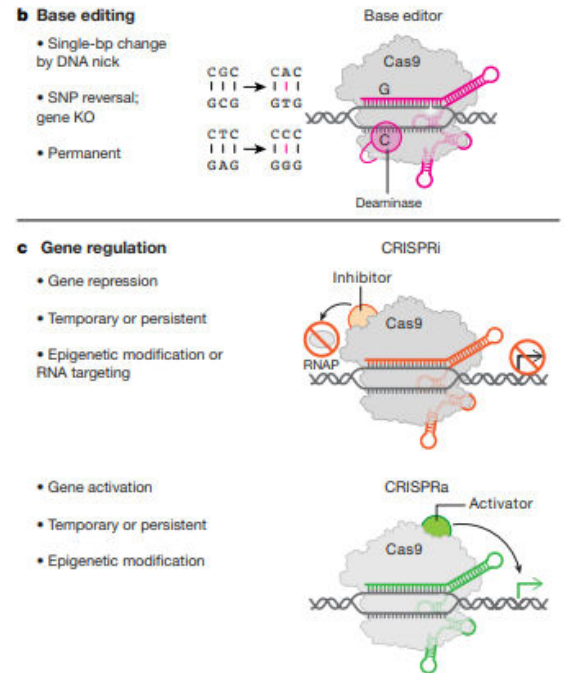
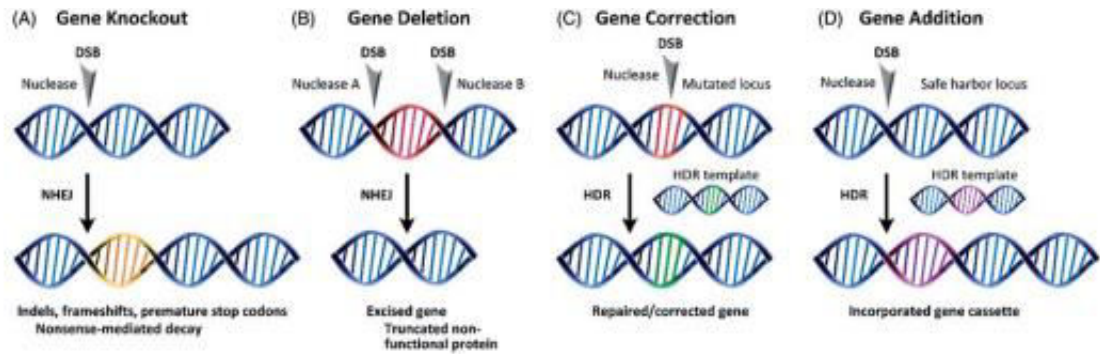


Figura 8. CASFISH dCas

Figura 6-7. Prodotti del gene editing (Lino et al, Doudna 2018)

CRISPR PER IL GENE EDITING

APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DEL GENOME EDITING

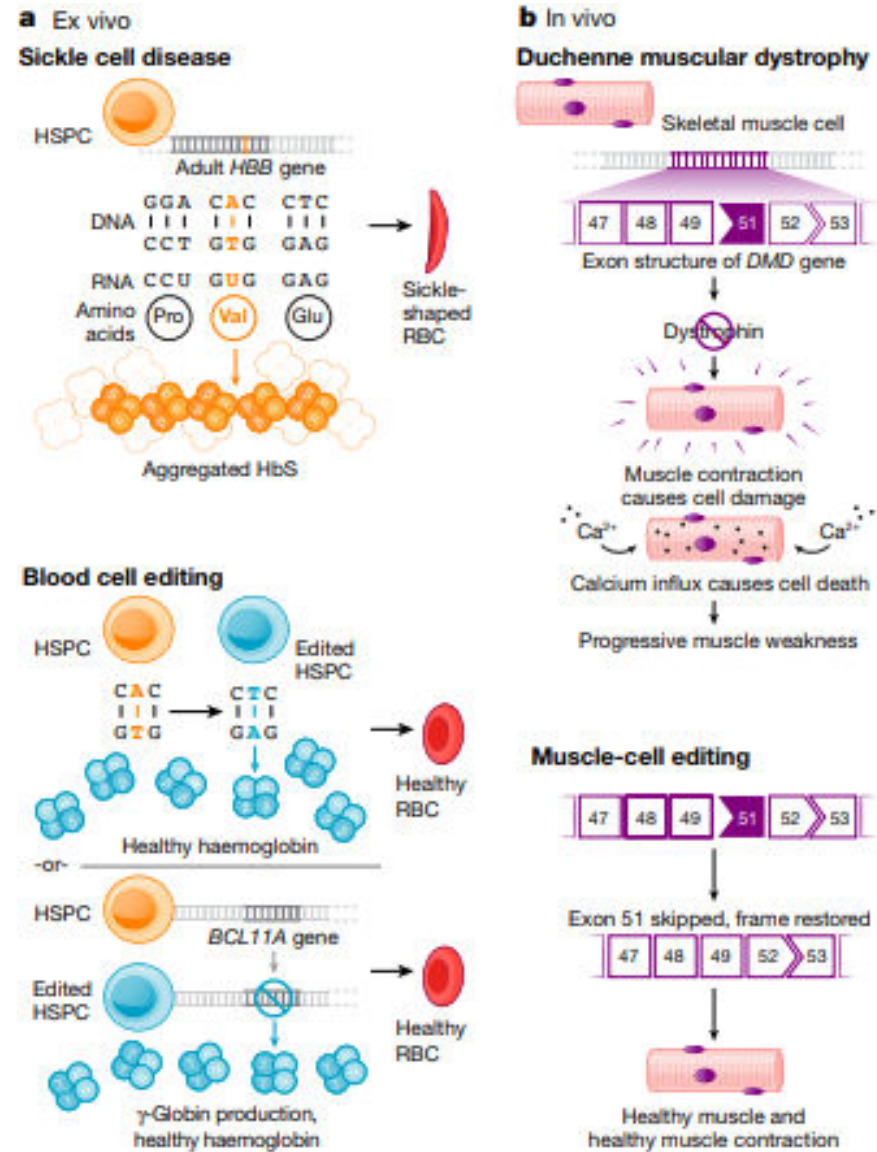


Figura 9. Trattamento genome editing somatico (Doudna 2020)

TRASPORTO TESSUTO-SPECIFICO

CARGOs:

- **plasmide** che codifica sia per la proteina Cas9 e la guida RNA
- **mRNA** per la traslazione di Cas9 e guida RNA
- la proteina Cas9 con la guida RNA, **RNP**.

SISTEMI DI «DELIVERY»:

- **Somministrazione fisica** (microiniezione, elettroporazione)
- **vettori virali** (AAVs, adenovirus, lentivirus)
- **vettori non virali** (nanoparticelle lipidiche, CPP's , DNA nanoclews)

PHYSICAL DELIVERY

MICROINIEZIONE

- Gold standard
- *Ex vivo e in vitro*
- No limitazioni da carico

ELETTROPORAZIONE

- *In vitro*
- Nucleofezione
- Carico limitato a decine di nm

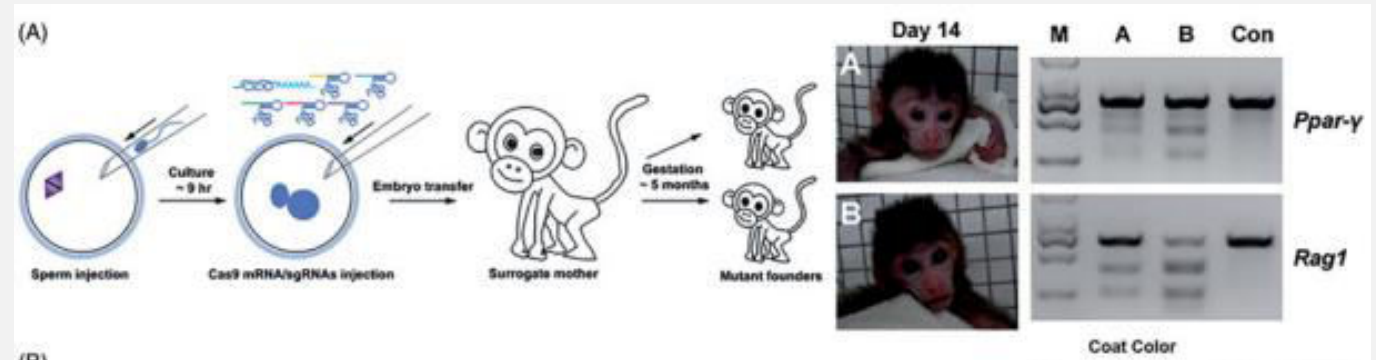


Figura 10. Microiniezione con rottura di due geni con una singola microiniezione nello stadio di embrione con una sola cellula (Lino et al, 2018)

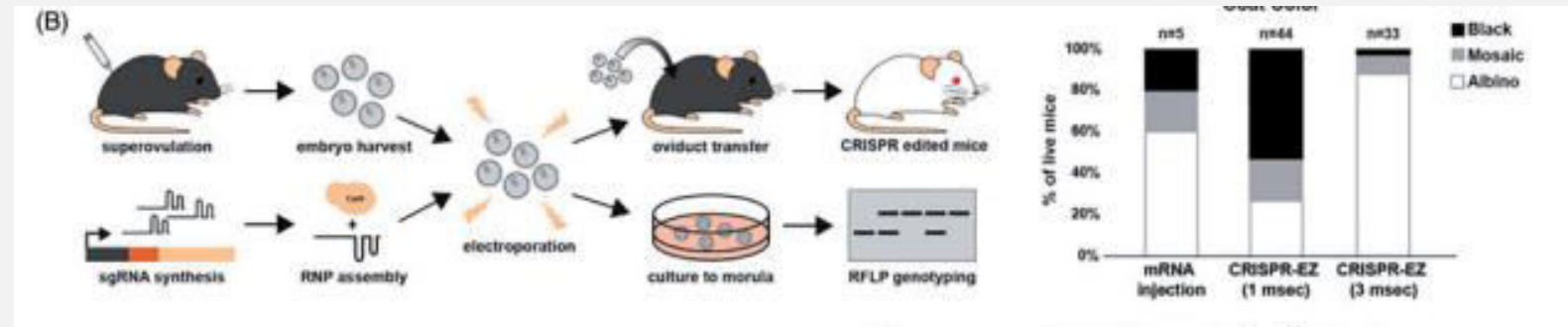


Figura 11. Elettroporazione con CRISPR RNP sul gene che determina la colorazione del topo, confronto effetto dopo 1 ms e 3ms (Lino et al, 2018)

VETTORI VIRALI

AAVs (Adeno-associated virus):

- DNA plasmidico come cargo
- 4.5-5 kb di capacità
- Immunogenicità minima

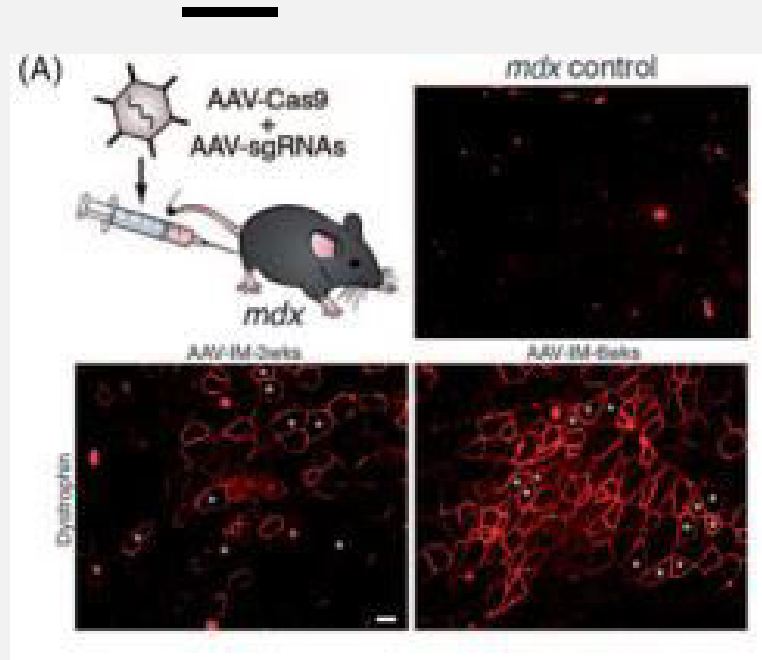


Figura 12. AAV delivery of Cas9 e sgRNAs che rompe la mutazione del gene *dmd* di topo, con miglioramento sia funzionale si biochimico (Long et al. 2016)

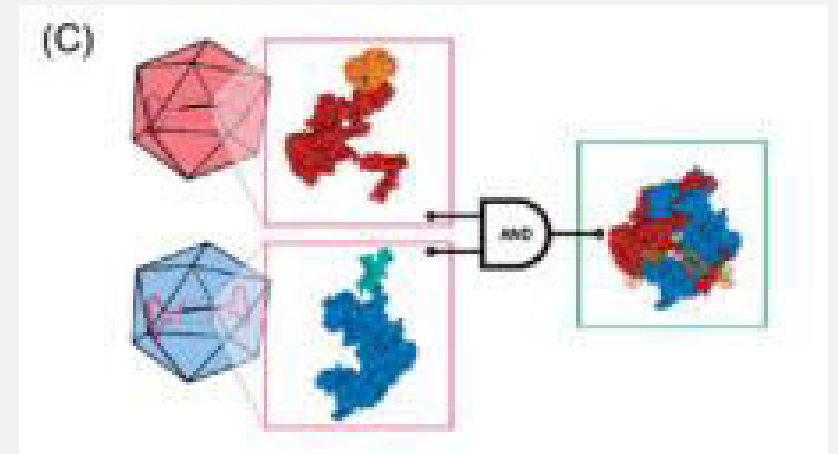


Figura 13. Sistema Cas9 separato nella parte C-terminale e N-terminale ed impacchettati in due AAV separati (Truong et al. 2015)

VETTORI NON VIRALI

PARTICELLE LIPIDICHE/LIPOSOMI

- *In vivo* , *ex vivo* , *in vitro*
- No problemi con il sistema immunitario
- Cas9:sgRNA RNP , mRNA (Cas9+sgRNA)
- Lipofectamine

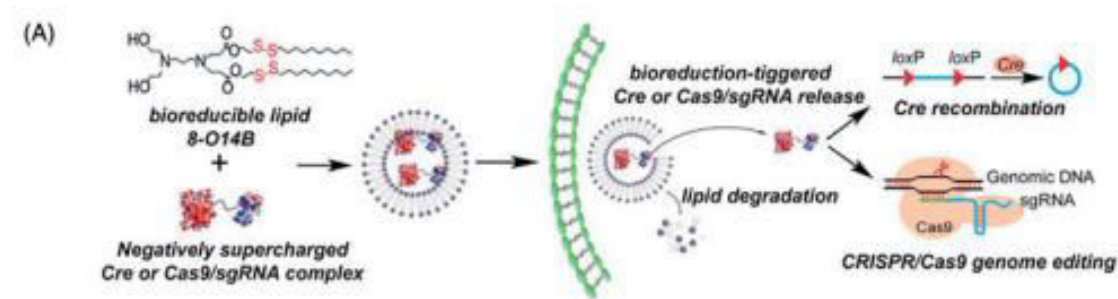


Figura 14. Nanoparticella bioriducibile e complesso Cas9:sgRNA si assemblano elettrostaticamente in un'unica nanoparticella (Wang et al. 2016)

CONCLUSIONI

- Criticità etiche (linea germinale VS linea somatica)
- Effetti Off-targets → aumentare specificità e precisione
- Possibilità di creare organismi modello per studi
- Xenotrapianti

BIBLIOGRAFIA

- On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals F.Mojica et al.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.005>
- Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches A.Lino et al.
<https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
- The promise and challenge of therapeutic genome editing J.Doudna
[The promise and challenge of therapeutic genome editing | Nature](#)
- <https://sites.tufts.edu/crispr/>

RIASSUNTO

Il sistema CRISPR-Cas da quando è stato conosciuto ed ingegnerizzato , viene studiato in molti laboratori del mondo, per aver la capacità di riconoscere una sequenza specifica, tagliarla e modificare il DNA . Questo meccanismo è stato inizialmente individuato in procarioti come sistema adattativo immunitario , utile per proteggersi da infezioni da parte di batteriofagi. La sua capacità peculiare di riconoscere una zona sequenza-specifica è stata utilizzata per sostituire le precedenti nucleasi (ZFNs e TALENs) per il genome editing. Attraverso lo studio del meccanismo di azione in natura si è potuta produrre una guida a RNA (sgRNA) che mobilita il sistema verso una sequenza preferenziale dove si vuole agire.

Però questo meccanismo ancora non è così preciso , provoca a volte mutazioni off-targets non prevedibili , richiede quindi uno studio più approfondito. I problemi sorgono per quanto riguarda il trasporto del sistema tessuto-specifico , a volte facilitato dalla possibilità di lavorare in vitro o ex vivo , le soluzioni in vivo risultano ancora difficoltose .

Nonostante ciò, le aspettative future sono molto ambiziose, poiché vi è la potenzialità di applicare questo sistema per quanto riguarda malattie monogeniche(corea di Huntington, fibrosi cistica, anemia falciforme, distrofia muscolare di Duchenne, HIV) e creare modelli di laboratorio (animali, piante) .