



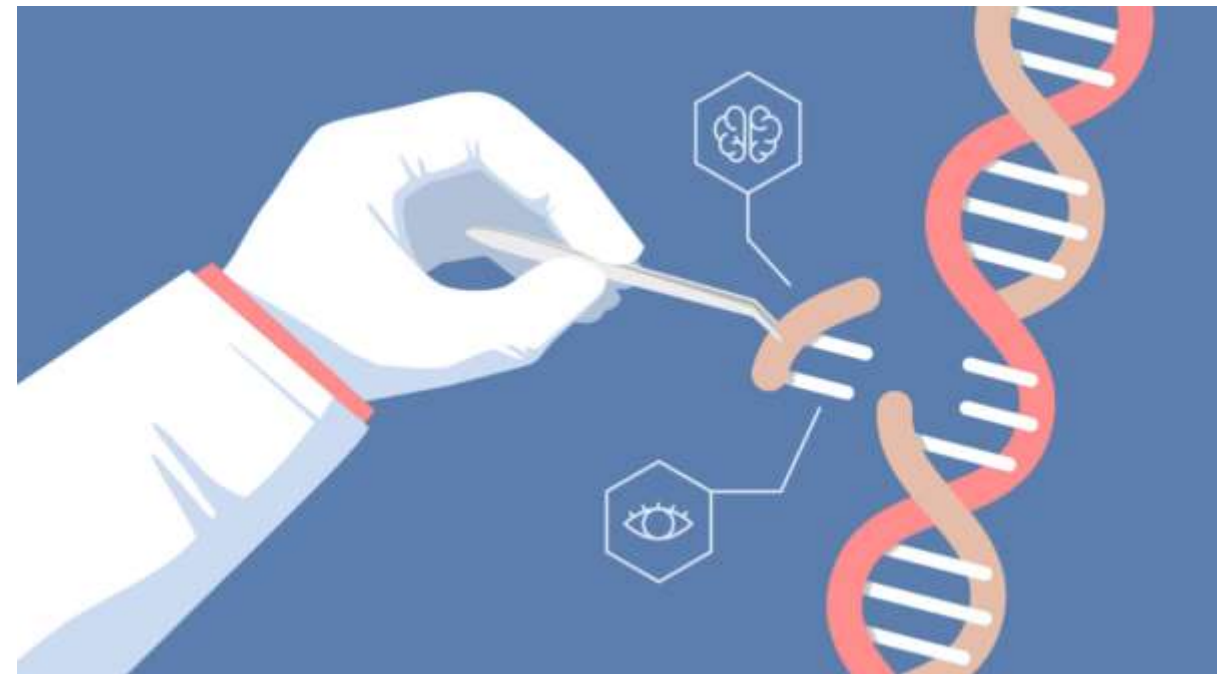
UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

Dipartimento di scienze della vita e
dell'ambiente

CRISPR-CAS9 E LA RIVOLUZIONE DELL'EDITING GENOMICO

CRISPR-CAS9 AND THE GENOME EDITING REVOLUTION

Laureando:
Ottaviani Michael



(1)

Docente referente:
Prof. Marco Barucca

CHE COS'È CRISPR

- **“Clustered regularly interspaced short palindromic repeats”**
- **gRNA + Proteina Cas**
- **Cas9:** Enzima endonucleasi del DNA con RNA guida, presente in *Streptococcus Pyogenes* e altri batteri. Importante strumento in applicazioni di ingegneria genetica.

CLASSIFICAZIONE DEI SISTEMI CRISPR

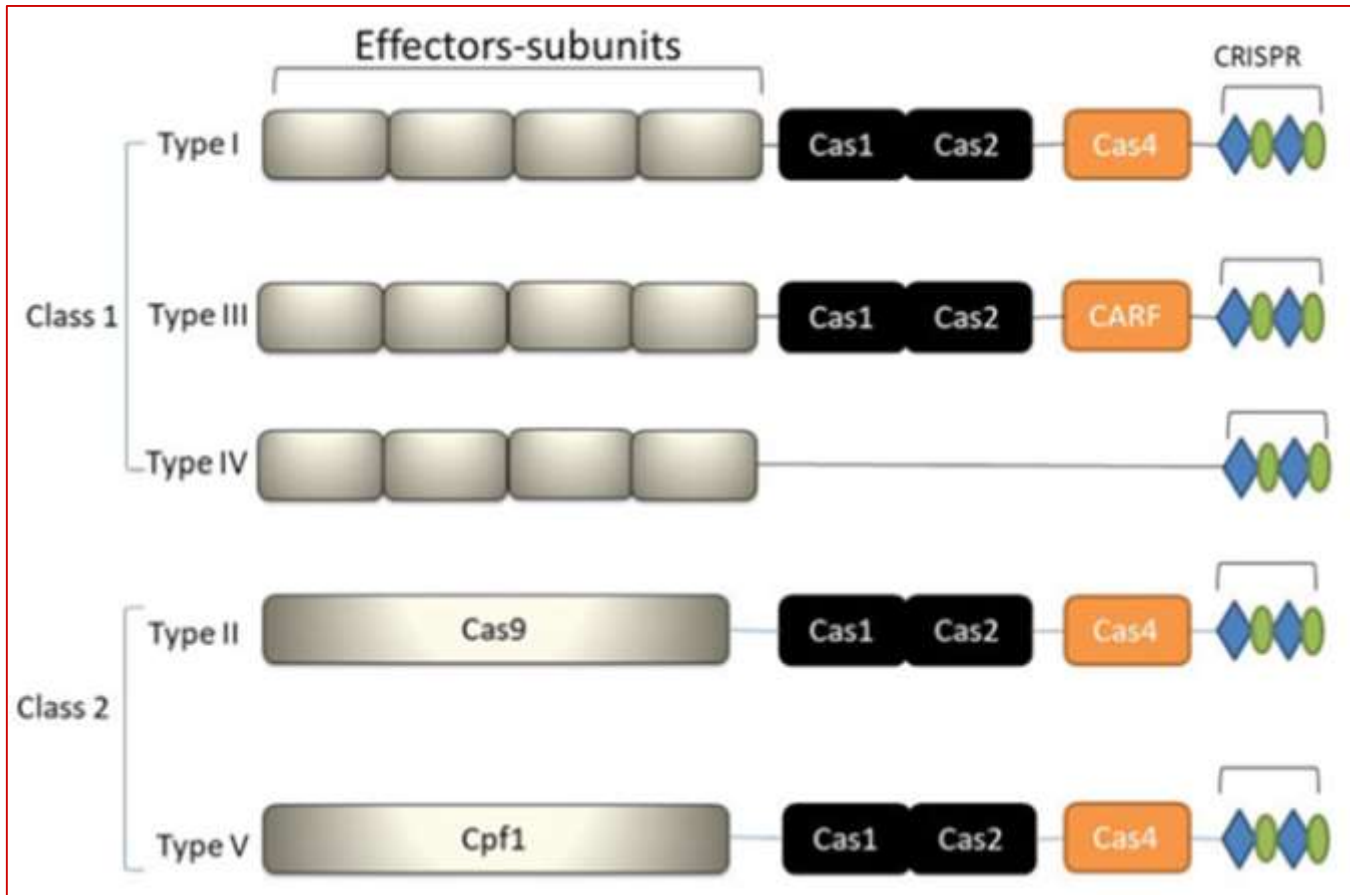


Figura 2

Meccanismo d'azione di CRISPR nei batteri

4 Fasi:

1 Organizzazione

2 Adattamento

3 Espressione

4 Interferenza

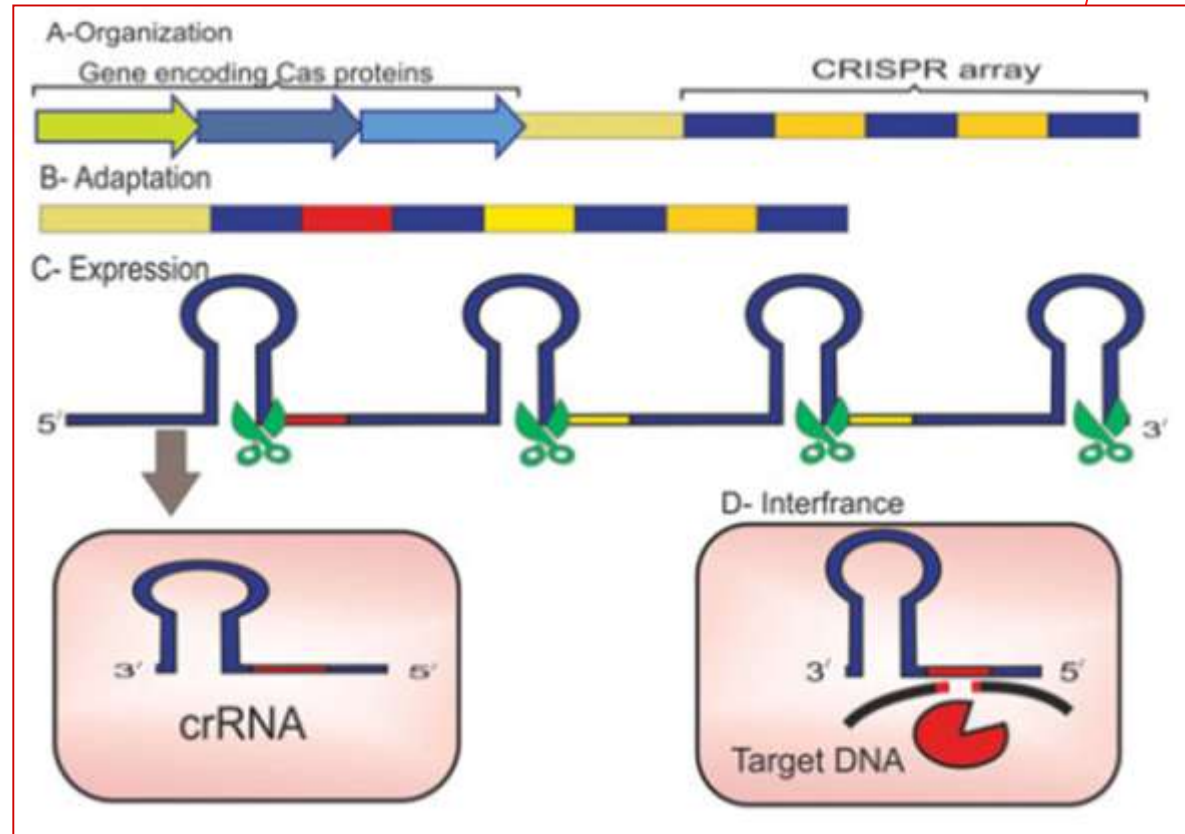


Figura 3

Applicazioni in terapia genica

TALEN

(Transcription activator-
like effector nuclease)

ZFN

(Zinc finger nuclease)

CRISPR-CAS

- ZFN e TALEN sono enzimi di restrizione che riconoscono specifiche sequenze di DNA (DNA binding proteins)
- CRISPR-Cas è un sistema RNA-guida
- Editing genomico, sia in vivo che in vitro, utilizzando CRISPR: Applicazione contro malattie infettive (HIV), disordini monogenetici (Distrofia muscolare di Duchenne) e trattamenti contro il cancro

STRATEGIE PER L'EDITING GENOMICO

Plasmide-
mediato

Utilizzo di un
RNP
messaggero

Trasferimento
diretto della
proteina

SISTEMI DI TRASPORTO

VIRALI

- **Virus adeno-associati (AAV)**: Bassa immunogenicità ed elevato tropismo tissutale ma limitati da una bassa capacità di impacchettamento.
- **Lentivirus**: Elevata capacità di infezione e ampia possibilità di impacchettamento ed espressione

NON VIRALI

- **Elettroporazione**: Alta efficienza sia in vivo che in vitro, ma presenta un'alta probabilità di indurre la morte cellulare
- **Trasporto idrodinamico**: Efficienza limitata a tessuti epatici, può avere effetti collaterali su altri organi
- **Trasferimento lipidico**: Bassa efficienza ma comunque un metodo semplice ed economico

COMPLICAZIONI NELL'UTILIZZO DI CRISPR

- Effetti off-target (Figura 4)
- Delezioni o inserzioni non volute
- Produzione del gRNA
- Sistemi di trasporto efficienti e funzionali

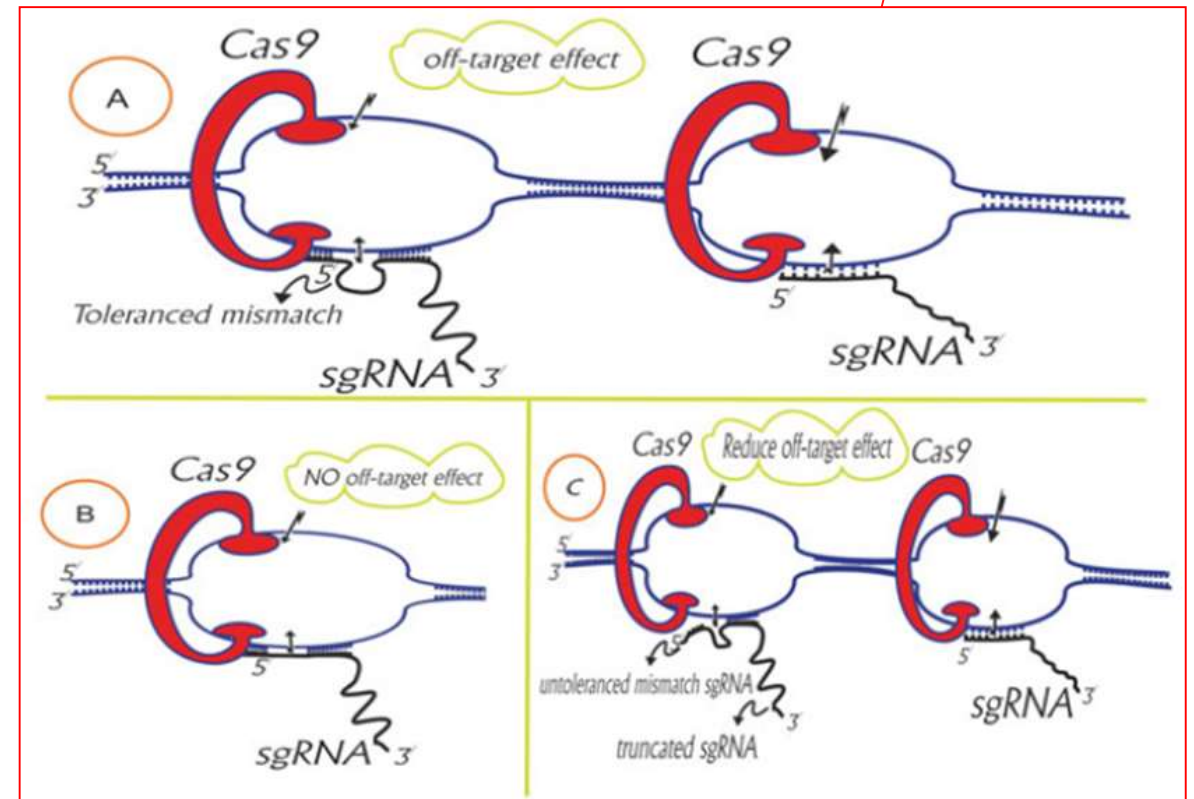


Figura 4

APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DI CRISPR CONTRO IL CANCRO

- Silenziamento genico: Confronto fra RNAi e sistema CRISPR
- Sistema gRNA/Cas9 contro gli oncogeni E6 ed E7 del virus HPV e successiva riparazione tramite NHEJ o HDR (Figura 4)
- Cotrattamento con Cas9/HPV16 e agenti chemioterapici (cisplatino)

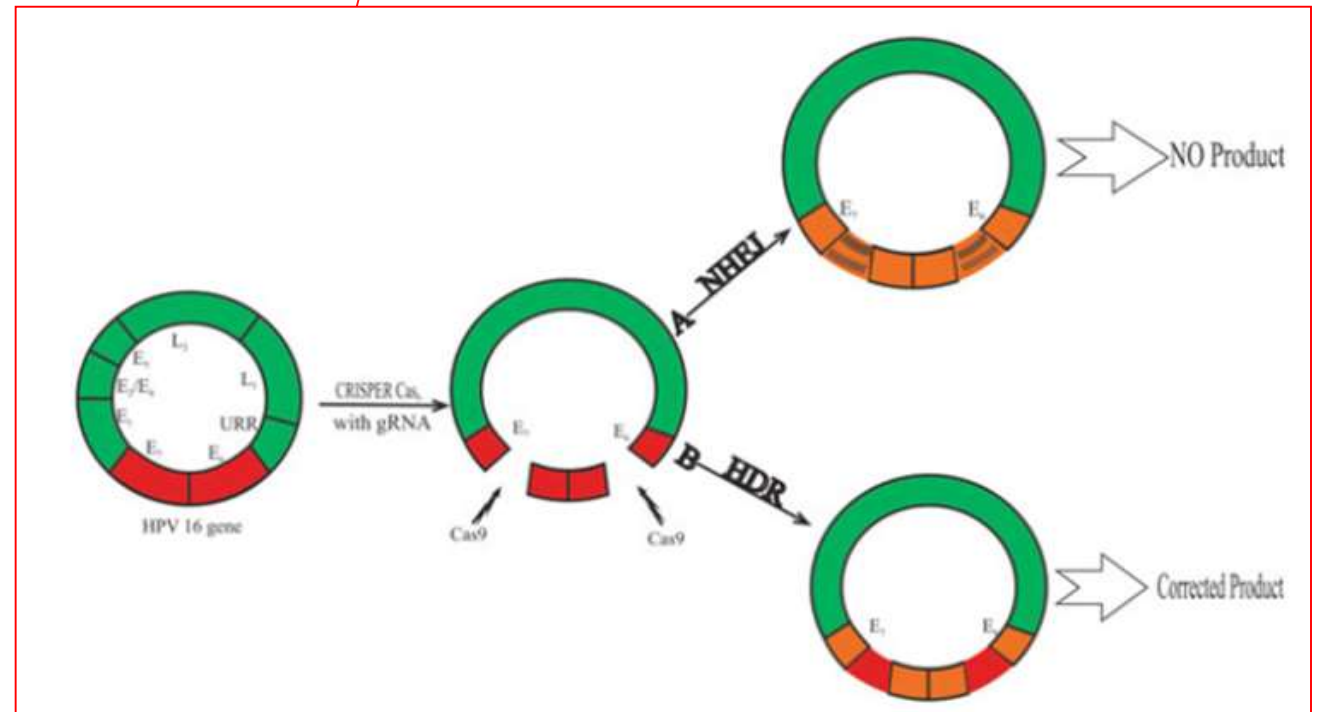


Figura 5

CONCLUSIONI

Il sistema CRISPR/Cas9 ha rivoluzionato il mondo dell'editing genomico. Fin dagli anni ottanta era già possibile effettuare operazioni di taglia e incolla sul DNA, ma con minor precisione. Con CRISPR cambia tutto: è uno strumento più semplice e rapido da applicare, capace di andare a tagliare specifiche sequenze di DNA. Al giorno d'oggi viene applicato non solo per ricerche di base, ma anche per trattare malattie genetiche causate da mutazioni del DNA o da geni difettosi. Oltre alla terapia genica, CRISPR/Cas9 promette di avere un enorme impatto sul miglioramento genetico, sia vegetale che animale.



Bibliografia

(1) <https://www.medimagazine.it/crispr-combatte-lobesita-senza-modifiche-al-genoma/>

Tesi compilativa basata sul seguente articolo: «Karimian Ansar, Khalil Azizian, Hadi Parsian, Sona Rafieian, Vahid Shafiei-Irannejad, Maryam Kheyrollah, Mehdi Yousefi, Maryam Majidinia, Bahman Yousefi, *CRISPR/Cas9 technology as a potent molecular tool for gene therapy*, Wiley Periodicals, Inc., 2019»

Link all'articolo: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.27972>



**GRAZIE PER
L'ATTENZIONE**



Riassunto

«Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9» è uno strumento di editing genomico RNA-guida, scoperto inizialmente come sistema di difesa adattiva in batteri e archei, che ad oggi offre innumerevoli vantaggi rispetto agli altri metodi convenzionali (ZNF, TALEN) al livello di costi, efficienza e facilità d'utilizzo.

A discapito di alcune limitazioni, come la possibilità di provocare effetti off-target, CRISPR-Cas9 rimane comunque lo strumento più conveniente per gli editing genomici.

Grazie alla sua capacità di andare a «tagliare» il DNA in maniera specifica, può essere considerato anche uno strumento importante in terapia genica, in particolare per il trattamento di malattie associate a mutazioni genomiche come per il cancro.

Esso viene utilizzato anche insieme a agenti chemioterapici, per sensibilizzare la cellula bersaglio al farmaco.

Oltre ai vari campi di applicazione di CRISPR, in questa tesi abbiamo discusso anche della sua classificazione, basata principalmente su differenze al livello dei geni Cas, del suo meccanismo d'azione come sistema di difesa nei batteri e dei vari sistemi di trasporto che gli permettono di inserirsi all'interno delle cellule bersaglio.