

## FRONTIERE DELLE BIOTECNOLOGIE

### CRISPR: la rivoluzione biotech è qui

<https://www.youtube.com/watch?v=2pp17E4E-08>

*Welcome to the Biotech Revolution*. Il viaggio nel mondo dell'editing, così come l'ha stravolto la tecnologia **CRISPR**, non può che iniziare così.

Questa tecnologia permette di editare il dna senza introdurre del dna esogeno.

Permette di modificare direttamente il patrimonio genetico delle cellule malate attraverso degli enzimi, che applicano dei tagli in punti precisi del genoma, che vengono riconosciuti attraverso un sistema di complementarità delle basi azotate: gli enzimi hanno un pezzettino di RNA compatibile al DNA a cui si lega, e il taglio avviene nella zona di riconoscimento tra l'RNA e il bersaglio di DNA. Questo è importantissimo, perché conoscendo la sequenza delle basi azotate del nostro dna, si possono creare delle sequenze di rna artificiali, compatibili con sequenze di dna, attaccare a queste sequenze l'enzima per tagliare il dna, e sostituire il pezzo "malato" e inserirne uno "sano".

### L'editing genomico

- L'**editing genomico** comprende una serie di applicazioni di **ingegneria genetica** che modificano la sequenza del DNA. Proprio come un correttore di bozze individua i refusi in un testo e li sistema, gli scienziati possono, grazie alle nucleasi, togliere o correggere sequenze geniche mutate.
- Nel 2015, la rivista *Science* ha nominato CRISPR "scoperta dell'anno"

L'ingegneria genetica è nata grazie alla scoperta degli enzimi di restrizione, ma successivamente si è sviluppata con enzimi guidati da filamenti di rna

### Come si «manipolava» il DNA prima di CRISPR?

- Sono millenni che l'uomo si impegna nella domesticazione di piante e animali e attua, in senso lato, un'attività di manipolazione genetica.
- Ma se dobbiamo individuare un punto di inizio di questa avventura, non si può non pensare a **Hermann Muller**: il primo a varcare la frontiera dell'editing scoprendo l'**azione mutagena dei raggi X**. Una scoperta che lo porterà dritto di fronte al Re di Svezia, a ritirare nel 1946 il premio Nobel.

Queste radiazioni modificano la doppia elica del dna, provocando mutazioni più o meno gravi

casuali

## Come si «manipolava» il DNA prima di CRISPR?

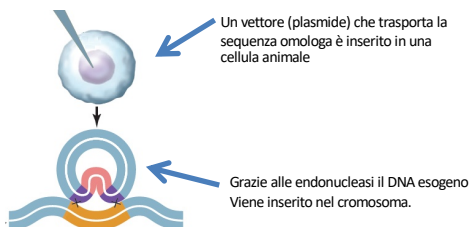
- La ricerca in questo ambito ha vissuto di rendita per molti anni; fino a quando nel 1985 **Oliver Smithies** scopre la **mutazione per ricombinazione omologa**.
- È la prima volta che gli scienziati riescono a guidare la mutagenesi dove vogliono: non più un processo casuale come quello delle sostanze mutagene, da cui selezionare con pazienza certissima le mutazioni interessanti, ma una **mutagenesi mirata**.
- Questa scoperta è stata poi perfezionata da **Mario Capecchi** e **Martin Evans** con una tecnica che ha permesso di mutare le cellule di mammifero e di generare il primo **topo knockout**. Questa tecnica ha fatto da trampolino di lancio alla creazione di migliaia di modelli murini e ha portato anche il terzetto **Capecchi, Evans e Smithies** a raccogliere gli onori dei reali di Svezia: era il 2007 e un altro Nobel veniva riconosciuto alla mutagenesi mirata del DNA.

Un topo knockout è un topo (modello murino) in cui viene silenziato un gene: questo ci permette di individuare quali sono gli effetti di un determinato gene sullo sviluppo di un determinato organismo

la gran parte dei geni sono pleiotropici, ossia influenzano più aspetti

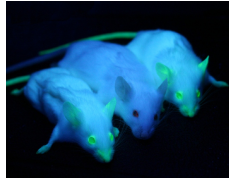
## Genome editing: ricombinazione

- Grazie a specifiche endonucleasi è possibile introdurre un **taglio** in una regione specifica del genoma.
- Se insieme a questi enzimi si fornisce alla cellula una sequenza di DNA che contiene l'informazione che desideriamo introdurre (ad es. un gene) insieme a **brevi sequenze fiancheggiatrici identiche a quelle presenti ai lati del sito di taglio**, il macchinario cellulare inserirà il DNA esogeno nel punto in cui hanno agito le endonucleasi, grazie al fenomeno della **ricombinazione omologa**.



DISCORSO GENERALE SUL GENOME EDITING

- Con la tecnologia del genome editing è possibile **inattivare un gene** specifico (**knock out**) oppure **introdurre un gene** esogeno all'interno di una cellula (**knock in**).



Le cellule cancerose dei topi possono essere rese fluorescenti ingegnerizzando gli animali per esprimere una particolare proteina chiamata GFP.

- Queste tecniche trovano applicazione, oltre che negli studi su cellule in coltura, anche nella generazione di **animali transgenici**.

Tutte queste modifiche venivano inizialmente svolte dagli enzimi di restrizione

### Come si «manipolava» il DNA prima di CRISPR?

- Una prima svolta arriva nel 1994: è possibile amplificare gli eventi di ricombinazione omologa tagliando il gene di interesse. Il merito va alle **nucleasi batteriche**, sono tecniche molto versatili, che permettono di **modificare in vivo** il genoma di organismi pluricellulari. Il primo è quello del **moscerino della frutta**, nel 2002, modificato con una endonucleasi. Seguono il pesce, il ratto, il mais, e l'almanacco va ampliandosi e vengono modificati anche il genoma del lievito e delle cellule umane.

senza necessità di geni esterni

### Come si «manipolava» il DNA prima di CRISPR?

- **Le proteine batteriche che operano i tagli sono precise, ma non infallibili.** Poi, la svolta: nel 2012 viene pubblicata la scoperta del sistema **CRISPR/Cas9**: un sistema che cancella con un arrogante colpo di spugna tutti i limiti dei sistemi precedenti. A guidare l'enzima sulla sequenza bersaglio non è più una proteina, ma **un filamento di RNA**: **facile da sintetizzare, economico e terribilmente efficace.** È l'inizio della rivoluzione.

### CRISPR: come funziona il chirurgo del genoma?

- Da bravi esploratori del DNA, gli scienziati sognavano da tempo uno strumento in grado di far loro strada nella giungla di nucleotidi. **CRISPR è questo: un piccolo machete molecolare, con una lama buona per ogni tipo di sequenza**, affilata quanto basta per permettere tagli precisi e mirati.

→ permette di editare in maniera precisa il patrimonio genetico.