

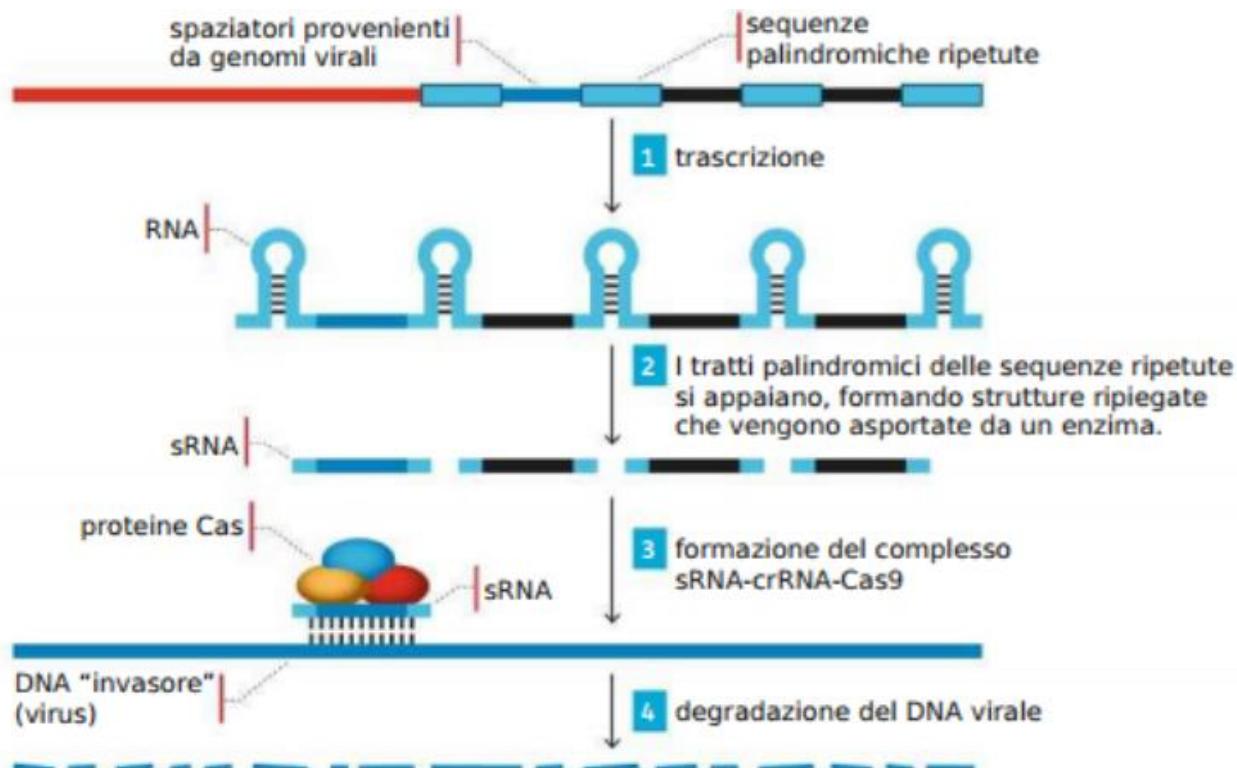
L'editing genetico - CRISPR/Cas9

Alla fine degli anni Ottanta il ricercatore spagnolo Francisco Mojica, analizzando al computer i genomi di alcuni batteri, scoprì che contenevano tratti di DNA con caratteristiche molto peculiari, in seguito chiamati **CRISPR** (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Nello specifico, il termine **CRISPR** indica porzioni di DNA costituite da una serie di sequenze ripetute, lunghe una trentina di basi e quasi perfettamente palindromiche, separate da tratti di DNA di lunghezza e sequenza variabile (*spaziatori o distanziatori*).

Oggi sappiamo che le CRISPR fanno parte di un sistema che permette ai batteri di "memorizzare" nel proprio genoma il DNA dei virus che li hanno infettati, in modo da poterli riconoscere e inattivare durante le infezioni successive. L'inattivazione avviene attraverso una proteina, chiamata **Cas9**, che ha funzione di endonucleasi e degrada i genomi virali in modo mirato, usando le informazioni memorizzate nelle sequenze CRISPR.

Il sistema CRISPR/Cas9 opera nel modo seguente

- 1 in seguito a un'infezione virale, alcuni frammenti di genoma virale sono incorporati dentro il genoma batterico, tra le sequenze ripetute, costituendo così gli spaziatori;
- 2 vengono trascritte copie di RNA a partire dalle sequenze CRISPR: dalla sequenza trascritta vengono asportate le sequenze ripetute, generando così frammenti di RNA corrispondenti alle sequenze degli spaziatori (**sRNA**);
- 3 un secondo tipo di RNA, chiamato **crRNA** ("cr" indica "associato a CRISPR") è ancora l'sRNA dentro Cas9 (sintetizzata da un gene vicino alle CRISPR), formando così un complesso sRNA-crRNA-Cas9;
- 4 in caso di una seconda infezione, l'sRNA identifica e lega il genoma virale, trasportando su di esso Cas9, che entra in azione e taglia il DNA del virus, inattivandolo.



L'editing genetico - CRISPR/Cas9

Nel 2012 le ricercatrici Jennifer Doudna e Emanuelle Charpentier modificarono *in vitro* questo sistema, dimostrando che può essere utilizzato per manipolare in modo molto mirato il genoma dei microrganismi. Per la tecnica che misero a punto venne coniato il termine di **editing genetico**.

Il principio su cui si basa è semplice: **modificando in modo opportuno l'sRNA, è possibile dirigere l'attività di Cas9 su una sequenza di DNA che si desidera tagliare**. Per facilitare la manipolazione, l'sRNA e il crRNA vengono fusi insieme, producendo un RNA unico che prende il nome di **RNA guida (gRNA)**, proprio perché trasporta Cas9 nel punto in cui deve operare [Figura 7]. Cas9 opera tagli molto precisi, prevedibili al livello di singola base, che permettono di effettuare almeno tre operazioni (associando altre tecniche):

- inattivare un gene, per esempio asportandone una parte;
- riparare un gene non funzionante, sostituendo in modo preciso alcune delle sue basi;
- introdurre una sequenza genica di interesse in un punto preciso del genoma.

Inoltre, a differenza delle altre tecniche finora disponibili, questa permette di agire su più geni contemporaneamente.

Più di recente i gruppi di ricerca capitanati da George Church e quello di Feng Zhang hanno modificato ulteriormente il sistema CRISPR/Cas9 e ne hanno dimostrato l'applicabilità anche alle cellule eucariote. I primi prodotti dell'editing genetico sono già in commercio e riguardano microrganismi modificati geneticamente per l'industria (per esempio, per la fermentazione dei prodotti caseari), mentre continuano le ricerche per valutare se questa tecnica possa essere usata efficacemente per curare le malattie genetiche negli esseri umani.

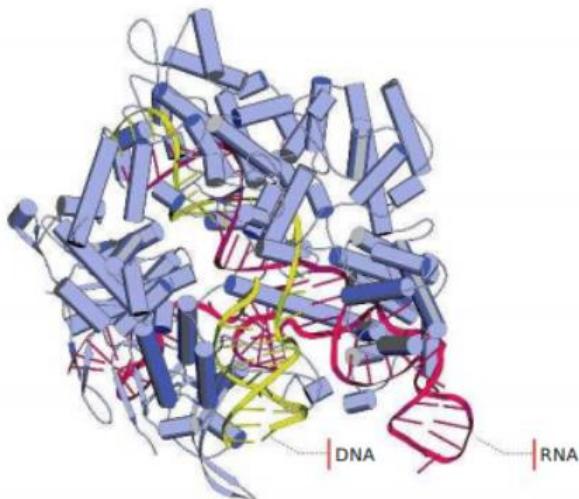


Figura 7

Cas9 (in azzurro) forma un complesso con la sequenza di RNA (in rosso) che viene utilizzata per riconoscere la sequenza di DNA (in verde) in cui effettuare il taglio. Da notare che l'RNA si trova sotto forma di doppio filamento e si separa nel momento in cui l'enzima entra in attività.

(da B. Colonna, "Chimica organica, Biochimica, Biotecnologie", Pearson)

