

PREMIO NOBEL PER LA CHIMICA 2020

assegnato a
Emmanuelle Charpentier e Jennifer A. Doudna

“for the development of a method for genome editing

di Enzo Tramontano *



* Professore di Microbiologia e Virologia all'Università di Cagliari



Il premio Nobel per la chimica del 2020 è stato assegnato a due scienziate, la microbiologa francese Emmanuelle Charpentier e la biochimica americana Jennifer Doudna, per aver messo a punto quella che oggi è la più efficace tecnologia per la modificazione dei geni, delle vere e proprie forbici molecolari il cui nome scientifico è CRISPR/Cas9. L'uso di questa tecnologia permette di modificare selettivamente il genoma di microrganismi, piante e animali, aprendo nuovi scenari per la terapia genica di diverse patologie umane e schiudendo la porta alla possibilità di modificazione

delle specie viventi esistenti, compreso l'uomo.

Il lavoro di Charpentier e Doudna è recente, del 2012, ma si basa su osservazioni acquisite negli anni da numerosi altri gruppi di ricerca. Osservazioni dapprima quasi irrilevanti, come un rigagnolo d'acqua, poi più strutturate, un torrente, quindi ben definite dal punto di vista funzionale, un fiume, infine il salto tecnologico, la cascata del premio Nobel dopo il quale il mondo delle biotecnologie non è più lo stesso.

Il primo rigagnolo è del 1987: il gruppo di ricerca giapponese di Atsuo Nakata, studiando la fosfatasi alcalina batterica, osserva collateralmente che nel genoma del batterio *Escherichia coli* sono presenti delle strane ripetizioni che contengono 5 sequenze omologhe di 29 nucleotidi (nt) separate da spaziatori di 32 nt [1]. Sequenze analoghe sono rilevate nel 1989 dallo stesso gruppo di ricerca anche in *Shigella dysenteriae* ed in *Salmonella typhimurium* [2]. Qualche anno dopo, nel 1993, un terzo rigagnolo si aggiunge quando un gruppo di ricerca spagnolo osserva ancora simili ripetizioni di 14 sequenze di 30 nt ripetute a distanza regolare anche nell'archea *Haloferax mediterranei*, proponendo per loro un ruolo nell'osmoregolazione [3]. Il torrente inizia quindi a prendere vita quando, nel 2000, lo stesso gruppo spagnolo riporta che queste ripetizioni di sequenze palindromiche di 24-40 nt, separate da «spaziatori» di 20-58 nt, sono presenti in diversi



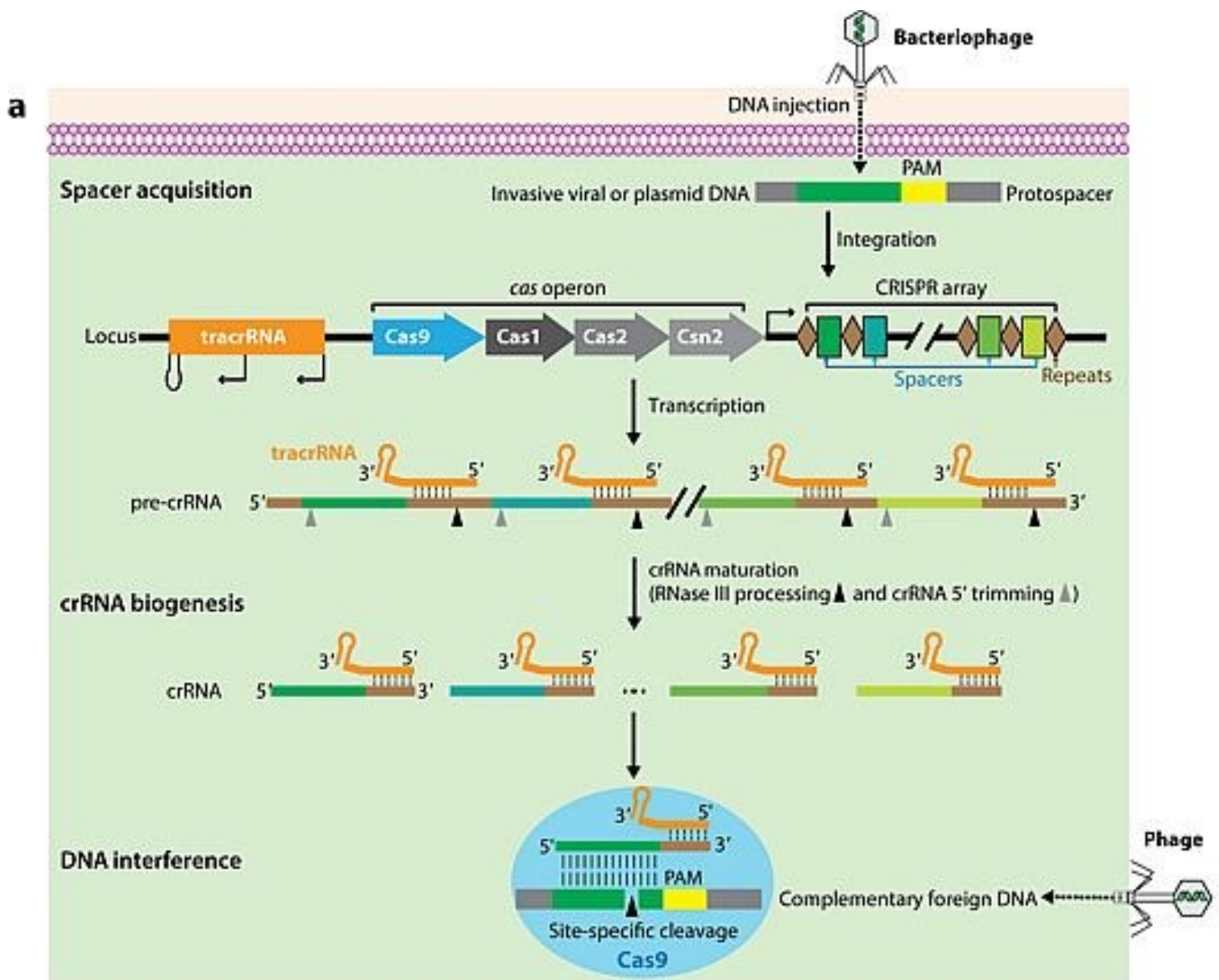
Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier

batteri e archea [4]. Continua poi a ingrossarsi quando nel 2002 uno studio genomico olandese le ritrova nei procarioti, ma non negli eucarioti o nei virus eucariotici, e introduce il loro nome attuale: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) [5], suggerendo che queste sequenze possano essere degli elementi genetici mobili, cioè sequenze che si possono spostare nel genoma (o tra i genomi) dei procarioti [5]. Al contempo, lo stesso studio identifica dei geni associati a CRISPR, *CRISPR-associated* (Cas), che codificano per delle elicasi e delle nucleasi [5]. Poco dopo anche altre famiglie di proteine Cas sono identificate, suggerendo che esse siano coinvolte nel metabolismo del DNA o nell'espressione genica [6].

Il torrente diventa un fiume imponente nel 2005, quando il gruppo spagnolo e altri gruppi francesi riportano indipendentemente che alcune sequenze CRISPR (dette proto-spaziatori) derivano da virus dei batteri e DNA plasmidici: CRISPR sembra quindi essere un sistema procariotico di difesa dalle invasioni di DNA esogeno di virus e plasmidi [7-9]. Le sequenze spaziatrici (dette ora proto-spaziatori) sono quindi proposte come sequenze di origine virale e quindi «memoria immunitaria» di precedenti infezioni a cui la cellula è sopravvissuta. La conferma del ruolo di difesa dalle infezioni arriva nel 2007 quando una collaborazione franco-americana osserva che ceppi del batterio *Streptococcus thermophilus* sono naturalmente resistenti ad alcuni virus, mentre altri ceppi sono naturalmente resistenti a virus differenti. Approfondendo l'osservazione, il gruppo di ricerca dimostra che quando i batteri sopravvivono a una nuova infezione virale acquisiscono delle sequenze «proto-spaziatrici» nel sistema CRISPR/Cas che si originano dal virus infettante e che le difendono dalle successive infezioni di quello specifico virus. Come elegante conferma mostrano che eliminando alcune sequenze proto-spaziatrici CRISPR/Cas relative a un certo virus il batterio perde la sua resistenza a quel virus che può quindi infettare e uccidere le cellule mutate [10].

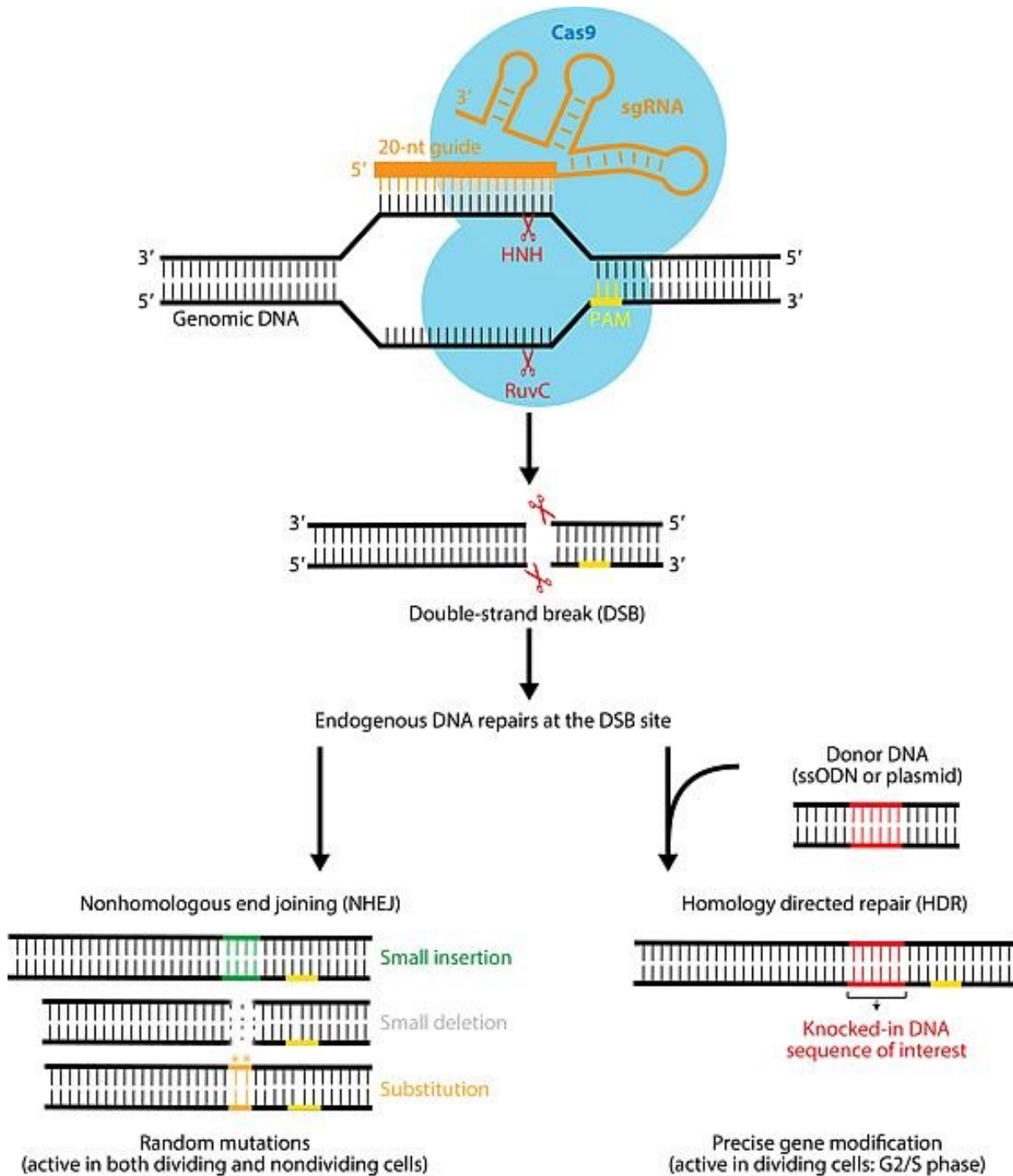
Il fiume è ormai scoperto e viene quindi esplorato da numerosi gruppi di ricerca [11-12], tra cui il gruppo di Emmanuelle Charpentier che nel 2011 [13] individua una sequenza adiacente a CRISPR che codifica per un RNA (detto tracrRNA) complementare all'RNA di CRISPR (crRNA). Studi per comprendere meglio il ruolo di tracrRNA portano infine alla scoperta della cascata nel 2012, quando i due gruppi di ricerca di Charpentier e Doudna pubblicano un lavoro in comune, che vale il premio Nobel. In questa pubblicazione comprendono che il tracrRNA può indurre la proteina Cas9 a introdurre delle rotture nel DNA a doppio filamento nel sito «indicato» da tracrRNA e crRNA [14]. Charpentier e Doudna concludono descrivendo così il salto tecnologico che costituisce la cascata: «il nostro studio rivela una nuova famiglia di endonucleasi che usano l'RNA per attivare un taglio sito-specifico del DNA il cui potenziale deve essere esplorato per sviluppare una modificazione genomica programmata» [14].

Riassumendo il quadro che dalla ricerca di base porta all'applicazione biotecnologica: i procarioti hanno nel genoma delle sequenze ripetute (*protospacer adjacent motif*, PAM) alternate a sequenze di origine per lo più virale (proto-spaziatori, *protospacer*), che nel complesso sono denominate CRISPR, che costituiscono un sistema di immunità contro l'ingresso di DNA extracellulare. Associato alle sequenze CRISPR è presente una serie di geni Cas che codificano per delle proteine che sono coinvolte nel processo di difesa e, adiacente alle sequenze Cas, c'è una regione che codifica per un tracrRNA che è un RNA complementare a crRNA, essenziale per l'attivazione del complesso. Il sistema immunitario procariotico agisce quindi mediante un sistema di appaiamento tra il crRNA (che contiene anche sequenze PAM), il tracrRNA e il DNA target, che consente di posizionare alcune proteine Cas (come Cas9) sul DNA target e di tagliarlo in modo selettivo. *Si veda figura alla pagina seguente.*



Charpentier e Doudna, sfruttando questo sistema procariotico, hanno compreso che era possibile mettere a punto un sistema in cui, disegnando sequenze di crRNA complementari a un DNA bersaglio a piacere, si poteva dirigere il complesso Cas in qualunque punto del genoma. Cosa rende la scoperta così eccezionale? Il fatto che se Cas introduce in un genoma eucariotico una rottura a doppio filamento del DNA, i sistemi cellulari la possono riparare. I sistemi di riparo deputati a questo sono essenzialmente due.

Il primo è la ricombinazione non omologa, che di norma porta a una perdita di porzioni di genoma o comunque a mutazioni; il secondo sistema è la ricombinazione omologa che porta a una riparazione più efficace, ma che necessita di una seconda copia della sequenza genica tagliata, per cui in realtà è poco frequente. Tuttavia, la sua frequenza può essere aumentata fornendo più copie di DNA «omologhe» da ricombinare. Pertanto, usando il sistema CRISPR/Cas per introdurre dei tagli in porzioni note di geni da «eliminare», e fornendo al genoma copie di DNA da «aggiungere», si possono sostituire geni a piacimento con sequenze mutate (o che correggono mutazioni aberranti) o introdurne di nuovi.



- Error-prone NHEJ**
- Indel mutations
 - Frameshift mutations
 - Large deletions or inversions using two adjacent DSBs
 - Loss-of-function screens
 - Genomic rearrangements
 - NHEJ-mediated homology-independent knock-in

- Other applications**
- Gene targeting (dCas9-effector):
 - transcriptional regulation
 - epigenetic modification
 - live-cell imaging
 - nucleotide editing
 - Genetic screens/drug screens
 - Ligation-mediated gene editing by double Cas9 nickases (D10A)

- High-fidelity HDR**
- Gene insertion/correction/replacement
 - Precise point mutations
 - Precise gene knockout
 - Conditional alleles (Cre-loxP, etc.)
 - Introduction of tags, reporters, etc.
 - Gain-of-function mutations

AR Jiang F, Doudna JA. 2017. Annu. Rev. Biophys. 46:505–29

In definitiva, il salto tecnologico descritto nella pubblicazione del 2012 ha disclosed scenari mai esplorati prima. Ipotesi di soldati più forti, senza paura e percezione del dolore, sogni di rigenerazione di arti, possibilità di dormire solo quattro ore al giorno e non avvertire stanchezza, rallentamento dei processi di invecchiamento, le più diverse prospettive eugenetiche, modificazioni di specie vegetali e animali ... tutto ciò è passato dai libri di fantascienza alla realtà di laboratori che possono essere quelli «di Stato», di multinazionali private e anche di scienziati fai-da-te che in scantinati improvvisati costruiscono e comprano sistemi di CRISPR/Cas per i più diversi utilizzi. La prima ad aver presente la sfida che la sua scoperta ha portato è Jennifer Doudna che ha fatto numerosissimi interventi sul tema e che, convinta che «la tentazione di modificare la specie umana in modo permanente non sarà facile da sradicare» e che le richieste di moratorie siano inutili, da tempo chiede una discussione aperta e pubblica perché «dal 2012 la tecnologia CRISPR ha trasformato la ricerca di base, lo sviluppo farmacologico, la diagnostica, l'agricoltura, la biologia sintetica. [...] (e occorre) assicurare un uso responsabile dell'*editing* genomico e permettere alla tecnologia di CRISPR/Cas di migliorare la qualità della vita di milioni di persone» [24]. Il premio Nobel Jennifer Doudna chiede quindi un principio di responsabilità discusso e condiviso, un cardine dell'agire dell'uomo che sembra imprescindibile in questo «mondo nuovo» in cui viviamo, ormai all'indomani di questo rivoluzionario premio Nobel.

Enzo Tramontano

(Professore di Microbiologia e Virologia all'Università di Cagliari)

Indicazioni bibliografiche

1. Ishino et al Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product *J. Bacteriol* 1987, 169: 5429-5433
2. Nakata et al Unusual Nucleotide Arrangement with Repeated Sequences in the *Escherichia coli* K-12 Chromosome *J. Bacteriol* 1989, 171: 3553-3556
3. Mojica et al Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites *Mol Microbiol* 1993, 9: 613-621
4. Mojica et al., Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 2000, 36: 244-6.
5. Jansen et al Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes *Mol Microbiol* 2002, 43: 1565-1575.
6. Haft et al A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes *PLoS Comput Biol* 2005, 1: e60.
7. Mojica et al Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 2005, 60: 174-82.
8. Pourcel et al CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 2005, 151: 653-663.
9. Bolotin et al Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 2005, 151: 2551-2561.
10. Barrangou et al CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007, 315: 1709-12.
11. Deveau et al CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions *Annu Rev Microbiol* 2010, 64: 475-93
12. Jiang and Doudna CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms *Annu Rev Biophys* 2017, 46: 505-29
13. Deltcheva et al CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III *Nature* 2011, 471: 602-7
14. Jinek et al A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity *Science* 2012, 337: 816-21
15. Li et al Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects *Sig Transduct Target Ther* 2020, 5: 1.
16. Xu et al Genome editing for horticultural crop Improvement *Hortic Res* 2019, 6: 113
17. Manghwar et al CRISPR/Cas system: recent advances and future prospects for genome editing *Trends in Plant Science*, 2019, 12: 1102-1125
18. Petersen B Basics of genome editing technology and its application in livestock species *Reprod Dom Anim.* 2017, 52 (Suppl. 3): 4-13.
19. Lee et al Genome modification technologies and their applications in avian species *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 224
20. Menchaca CRISPR in livestock: from editing to printing *Theriogenology* 2020, 150: 247e254
21. Kang et al CRISPR/Cas9-mediated genome editing in nonhuman primates *Dis Model Mech.* 2019, 12: dmm039982
22. Ledford CRISPR editing wreaks chromosomal mayhem in human embryos *Nature* 2020, 583: 17-18.
23. <http://nap.edu/25665>
24. Doudna CRISPR's unwanted anniversary *Science* 2019, 366: 777.

