

CRISPR: la rivoluzione del “ritocco genico”

La modifica di precise sequenze di materiale genetico in vivo ha rappresentato per anni il “sacro Graal” per la ricerca in ambito biologico. Numerosi tentativi, con diversi gradi di successo, sono stati fatti equipaggiando enzimi endonucleasi con domini di legame al DNA in grado di riconoscere specifiche sequenze (meganucleasi, nucleasi a dita di zinco [ZFN] e nucleasi effettori simili ad attivatori trascrizionali [TALEN]) (Wang et al., 2016). La maggiore limitazione di queste strategie è però rappresentata dalla necessità di dover sintetizzare e ottimizzare una sequenza proteica per assicurare specificità ed efficienza di taglio, escludendo quindi applicazioni su larga scala. La strategia CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), nata come applicazione delle scoperte in materia di risposta antivirale in procarioti, ha superato tali limitazioni (Jinek et al., 2012). Questa tecnologia localizza specifiche endonucleasi Cas (CRISPR associated protein) mediante (1) un'interazione diretta fra la proteina e una corta sequenza di DNA (motivo vicino al protospaziatore (PAM)) ma soprattutto (2) in virtù dell'accoppiamento di basi fra una corta sequenza di RNA, definita “guida” o gRNA, e il DNA bersaglio (fig. 1). Il principio su cui è basato CRISPR-Cas, espande enormemente la possibilità agire su uno o più specifici siti genomici; fino ad ora è stato utilizzato per tagli di singoli o doppi filamenti, sostituzione di basi, regolazione della trascrizione, ma numerose altre attività enzimatiche possono essere sfruttate (Adli, 2018). Al taglio operato dall'endonucleasi Cas può seguire riparazione mediante congiunzione delle estremità non basata su omologia (NHEJ) che, in quanto soggetta a errori, può introdurre mutazioni

* Dipartimento di Biologia, Università di Pisa

** Istituto di Scienze della Vita, Scuola Superiore Sant'Anna

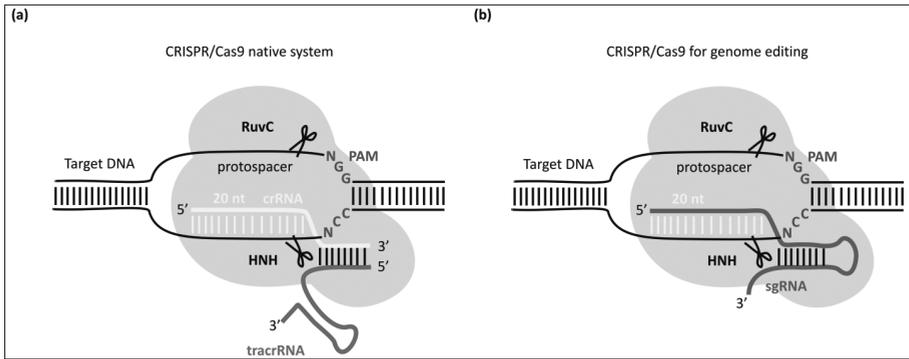


Fig. 1 Features of the CRISPR/Cas9 system (a) Schematic representation of the type II CRISPR/Cas9 in its native system. The Cas9 enzyme consists of two cleavage domains, RuvC and HNH. The target sequence of 20 nt on the genomic target, called protospacer, is recognized by a complementing RNA, crRNA, which has to be stabilized by the tracrRNA fragment in order to be loaded on the Cas9. The presence of the downstream protospacer adjacent motif (PAM) is a prerequisite for DNA cleavage by the Cas9 complex. (b) The system described in (a) was optimized for genome editing applications fusing the crRNA and tracrRNA fragment into the chimeric sgRNA. Scheme adapted from Bortesi and Fischer, (2015).

Fig. 1 Caratteristiche del sistema CRISPR/Cas9 (a) Rappresentazione schematica del sistema originale di tipo II CRISPR/Cas9. L'enzima Cas9 è composto di due domini di taglio RuvC e HNH. La sequenza di 20 nt sul bersaglio genomico, detta protospaziatrice, viene riconosciuta da un RNA complementare, crRNA, che viene caricato sull'enzima Cas9 attraverso il frammento tracrRNA. La presenza di un motivo adiacente al protospaziatore (PAM) è un requisito per il taglio del DNA da parte di Cas9. (b) Il sistema descritto in (a) è stato ottimizzato per applicazioni di modifica genomica fondendo crRNA e tracrRNA nel sgRNA chimerico. Schema adattato da Bortesi and Fischer, (2015).

missenso, non senso o vere e proprie inserzioni/delezioni. Alternativamente, se viene fornita una sequenza le cui estremità presentino omologia con quelle prodotte dal taglio, questa può essere utilizzata come stampo per la riparazione, sostituendo la regione originale oppure introducendo una nuova porzione di DNA. Fino a oggi, la maggioranza delle applicazioni di CRISPR a specie vegetali sia per scopo di ricerca che applicativi hanno sfruttato il primo meccanismo di riparazione, sebbene alcuni approcci di ricombinazione omologa guidata abbiano avuto esito altrettanto positivo. Recentemente, anche approcci di sostituzioni mirate di basi azotate sono stati tentati con successo (Ramasamy et al., 2018).

Le principali limitazioni di questa rivoluzionaria strategia sono rappresentate dall'efficienza di indirizzamento del complesso ribonucleoproteico e dalla localizzazione in posizioni indesiderate del genoma (in inglese “off-targets”). In anni recenti numerose modifiche sono state introdotte per aumen-

tare l'efficienza e la specificità della tecnologia CRISPR, sfruttando proteine Cas provenienti da diversi batteri oppure operando opportune modifiche in quella principalmente utilizzata, proveniente da *Streptococcus pyogenes* (Sp). Specificamente nell'ambito della biologia delle piante, l'introduzione stessa del complesso Cas-gRNA nelle cellule vegetali rappresenta un passaggio limitante, in quanto fortemente condizionato dalle possibilità di trasformazione e rigenerazione della specie di interesse.

Sulla base delle limitazioni sopraelencate, riteniamo che i seguenti quattro aspetti dovrebbero essere considerati nel caso venga pianificata una strategia di mutagenesi mediante CRISPR-Cas.

Per prima cosa, è necessario identificare con precisione la regione genomica bersaglio. Questo può essere semplice per approcci di genetica inversa, ovvero quelli nei quali si intendano esplorare le conseguenze fenotipiche di una mutazione che inattivi una porzione genica definita. In questo caso, è opportuno indirizzare la modificazione su esoni, in particolare il primo o quelli codificanti per regioni conservate. Qualora si miri a ottenere un ben determinato fenotipo sfruttando la genetica inversa, sarà opportuno valutare i geni candidati e rintracciarne o inferirne (sulla base delle informazioni di letteratura, oppure di analisi di sequenza genica o proteica) le mutazioni con il maggior potenziale causativo. Particolare attenzione dovrebbe essere prestata laddove i geni candidati individuati in tal modo appartengano a famiglie geniche, oppure quando ci si applichi a specie poliploidi, a causa della possibile complementazioni da parte di sequenze funzionalmente ridondanti. Fortunatamente, al giorno d'oggi, le sequenze dei genomi o almeno dei trascrittomi di numerose specie vegetali sono depositate presso basi di dati accessibili. A causa della variabilità intraspecifica è comunque consigliabile un ri-sequenziamento della regione bersaglio prima di intraprendere la progettazione dei gRNA.

In questa seconda fase, è consigliabile l'utilizzo di algoritmi bioinformatici dedicati (oggi anche liberamente disponibili in rete) per il controllo e l'analisi delle numerose variabili strutturali che possono condizionare l'efficienza di modificazione dei loci genomici prescelti. Fra queste vale la pena elencare la presenza di regioni genomiche con parziale omologia di sequenza, che rappresentano potenziali off-target, la lunghezza del gRNA, la sequenza del PAM, entrambe dipendenti dal tipo di Cas impiegata e, infine, la presenza di siti di restrizioni in prossimità del PAM che possano agevolare l'identificazione dell'avvenuta mutazione.

Una volta definita la sequenza che fungerà da gRNA, questa dovrà essere clonata all'interno di un vettore di espressione efficace nell'espressione del com-

plesso riboproteico. Generalmente, viene sfruttato per l'espressione del gRNA un promotore di RNA ribosomali, trascritto da RNA polimerasi III. La scelta del promotore del gene Cas è, invece, fortemente determinata dalla strategia di trasformazione della specie: ubiquitario e costitutivo nel caso in cui venga sfruttata la rigenerazione in vitro, oppure specifico per gameti o precoci stadi embrionali nel caso in cui la trasformazione abbia luogo durante l'impollinazione, mediante la tecnica dell'immersione florale. Più cassette codificanti per gRNA possono essere assemblate in serie in modo da dirigere molteplici mutazioni allo stesso tempo. Inoltre, il marcatore di selezione conferito dal vettore al materiale vegetale trasformato (marcatore che è generalmente associato a fluorescenza o alla resistenza a sostanze citotossiche) dovrebbe essere scelto in modo da minimizzare le operazioni di identificazione dei transgenici. È opportuno menzionare la possibilità di trasferimento diretto del complesso nucleoproteico in cellule protoplastizzate, seguito da rigenerazione di intere piante. Tuttavia questa strategia, che supera la necessità di transgenesi, è tecnicamente complessa e può stimolare l'insorgere di mutazioni somatiche. Infine l'identificazione di individui in cui sia avvenuta la mutazione può avvenire direttamente mediante amplificazione e sequenziamento della regione bersagliata, oppure attraverso una prima analisi di restrizione, qualora un idoneo sito di riconoscimento per endonucleasi sia presente a valle del PAM. Se la mutazione è stata ottenuta mediante espressione stabile di Cas e gRNA, è successivamente consigliabile eliminare la sequenza codificante per entrambi, mediante incrocio con individui selvatici e seguendo la segregazione dei transgeni rispetto alla mutazione indotta. Questo può rappresentare una notevole limitazione nel caso di piante che richiedono lungo tempo prima di acquisire competenza riproduttiva.

In conclusione, la strategia CRISPR rappresenta un notevole avanzamento tecnico, applicabile a numerosi ambiti della biologia, incluso lo studio delle piante. Sebbene sia facilmente applicabile come semplice avanzamento rispetto alle ormai tradizionali tecniche di transgenesi, richiede un'accorta pianificazione dell'approccio, che includa un esame accurato di diversi aspetti biologici e tecnici che possono influire sul risultato finale. Il fiorire di tecniche accessorie di modificazione nucleotidica arricchirà senza dubbio il portafoglio di strumenti disponibile per i biologi vegetali del futuro.

ABSTRACT

Site-directed editing of genomic regions is a powerful tool to study biological processes as well as to obtain desired phenotypes in eukaryotic organisms. It is not surprising that its

application in plant biology has blossomed in the recent years. Among the strategies aimed at directing endonucleases to specific genomic targets, the CRISPR-Cas technology is the mostly employed due to its efficiency and simplicity of engineering. This strategy is commonly used to either induce inactivating mutations or, in a more complex approach, to replace regions of interest to alter the properties of plant species of interest. To effectively apply CRISPR-Cas for plant mutagenesis, special care has to be taken when selecting the sequence to be mutagenized, the delivery of the ribonucleoprotein complex and the selection procedure. Nevertheless, CRISPR-Cas represent a priceless tool in the hands of the new generation of plant biotechnologists and breeders.

BIBLIOGRAFIA

- ADLI M. (2018): *The CRISPR tool kit for genome editing and beyond*, «Nature Communications», 9, 1911.
- JINEK M., CHYLINSKI K., FONFARA I., HAUER M., DOUDNA J. A., CHARPENTIER E. (2012): *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*, «Science», 80, pp. 816-821.
- RAMASAMY K., JAYABALAN S., SELLAMUTHU G., JAGANATHAN D., VENKATARAMAN G. (2018): *CRISPR for Crop Improvement: An Update Review*, «Front. Plant Sci.», 9, p. 985.
- WANG H., LA RUSSA M., QI L.S. (2016): *CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond*, «Annu. Rev. Biochem.», 85, pp. 227-264.
- CUI Y., XU J., CHENG M., LIAO X., PENG S. (2018): *Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools*, «Interdiscip Sci Comput Life Sci», 10, 455.