



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



***AGGIORNAMENTO SULLE TECNICHE DI MIGLIORAMENTO GENETICO
DELLE PIANTE (NEW BREEDING TECHNIQUES-NBT)***

Roma, 5 Aprile 2018

***Aspetti molecolari del sistema
CRISPR/Cas***

Daniela Vinciguerra





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Editing del genoma



Riassumendo.....



L'editing del genoma ha lo scopo di introdurre un'alterazione precisa o delle mutazioni casuali in un punto preciso del genoma. Si realizza sfruttando il naturale sistema di riparo/ricombinazione del DNA attivato dall'utilizzo di nucleasi sito-dirette (SDN), da molecole di acido nucleico esogeno (oligonucleotide), o la combinazione di entrambe."

[Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences]





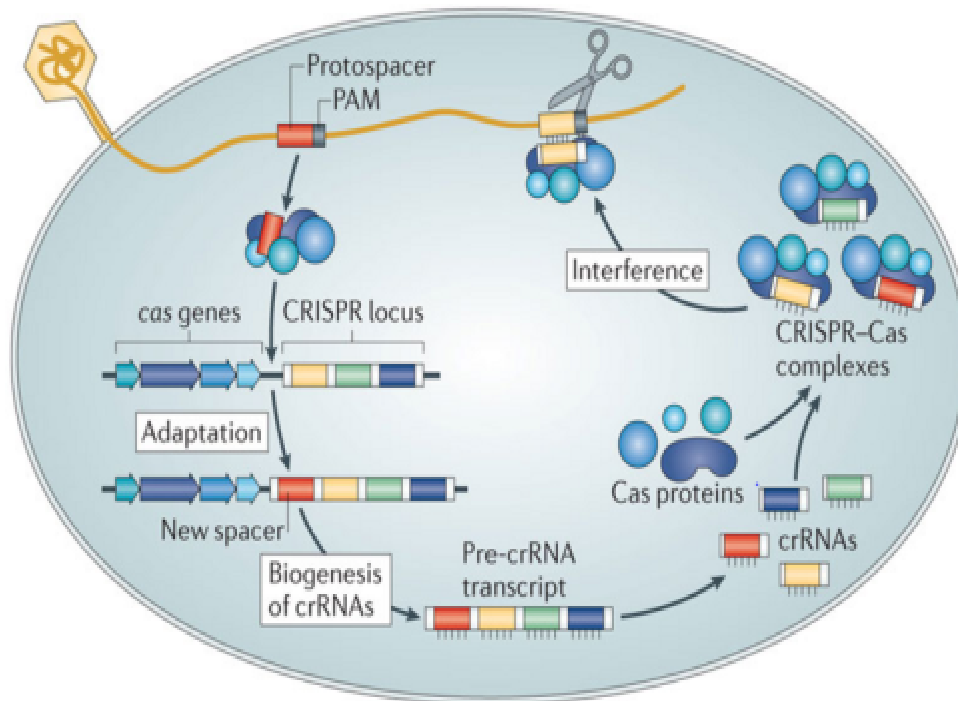
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

CRISPR

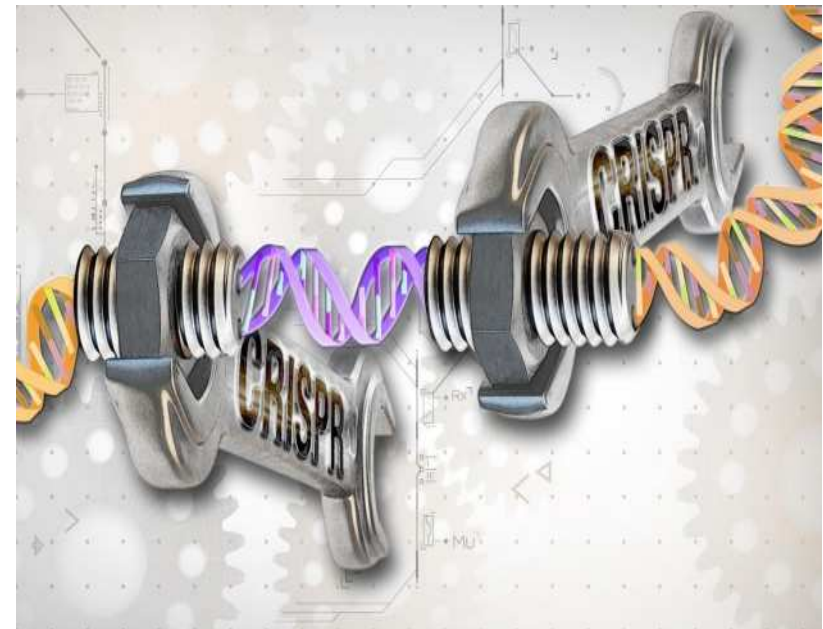


clustered regularly interspaced short palindromic repeats

Procarioti



Eucarioti





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Agenda

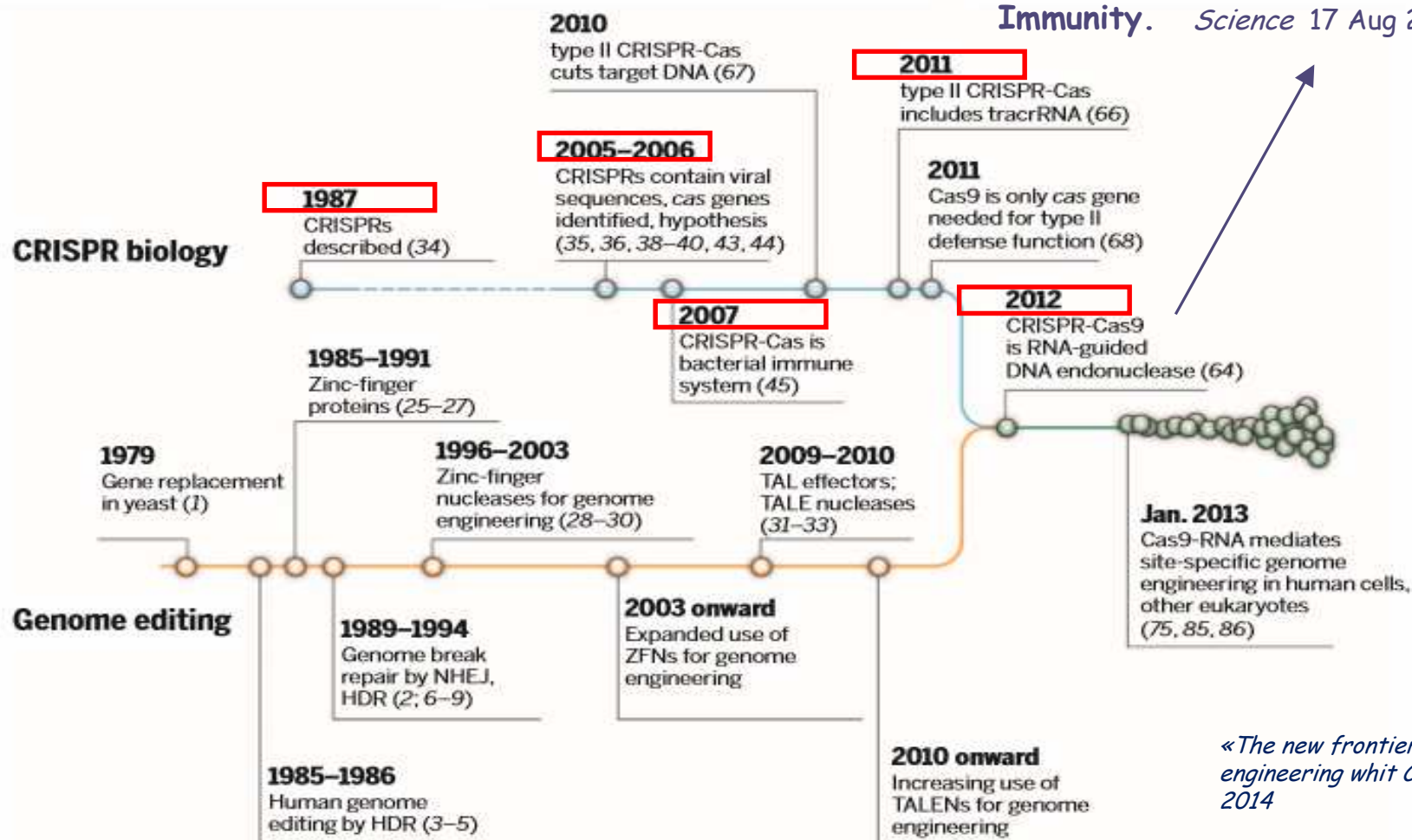


CRISPR: Storia di CRISPR
Aspetti molecolari
Funzione

CRISPR : Possibili applicazioni



A Programmable Dual-RNA-Guided DNA
Endonuclease in Adaptive Bacterial
Immunity. *Science* 17 Aug 2012



«The new frontier of genome
engineering whit CRISPR-Cas9»
2014



REVIEW

GENOME EDITING

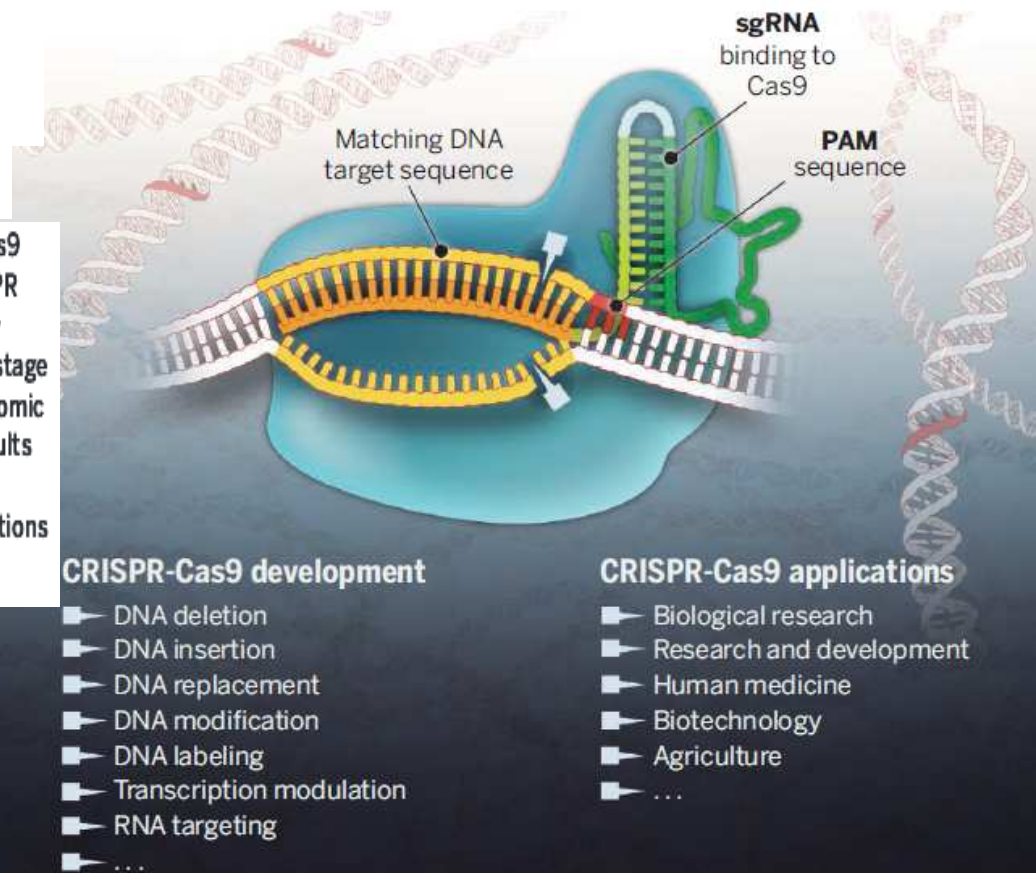
The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9

Jennifer A. Doudna and Emmanuelle Charpentier

Science **346**, (2014);

DOI: 10.1126/science.1258096

The advent of facile genome engineering using the bacterial RNA-guided CRISPR-Cas9 system in animals and plants is transforming biology. We review the history of CRISPR (clustered regularly interspaced palindromic repeat) biology from its initial discovery through the elucidation of the CRISPR-Cas9 enzyme mechanism, which has set the stage for remarkable developments using this technology to modify, regulate, or mark genomic loci in a wide variety of cells and organisms from all three domains of life. These results highlight a new era in which genomic manipulation is no longer a bottleneck to experiments, paving the way toward fundamental discoveries in biology, with applications in all branches of biotechnology, as well as strategies for human therapeutics.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



How CRISPR lets us edit our DNA

Jennifer Doudna





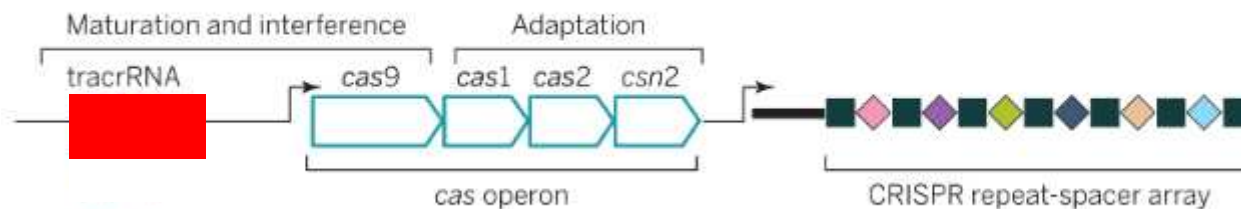
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Locus CRISPR



tratti distintivi dell'immunità acquisita nei procarioti

Genomic CRISPR locus



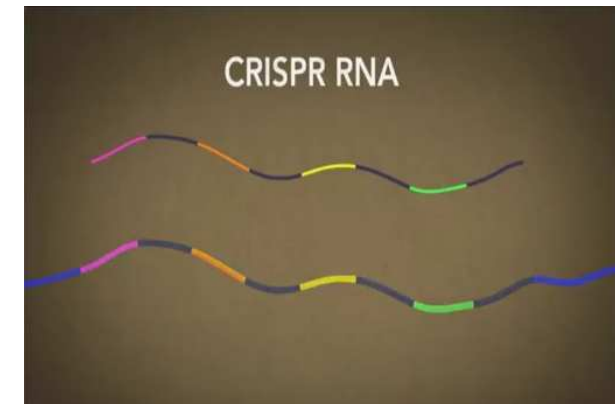
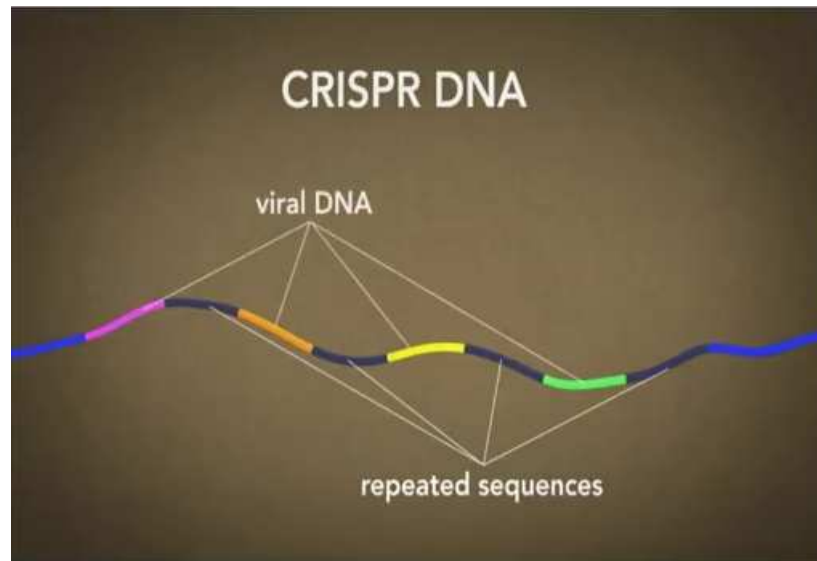
Fasi del meccanismo di difesa:

Acquisizione del DNA di origine virale o plasmidico esogeno

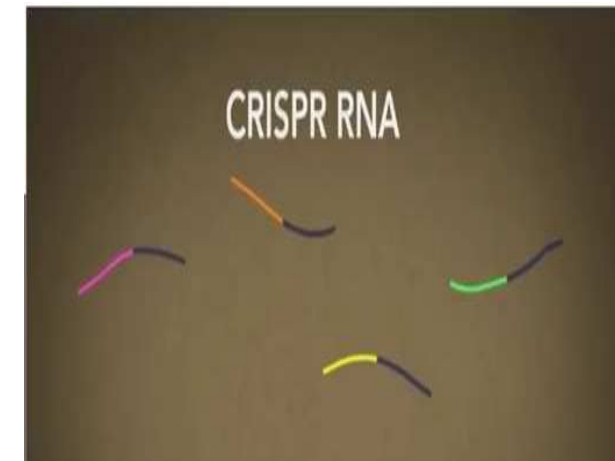
Espressione del crRNA

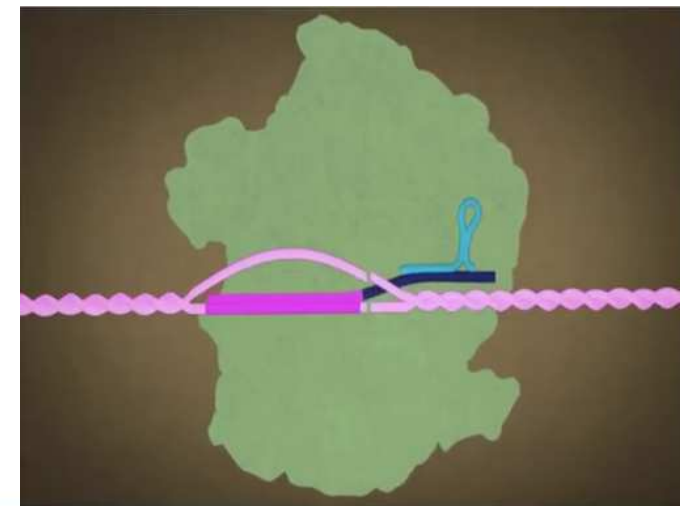
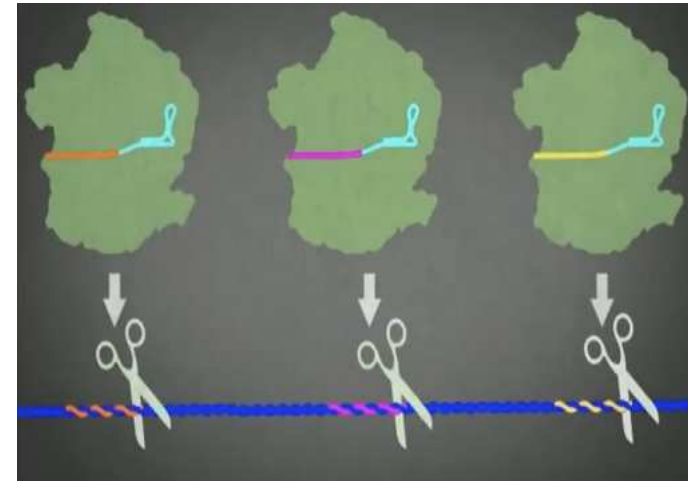
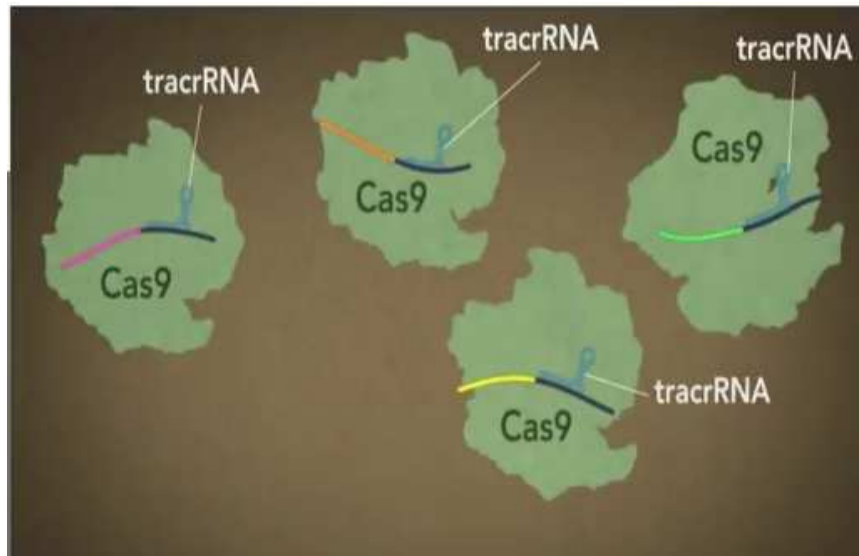
Meccanismo di interference sul DNA esogeno per il quale si è acquisita immunità





La cellula batterica è in grado di copiare la sequenza CRISPR DNA nella forma di una singola molecola di RNA che verrà successivamente processata in unità individuali ciascuna delle quali contiene una sequenza di origine virale unita ad una sequenza ripetuta





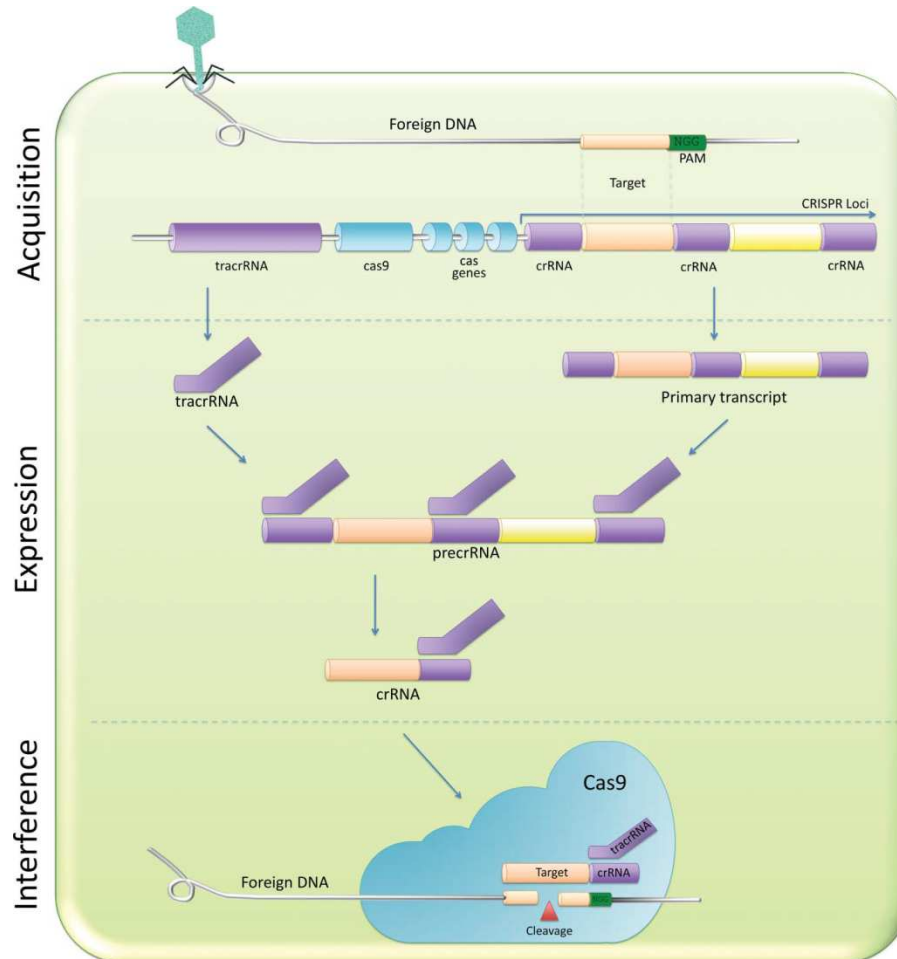
RNA guida lega la proteina Cas9 , originando quindi il complesso RNA-proteina in grado di riconoscere all'interno della cellula sequenze di DNA complementari alla sequenza del RNA innescando così l'attività dell'endonucleasi





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

CRISPR nei procrarioti



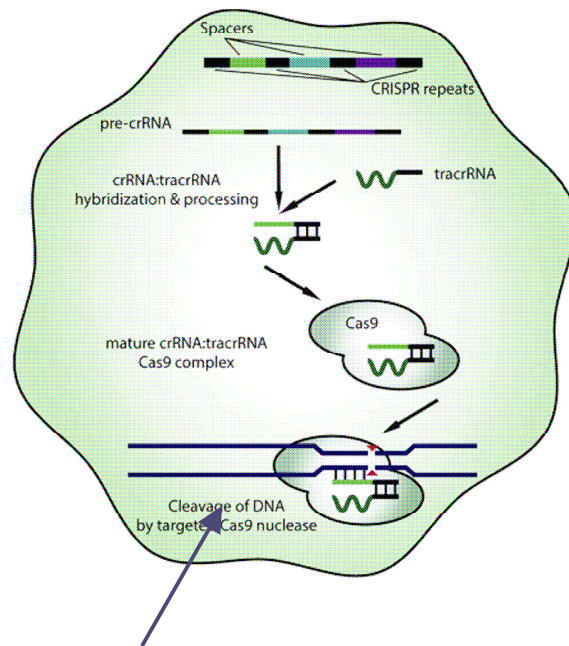
Il sistema Crispr-Cas9 è composto di tre distinti componenti :

- un piccolo RNA transattivatore (tracrRNA)
- un operone che codifica per le proteine Cas
- sequenze ripetute che fiancheggiano sequenze unique di origine virale (crRNA)

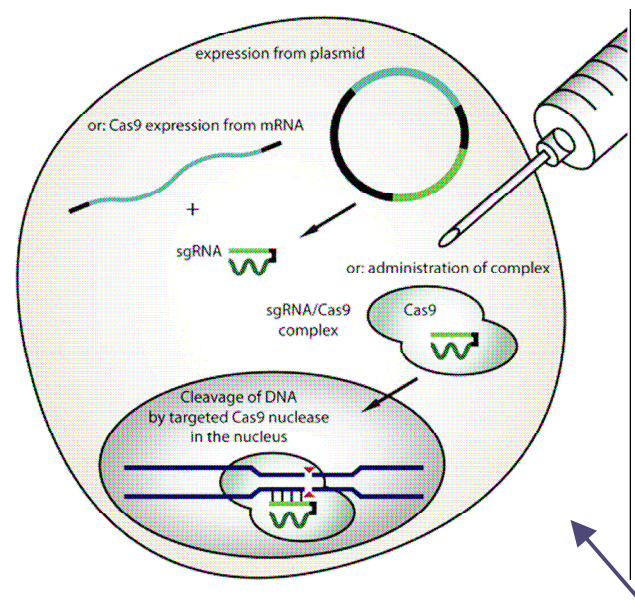
L'attività endonucleasica della Cas9 richiede 3 nucleotidi altamente conservati protospacer adjacent motif (PAM) che precedono la sequenza bersaglio.
La tripletta NGG è il trinucleotide associato al Sistema CRISPR/Cas9



CRISPR/Cas9 nei procarioti CRISPR/Cas9 negli eucarioti

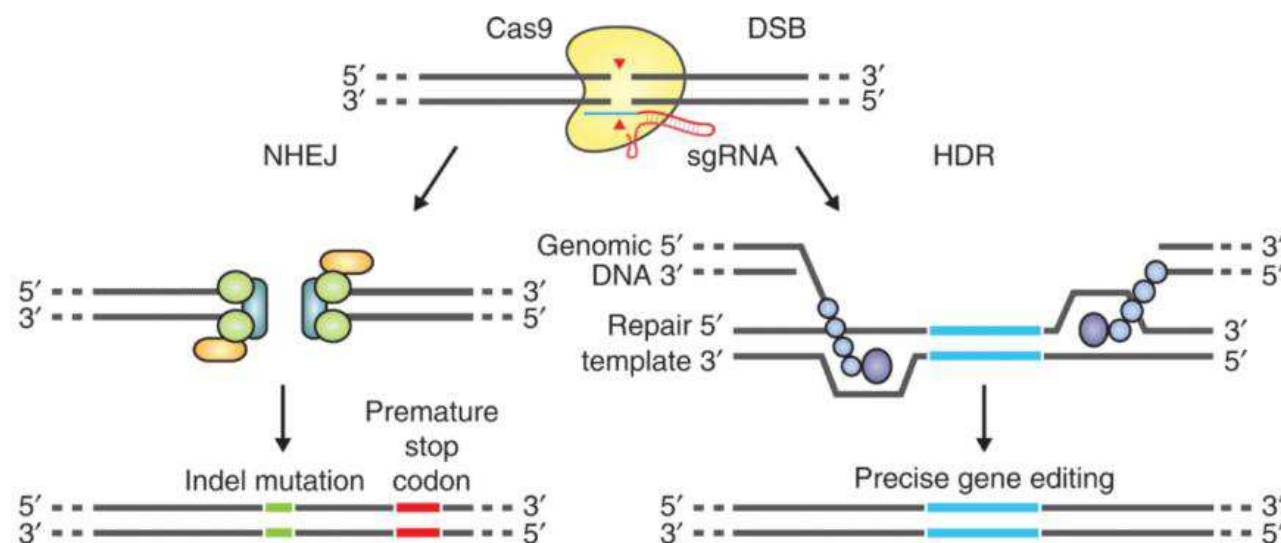


Sistema adattativo
immunitario



Editing del genoma





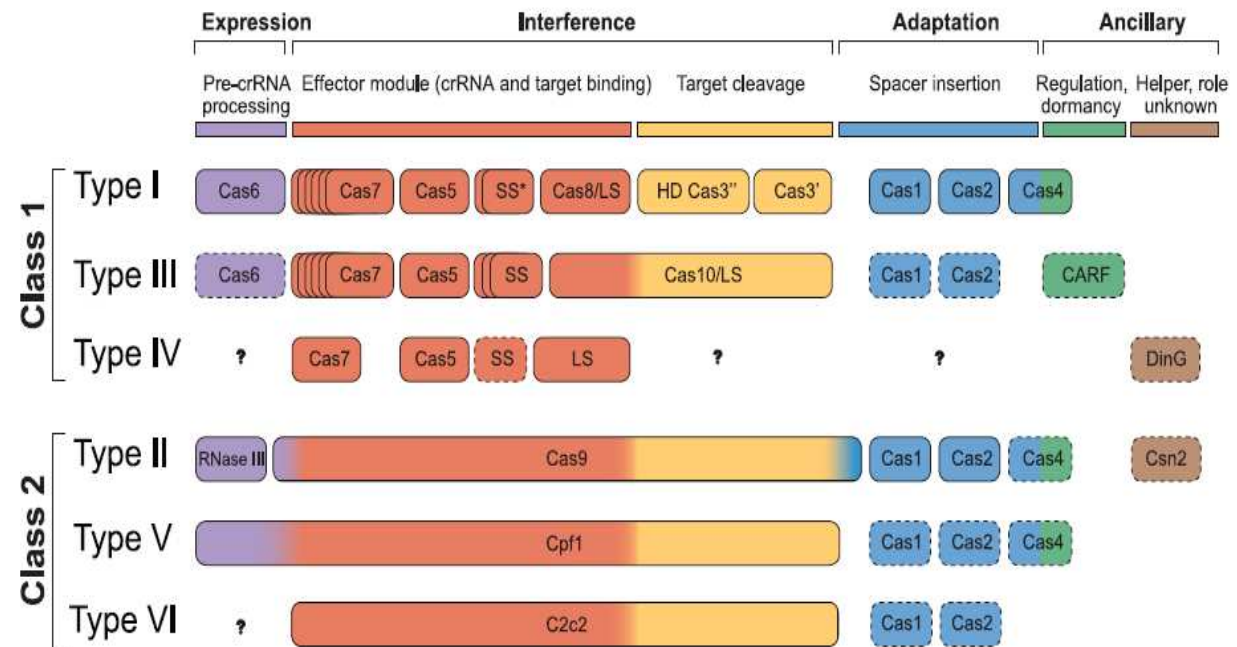
Non-homologous end-joining (NHEJ)

Homology-directed repair



Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems

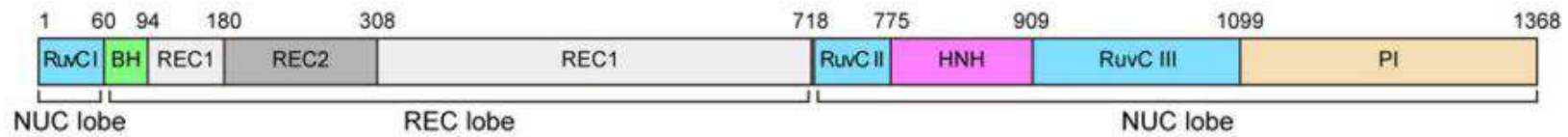
Prarthana Mohanraju,¹ Kira S. Makarova,² Bernd Zetsche,³ Feng Zhang,³
Eugene V. Koonin,² John van der Oost^{1*}





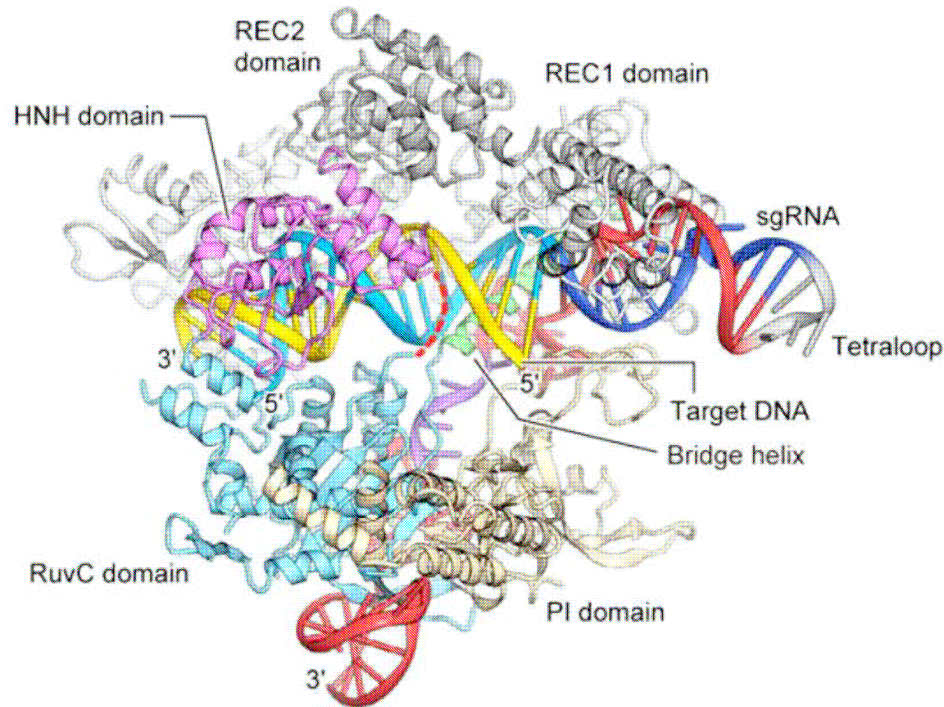
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

I domini di Cas9 nei procarioti



Attività di riconoscimento

Attività nucleasica



HNH = dominio con attività catalitica
RuvC I = dominio con attività catalitica
(tre sottodomini)
PI = dominio per il riconoscimento di PAM



Effetti diversi da quelli che si intende generare con l'impiego delle tecniche di miglioramento genetico

- **Cambiamenti non intenzionali**

Ulteriori cambiamenti introdotti nell'organismo rispetto a quelli che si intende generare

Dipendono dalla tecnica impiegata e dall'organismo target (piante, animali o microorganismi)

- **Effetti non intenzionali di cambiamenti intenzionali**

Effetti non previsti della modifica introdotta intenzionalmente

Dipendono da fattori ambientali e dall'interazione con altri geni

Fenomeni generali che possono avvenire con qualsiasi tecnica di breeding impiegata

Possono dipendere da modificazioni epigenetiche o da interazioni con altri geni





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

CRISPR-Cas

Effetti off-target



Off-target

On-target

Genotipo a mosaico

Alleli multipli

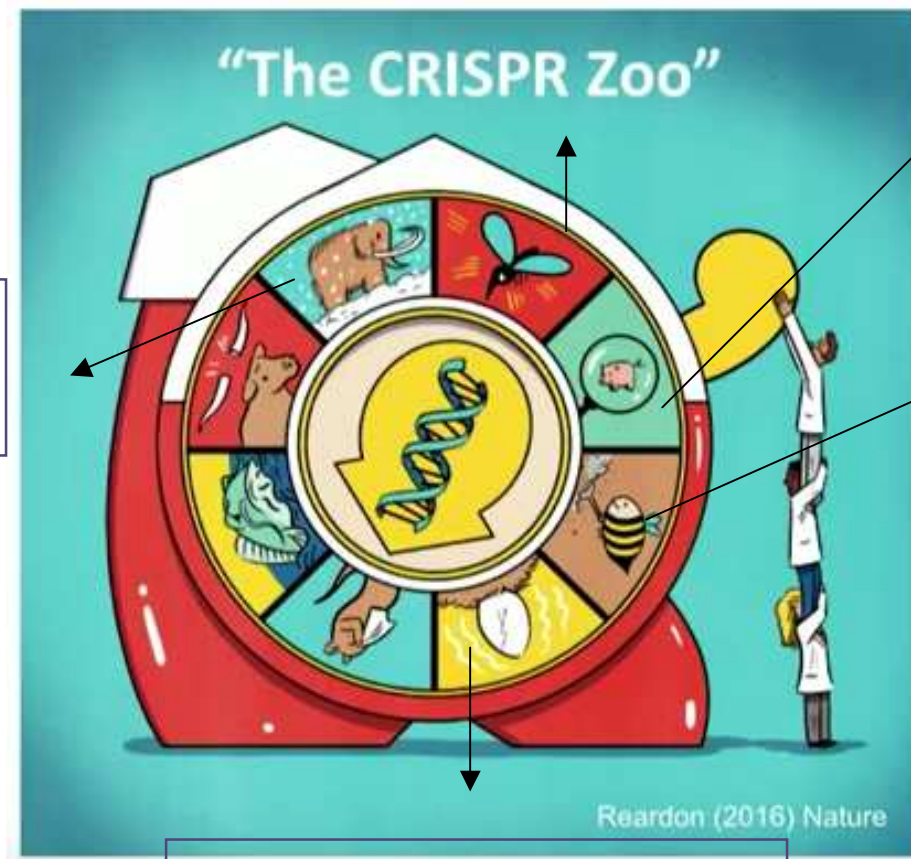
filler DNA mechanism



Prevenire la diffusione di malattie

Maggiore resistenza
alle malattie virali

Trasformazione
degli elefanti indiani
in via di estinzione



Comportamento delle api

Strategia verso gli Allergeni



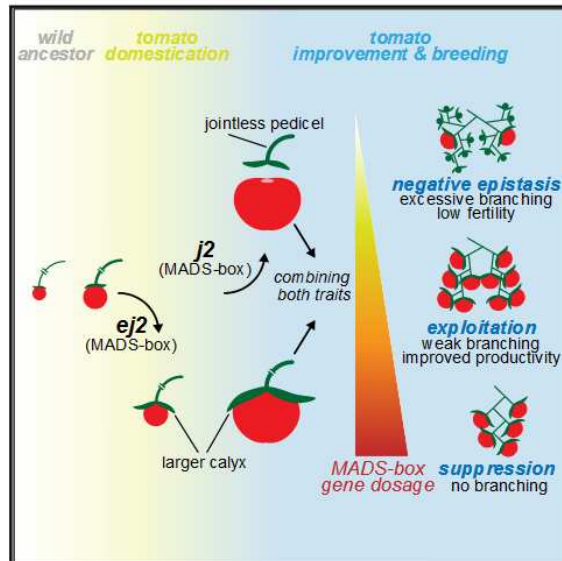
Article

Cell

May 18, 2017

Bypassing Negative Epistasis on Yield in Tomato Imposed by a Domestication Gene

Graphical Abstract



Authors

Sebastian Soyk, Zachary H. Lemmon,
Matan Oved, ..., Dani Zamir, Yuval Eshed,
Zachary B. Lippman

Correspondence

lippman@cshl.edu

In Brief

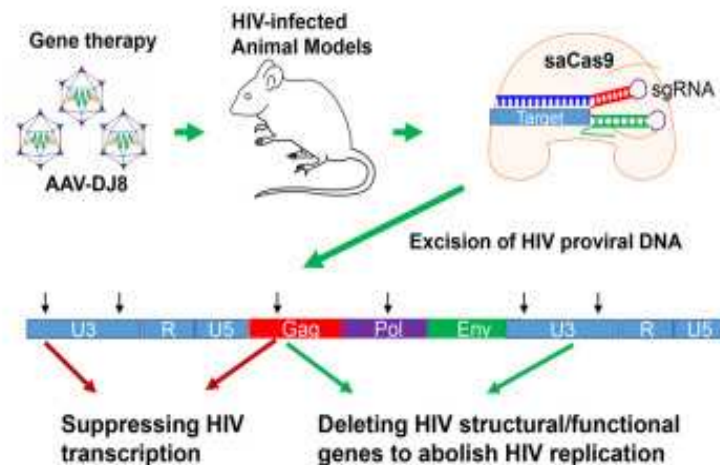
Why did a crop domestication gene hinder breeding with a modern breeding gene responsible for the beneficial "jointless" trait in tomato, and how can this genetic interaction be overcome and exploited?





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Applicazioni del sistema CRISPR-Cas9



Molecular Therapy

In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models

3 May 2017

Yin et al. use multiplex CRISPR/Cas9 genome editing technology to excise the HIV-1 provirus in a precise manner in three different HIV-1 animal models via *in vivo* AAV gene delivery. The feasibility of HIV excision in infected cells *in vivo* paves the way toward human clinical trials to cure HIV-1 infection.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

CRISPR e le linee germinali umane



nature

International journal of science

doi:10.1038/nature23305

Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos

Hong Ma^{1*}, Nuria Marti-Gutierrez^{1*}, Sang-Wook Park^{2*}, Jun Wu^{3*}, Yeonmi Lee¹, Keiichiro Suzuki³, Amy Koski¹, Dongmei Ji¹, Tomonari Hayama¹, Riffat Ahmed¹, Hayley Darby¹, Crystal Van Dyken¹, Ying Li¹, Eunju Kang¹, A.-Reum Park², Daesik Kim⁴, Sang-Tae Kim², Jianhui Gong^{5,6,7,8}, Ying Gu^{5,6,7}, Xun Xu^{5,6,7}, David Battaglia^{1,9}, Sacha A. Krieg⁹, David M. Lee⁹, Diana H. Wu⁹, Don P. Wolf¹, Stephen B. Heitner¹⁰, Juan Carlos Izpisua Belmonte^{3§}, Paula Amato^{1,9§}, Jin-Soo Kim^{2,4§}, Sanjiv Kaul^{10§} & Shoukhrat Mitalipov^{1,10§}

Nature **548**, 413–419 (24 August 2017)

doi:10.1038/nature23305

What about human germline editing?





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Prepublication Copy
Subject to Further Editorial Revisions

2017

HUMAN GENOME EDITING

Science, Ethics, and Governance

Committee on Human Gene Editing:
Scientific, Medical, and Ethical Considerations

A Report of
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES AND
NATIONAL ACADEMY OF MEDICINE





You don't get what you want
You get what you **work** for!!!

