

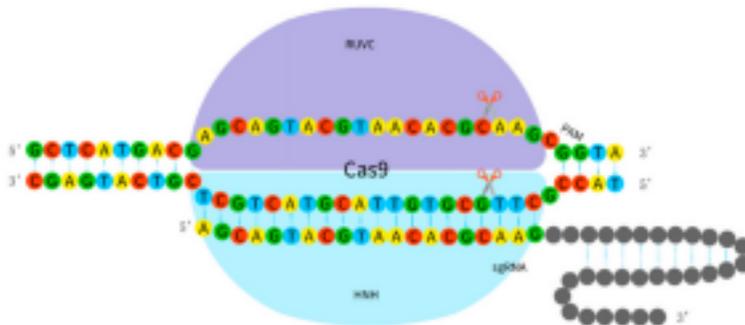


BLOOMING
Inclusion and Diversity in STEAM

CRISPR - Cas9

Riscrivendo il codice della vita

Come le forbici genetiche stanno rivoluzionando l'ingegneria genetica



https://commons.wikimedia.org/wiki/File:The_schematic_diagram_of_CRISPR-Cas9.webp

Abstract

CRISPR-Cas9, uno strumento rivoluzionario di editing genetico co-scoperto dalla Dott.ssa Jennifer Doudna e dalla Dott.ssa Emmanuelle Charpentier, ha trasformato la biologia molecolare. Questa tecnologia consente agli scienziati di apportare modifiche precise al DNA degli organismi viventi, aprendo nuove prospettive nella ricerca, nella medicina e nell'agricoltura. Il meccanismo si basa su una struttura a due RNA che guida la proteina Cas9 a introdurre rotture a doppio filamento nel DNA bersaglio. Questo articolo, in forma semplificata, illustra le loro ricerche, spiega il sistema CRISPR-Cas9 e ne analizza le profonde implicazioni.

PAROLE CHIAVE

CRISPR-Cas9: una tecnologia che permette di modificare con precisione il DNA.

Editing del genoma: il processo di alterazione del materiale genetico di un organismo.

RNA (acido ribonucleico): una molecola che svolge un ruolo fondamentale nella codifica, decodifica, regolazione ed espressione dei geni.

DNA (acido desossiribonucleico): la molecola che contiene le informazioni genetiche negli organismi viventi.

Introduzione

Le ricerche della Dott.ssa Jennifer Doudna e della Dott.ssa Emmanuelle Charpentier si concentrano su **CRISPR-Cas9**, uno strumento rivoluzionario per l'editing del genoma. CRISPR-Cas9 consente agli scienziati di effettuare tagli precisi nel DNA, permettendo di aggiungere, rimuovere o modificare materiale genetico in punti specifici del genoma. Questo strumento è spesso definito "*forbici genetiche*" per la sua capacità di tagliare i filamenti di DNA.

La scoperta di CRISPR-Cas9 è iniziata con lo studio dei sistemi immunitari dei batteri. Questi utilizzano le sequenze CRISPR per memorizzare i virus che li hanno attaccati in passato. Quando il virus colpisce nuovamente, i batteri producono segmenti di RNA a partire dalle sequenze CRISPR per guidare la proteina Cas9 verso il DNA del virus, dove viene effettuato un taglio che lo disattiva. Sfruttando questo sistema naturale, scienziati come la Dott.ssa Doudna e la Dott.ssa Charpentier hanno sviluppato un potente strumento di ingegneria genetica.

Metodi

La Dott.ssa Doudna e la Dott.ssa Charpentier, insieme ai loro colleghi, hanno ideato un sistema capace di sfruttare la risposta immunitaria dei batteri per realizzare un editing mirato del DNA in altri organismi. Il loro approccio ha previsto la sintesi di molecole di RNA in grado di guidare la proteina Cas9 verso specifiche sequenze di DNA all'interno di un genoma. Ecco una descrizione dettagliata del metodo:

1. Progettazione del gRNA (RNA guida):

- Hanno progettato molecole di RNA sintetico chiamate **guide RNA (gRNA)**, costituite da due parti: una sequenza complementare al DNA bersaglio (la parte "guida") e una sequenza a scaffold che si lega alla proteina Cas9.
- Questa struttura a doppio RNA garantisce che Cas9 venga indirizzata con precisione al punto desiderato del DNA.

2. Proteina Cas9:

- La proteina Cas9 è un enzima in grado di tagliare il DNA in punti specifici. Agisce come delle *forbici molecolari*, producendo una rottura a doppio filamento nel DNA laddove viene guidata dal gRNA.
- I ricercatori hanno purificato la proteina Cas9 dai batteri, rendendola disponibile per i loro esperimenti.

3. Esperimenti in vitro:

- Il team ha condotto esperimenti in provetta per verificare che il gRNA fosse in grado di guidare efficacemente Cas9 verso la sequenza di DNA bersaglio e produrre un taglio preciso.
- Sono state utilizzate diverse sequenze di DNA come bersaglio e si è osservata l'efficienza di taglio della proteina Cas9 quando diretta dal gRNA.

4. Test in vivo:

- Dopo la validazione in vitro, hanno testato il sistema CRISPR-Cas9 in cellule viventi, incluse cellule batteriche, vegetali e animali.

- Hanno introdotto nelle cellule il gRNA e la proteina Cas9, monitorando le modifiche al DNA risultanti.

5. Verifica:

- I ricercatori hanno utilizzato tecniche come il sequenziamento del DNA, la reazione a catena della polimerasi (PCR) e l'elettroforesi su gel per confermare che le sequenze di DNA bersaglio fossero state tagliate ed editate con precisione.
- Questi metodi hanno permesso di visualizzare e verificare le modifiche esatte apportate al DNA.

Women in STEM - Facts about the author.



https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Emmanuelle_Charpentier_and_Jennifer_Doudna.jpg

La Dott.ssa Jennifer Doudna è una rinomata biochimica, co-scopritrice della tecnologia di editing genetico CRISPR-Cas9. Ha conseguito il dottorato di ricerca presso la Harvard Medical School ed è attualmente professoressa presso l'Università della California, Berkeley. Il suo lavoro le è valso numerosi riconoscimenti, tra cui il Premio Nobel per la Chimica nel 2020. Le sue ricerche hanno contribuito in modo determinante ad ampliare la nostra comprensione dell'ingegneria genetica e delle sue potenziali applicazioni.

La Dott.ssa Emmanuelle Charpentier è una microbiologa di fama internazionale, co-scopritrice della tecnologia CRISPR-Cas9. Ha conseguito il dottorato di ricerca presso l'Institut Pasteur e ha lavorato in diversi istituti di ricerca in tutta Europa. Attualmente è Direttrice della Max Planck Unit for the Science of Pathogens a Berlino. Anche i suoi studi le hanno fruttato numerosi riconoscimenti, tra cui il Premio Nobel per la Chimica nel 2020, assegnato insieme alla Dott.ssa Doudna.

Risultati

Le ricerche condotte dalla Dott.ssa Doudna, dalla Dott.ssa Charpentier e dai loro collaboratori hanno evidenziato diversi risultati chiave:

Precisione di CRISPR-Cas9:

Il sistema CRISPR-Cas9 è in grado di effettuare tagli precisi a doppio filamento nel DNA in posizioni mirate. L'RNA guida ha diretto con accuratezza la proteina Cas9 verso la specifica sequenza di DNA, garantendo un'elevata specificità e riducendo al minimo gli effetti indesiderati (*off-target*).

Versatilità tra diversi organismi:

Il sistema si è dimostrato efficace in una grande varietà di organismi, tra cui batteri, piante, animali e cellule umane. Ciò ha dimostrato la versatilità di CRISPR-Cas9 come strumento universale per l'editing del genoma.

Editing genetico riuscito:

Nei batteri, i ricercatori sono riusciti a disattivare geni bersaglio, confermando così la funzionalità del sistema CRISPR-Cas9. Nelle cellule vegetali e animali sono stati in grado di introdurre mutazioni o correzioni specifiche nel DNA, evidenziando il potenziale sia per la ricerca sia per applicazioni terapeutiche.

Efficienza dei meccanismi di riparazione del DNA:

Discussione

Le ricerche condotte dalla Dott.ssa Doudna e dalla Dott.ssa Charpentier hanno implicazioni profonde in diversi ambiti:

- 1. Ricerca medica e terapie:**
CRISPR-Cas9 consente lo sviluppo di terapie geniche per il trattamento di malattie genetiche. Grazie alla possibilità di modificare con precisione i geni difettosi, gli scienziati possono potenzialmente curare patologie che in passato erano considerate incurabili.
- 2. Progressi in agricoltura:**
La tecnologia può essere utilizzata per migliorare la resilienza e la produttività delle colture, un aspetto cruciale per la sicurezza alimentare di fronte ai cambiamenti climatici e alla crescita della popolazione mondiale.
- 3. Considerazioni etiche:**
Sebbene CRISPR-Cas9 offra grandi prospettive, solleva anche importanti questioni etiche. La possibilità di modificare embrioni umani, ad esempio, potrebbe avere conseguenze impreviste e deve essere regolamentata con estrema cautela.

Dopo che il DNA viene tagliato da Cas9, entrano in azione i naturali meccanismi di riparazione del DNA della cellula. Questi possono essere sfruttati per introdurre modifiche genetiche precise. I ricercatori hanno osservato che le cellule utilizzano spesso la giunzione delle estremità non omologhe (NHEJ) o la riparazione guidata dall'omologia (HDR) per riparare le rotture, consentendo così sia la disattivazione di geni, sia l'inserimento di nuovo materiale genetico.

Applicazioni in medicina e agricoltura:

Le potenziali applicazioni di CRISPR-Cas9 sono vastissime.

- In medicina, la tecnologia ha mostrato grandi prospettive nella correzione di difetti genetici nelle cellule umane, aprendo la strada a potenziali terapie per le malattie genetiche.
- In agricoltura, ha reso possibile la creazione di colture con caratteristiche migliorate, come la resistenza alle malattie e profili nutrizionali potenziati.

Conclusione

Il lavoro pionieristico della Dott.ssa Jennifer Doudna e della Dott.ssa Emmanuelle Charpentier con CRISPR-Cas9 ha rivoluzionato l'ingegneria genetica. Questo potente strumento consente un editing del genoma preciso ed efficiente, aprendo nuove possibilità in medicina, agricoltura e ricerca. Man mano che gli scienziati continuano a esplorarne il potenziale, CRISPR-Cas9 promette di trasformare il nostro approccio ai disturbi genetici e di rafforzare la nostra capacità di affrontare le sfide globali.

Risorse :

- Articolo originale: 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*, 337(6096), 816-821. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6286148/pdf/nihms-995853.pdf>
- Nobel Prize. (2020). *Jennifer A. Doudna - Biographical*. Retrieved from <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/doudna/biographical/> -
- Ledford, H. (2015). CRISPR, the disruptor. *Nature*, 528, 469-470. <https://doi.org/10.1038/528469a>

Domande di riflessione:

1. Qual è la funzione principale di CRISPR-Cas9?

- a) Creare nuove proteine.
- b) Tagliare il DNA in punti specifici.
- c) Replicare il DNA.
- d) Sequenziare il DNA.

Risposta corretta: b) Tagliare il DNA in punti specifici.

2. In che modo gli RNA guida assistono la proteina Cas9?

- a) Replicano il DNA.
- b) Si legano al DNA per prevenire mutazioni.
- c) Guidano la proteina Cas9 verso la sequenza bersaglio del DNA.
- d) Disattivano la proteina Cas9.

Risposta corretta: c) Guidano la proteina Cas9 verso la sequenza bersaglio del DNA.

3. Quali sono alcune possibili applicazioni di CRISPR-Cas9 in medicina?

- a) Creare nuove malattie.
- b) Sviluppare terapie geniche per curare disturbi genetici.
- c) Aumentare la durata della vita delle cellule.
- d) Potenziare le abilità fisiche.

Risposta corretta: b) Sviluppare terapie geniche per curare disturbi genetici.

4. Perché è importante regolamentare l'uso della tecnologia CRISPR-Cas9?

- a) Per assicurarne l'uso solo in ambito agricolo.
- b) Per prevenire abusi e affrontare le questioni etiche.
- c) Per limitarne l'uso a specifiche aree geografiche.

o d) Per aumentarne i costi.

Risposta corretta: b) Per prevenire abusi e affrontare le questioni etiche.

Schema di Lezione / Idea

Titolo:

Esplorando CRISPR-Cas9: attività pratiche per comprendere l'editing genetico

Obiettivo:

Aiutare gli studenti a capire i fondamenti della tecnologia CRISPR-Cas9, il suo funzionamento e le sue applicazioni, attraverso attività interattive e coinvolgenti.

Materiali:

- Fili colorati o strisce di carta (per rappresentare i filamenti di DNA e RNA)
- Pennarelli (per etichettare le diverse regioni dei filamenti)
- Forbici (per simulare i tagli del DNA)
- Nastro adesivo o colla (per unire i filamenti)
- Un grande foglio di carta o una lavagna bianca per il lavoro di gruppo
- Copie di articoli semplificati e casi di studio sulle applicazioni di CRISPR-Cas9

Attività:

1. Introduzione a CRISPR-Cas9 (15 minuti)

- **Discussione:** breve introduzione alla tecnologia CRISPR-Cas9, spiegando come funziona e le sue potenziali applicazioni in medicina, agricoltura e ricerca.
- **Video:** visione di un breve filmato che spieghi in modo visivo e semplice CRISPR-Cas9.

2. Modellare il funzionamento di CRISPR-Cas9 (30 minuti)

- **Preparazione dei filamenti:** usare fili o strisce di carta colorata per rappresentare DNA e RNA, etichettando un'estremità come "sequenza bersaglio" e l'altra come "RNA guida".

- Simulazione del taglio: mostrare come l'RNA guida indirizza Cas9 alla sequenza bersaglio del DNA, indicando con i pennarelli i punti di taglio.
- Attività di gruppo: dividere gli studenti in piccoli gruppi, fornendo loro i materiali per creare un modello visivo del processo CRISPR-Cas9.

3. Analisi di casi di studio (25 minuti)

- Lavoro di gruppo: assegnare a ciascun gruppo un caso studio diverso, ad esempio:
 - Uso di CRISPR per curare malattie genetiche (es. anemia falciforme)
 - Sviluppo di colture resistenti ai parassiti
 - Possibile uso di CRISPR per potenziare tratti in animali
- Ricerca e discussione: ogni gruppo approfondisce gli aspetti scientifici e le applicazioni reali, con l'aiuto di articoli forniti dall'insegnante.
- Preparazione della presentazione: i gruppi preparano una breve relazione per la classe.

4. Presentazioni dei gruppi (20 minuti)

- Presentazione: ciascun gruppo illustra il proprio caso, spiegando:
 - contesto e rilevanza del caso
 - come è stato utilizzato CRISPR-Cas9
 - risultati e possibili applicazioni future
- Discussione: spazio per domande e confronto dopo ogni presentazione.

5. Esperimento pratico di estrazione del DNA (20 minuti)

- Preparazione: fornire il materiale per un semplice esperimento di estrazione del DNA da frutta (es. fragole o banane).

- **Materiali:** frutta fresca, sapone per piatti, sale, acqua, alcol denaturato freddo, sacchetti di plastica, filtri da caffè, bicchieri trasparenti o provette, bastoncini di legno.
- **Procedura:**
 1. Schiacciare la frutta in un sacchetto.
 2. Aggiungere acqua, sapone e sale, mescolando bene.
 3. Filtrare il composto con un filtro da caffè.
 4. Versare lentamente l'alcol freddo lungo la parete del bicchiere.
 5. Osservare la precipitazione del DNA nello strato alcolico.
 6. Raccogliere il DNA con un bastoncino di legno.
- **Discussione:** riflettere su ciò che gli studenti hanno osservato e collegarlo al ruolo del DNA nell'ingegneria genetica.

6. Conclusione e riflessione (10 minuti)

- **Sintesi:** ripercorrere i concetti chiave della lezione e sottolineare l'importanza di CRISPR-Cas9 e delle sue applicazioni.
- **Riflessione personale:** invitare gli studenti a scrivere un breve paragrafo su ciò che hanno imparato e su cosa pensano dell'uso di questa tecnologia.