

MICROBIOLOGIA GENERALE

**The prokaryotic “immune”
system**

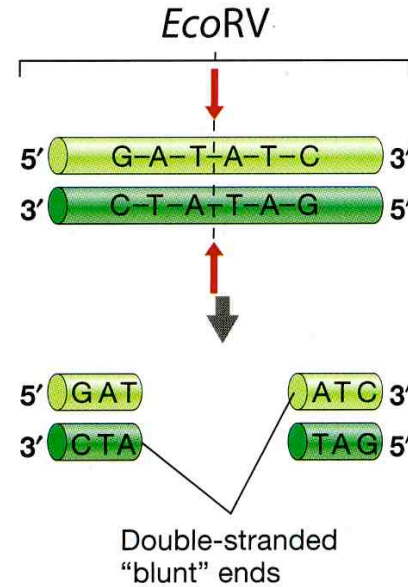
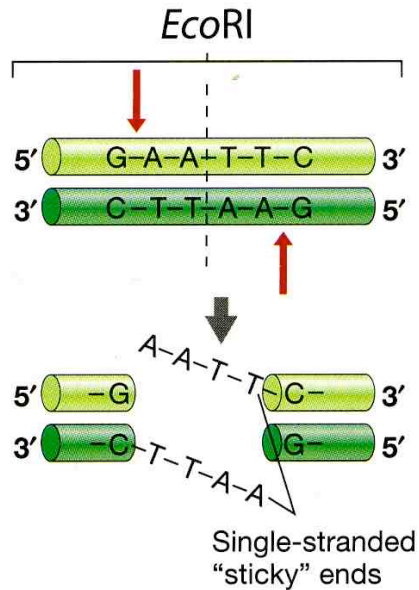
The need of immunity in prokaryotes

- ✓ Viruses are by far the most abundant “life” form in the world’s oceans (4×10^{30} viruses) exceeding prokaryotic abundance by at least one order of magnitude.
- ✓ How do prokaryotes survive in such a hostile environment?
- ✓ The prokaryotic “**immune**” system consists of self-protecting mechanisms that provide immunity against external DNA, such as virus genome or plasmids.
- ✓ The ***Restriction-Modification (R-M)*** systems as “intrinsic immune” responses.
- ✓ The ***CRISP-CAS*** systems as “adaptive immune” responses.

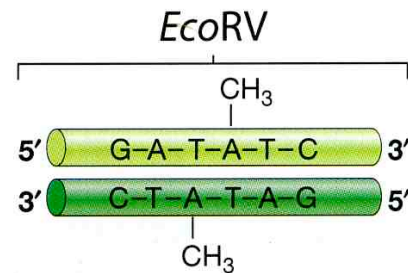
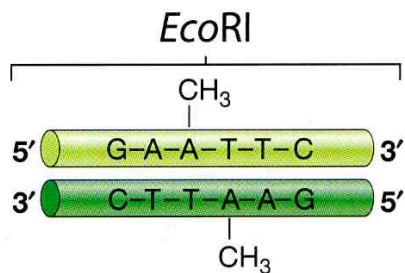
The prokaryotic Restriction-Modification Systems

- ✓ A **restriction enzyme** or **restriction endonuclease (R.E.)** is an enzyme that cuts DNA at or near specific recognition nucleotide sequences known as restriction sites.
- ✓ These enzymes are found in free living Bacteria and Archaea and provide an “**innate**” defense mechanism against invading viruses. It is generally accepted that this is their role in nature.
- ✓ Inside a prokaryote, the R.E. selectively cut up foreign DNA in a process called restriction.
- ✓ Meanwhile, host DNA is protected from cleavage by a modification enzyme (**DNA-methyl transferases**) that modifies the prokaryotic DNA and prevents the cleavage.
- ✓ R.Es. usually occur in combination with one or two modification enzymes. Modification enzymes recognize the same DNA sequence as the R.E. that they accompany.
- ✓ Together, a R.E. and its “cognate” modification enzyme(s) form a **Restriction-Modification (R-M)** system.
- ✓ R.E are classified in types (I-IV) on the basis of subunit composition, cleavage position, sequence specificity, and cofactor requirement.
- ✓ Over 3000 R.E.s have been studied in detail, and more than 600 of these are available commercially.

An example of R.Ms: the *EcoRI* and *EcoRV* systems of *E. coli*

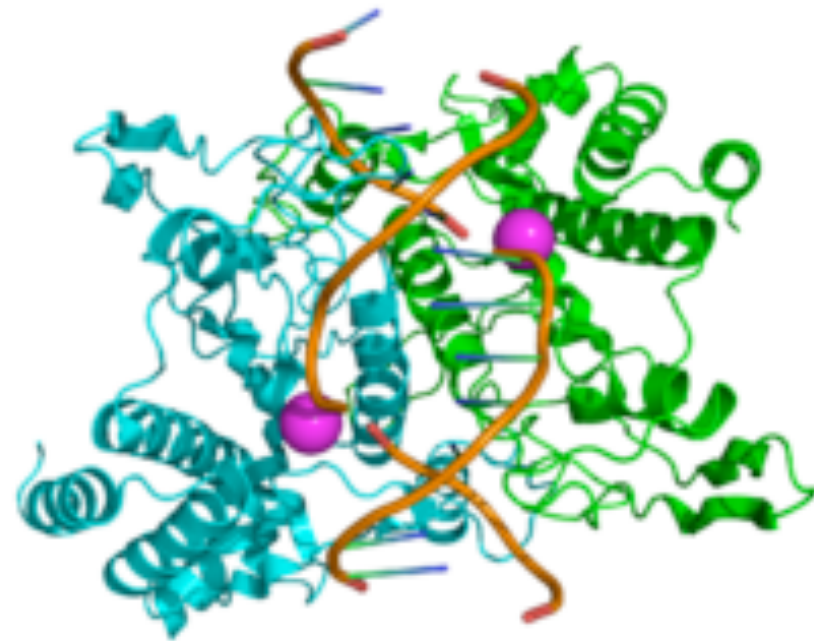
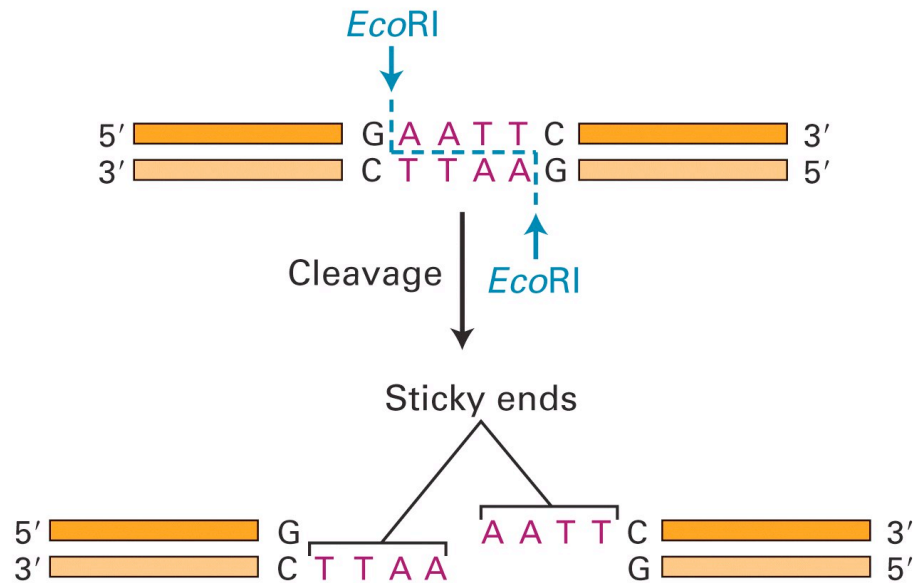


(a)



(b)

- ✓ To cut DNA, *EcoRI* and *EcoRV*, as all R.E. make two incisions, once through each sugar-phosphate backbone (i.e. each strand) of the DNA double helix.
- ✓ The *EcoRI* and *EcoRV* methyltransferase methylate one of the bases in each DNA strands.
- ✓ The methyl group protrudes into the major groove of DNA at the binding site and prevent the R.E. from acting upon it.



Derivation of the *EcoRI* name

Abbreviation	Meaning	Description
<i>E</i>	<i>Escherichia</i>	genus
<i>co</i>	<i>coli</i>	specie
<i>R</i>	RY13	strain
<i>I</i>	1st identified	order of identification in the bacterium



RESTRICTION ENDONUCLEASES

HincII



NEBuffer	1.1	2.1	3.1	CutSmart
% Activity	25	100	100	100

#R0103S 1,000 units
#R0103L 5,000 units

Features: Recombinant, Time-Saver

Concentration: 10,000 units/ml

Reaction Conditions: NEBuffer 3.1, 37°C.
Heat inactivation: 65°C for 20 minutes.

Methylation Sensitivity: Cleavage of mammalian genomic DNA is blocked by some combinations of overlapping CpG methylation (see p. 319).



HindIII



NEBuffer	1.1	2.1	3.1	CutSmart
% Activity	25	100	50	50

#R0104S 10,000 units
#R0104L 50,000 units
for high (5X) concentration
#R0104T 10,000 units
#R0104M 50,000 units

Features: Recombinant

Methylation Sensitivity: Not sensitive to *dam*, *dcm* or mammalian CpG methylation.

Reaction Conditions: NEBuffer 2.1, 37°C.
Heat inactivation: 80°C for 20 minutes.

Note: Star activity may result from extended digestion.

Concentration: 20,000 and 100,000 units/ml



HindIII-HF



NEBuffer	1.1	2.1	3.1	CutSmart
% Activity	10	100	10	100

#R3104S 10,000 units
#R3104L 50,000 units
for high (5X) concentration
#R3104T 10,000 units
#R3104M 50,000 units

Features: CutSmart, Recombinant, Engineered, Time-Saver, High-Fidelity

Concentration: 20,000 and 100,000 units/ml

Reaction Conditions: CutSmart Buffer, 37°C.
Heat inactivation: 80°C for 20 minutes.

Methylation Sensitivity: Not sensitive to *dam*, *dcm* or mammalian CpG methylation.



HinfI



NEBuffer	1.1	2.1	3.1	CutSmart
% Activity	50	100	100	100

#R0155S 5,000 units
#R0155L 25,000 units
for high (5X) concentration
#R0155T 5,000 units
#R0155M 25,000 units

Features: CutSmart, Recombinant, Time-Saver

Methylation Sensitivity: Cleavage of mammalian genomic DNA is blocked by some combinations of overlapping CpG methylation (see p. 319).

Reaction Conditions: CutSmart Buffer, 37°C.
Heat inactivation: 80°C for 20 minutes.

Concentration: 10,000 and 50,000 units/ml



La caccia alla materia oscura sotto il Gran Sasso

G.G.

Aprile 2016

€ 4,50

Le Scienze

www.lescienze.it

edizione italiana di Scientific American

Genomi su misura

La CRISPR, una nuova rivoluzionaria tecnica, permette di modificare i geni con precisione e facilità

Astronomia

Il mistero del pianeta X ai confini del sistema solare

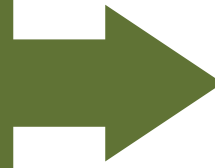
Etologia

Gli animali sanno come nascono i bambini?

POSTE ITALIANE SPED. IN A.P. - D.L. 353/2003 CONV. L. 46/2004, ART. 1, C. 1, DDEB - ROMA - RIVISTA MENSILE - NUMERO 572



Suggested reading





L'enzima che rivoluziona la genetica

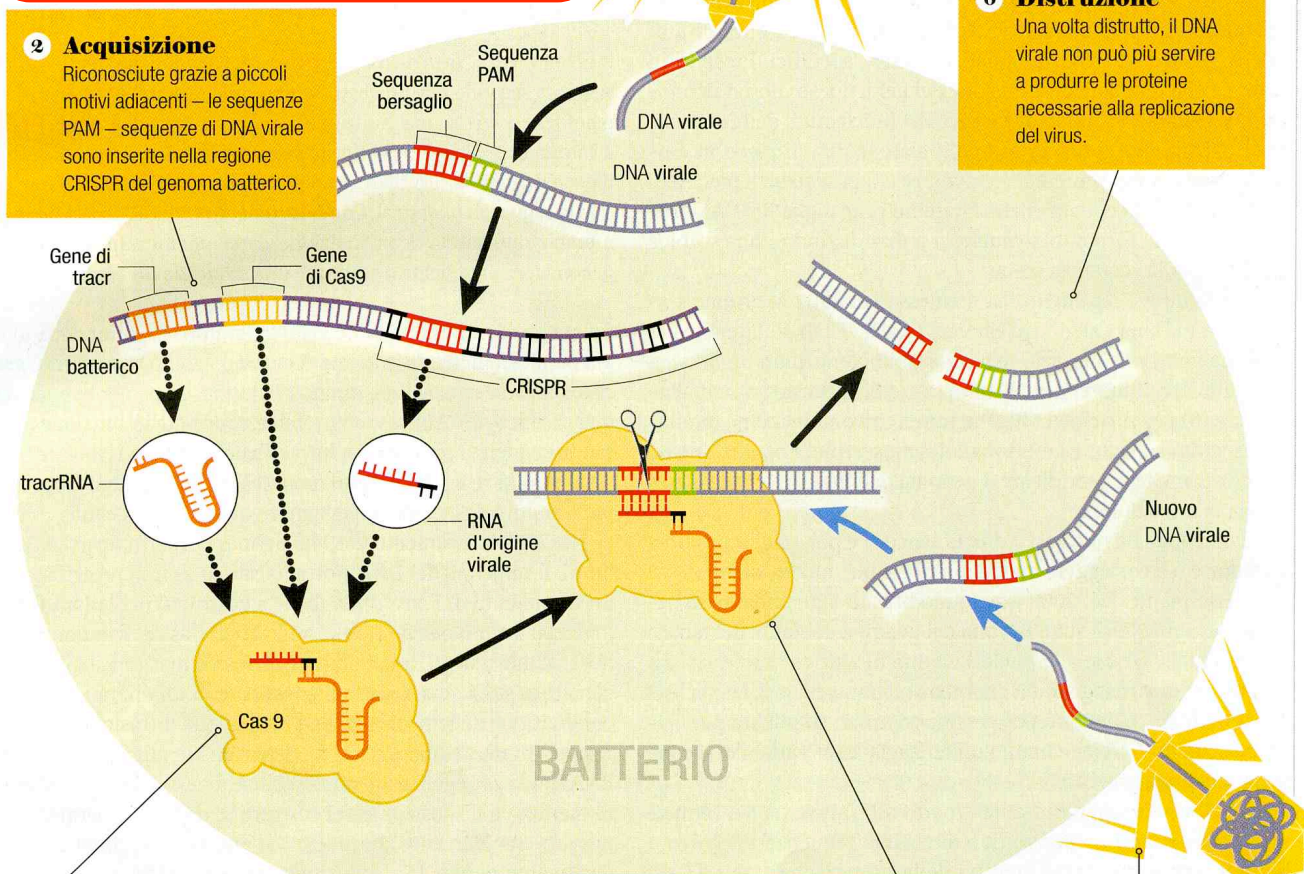
Il sistema immunitario di difesa dei batteri CRISPR-Cas9 è uno strumento preciso, semplice e universale per modificare a piacere i geni in qualsiasi tipo di cellula

di Emmanuelle Charpentier e Pierre Kaldy

UN'ARMA CONTRO I VIRUS

Come il sistema CRISPR-Cas9 protegge il batterio

Grazie al sistema CRISPR-Cas9, numerosi batteri riconoscono un virus che li ha già infettati e ne contrastano l'attacco. Simile a una biblioteca, CRISPR è una regione del genoma batterico dove, durante un attacco virale, il batterio accumula sequenze di DNA del virus stesso. Nel caso di un attacco successivo, l'enzima Cas9, guidato da due RNA, riconoscerà il nuovo DNA virale introdotto e lo disattiverà, tagliandolo.



1 Infezione
Un virus (batteriofago) inietta il suo DNA nel batterio.

6 Distruzione
Una volta distrutto, il DNA virale non può più servire a produrre le proteine necessarie alla replicazione del virus.

2 Acquisizione
Riconosciute grazie a piccoli motivi adiacenti – le sequenze PAM – sequenze di DNA virale sono inserite nella regione CRISPR del genoma batterico.

4 Maturazione di Cas9
Nel caso di un attacco virale, si attivano la regione CRISPR e una regione adiacente. Sono prodotti l'enzima Cas9 e un frammento di RNA, tracrRNA, oltre a un RNA per ciascuna sequenza virale registrata in CRISPR. Cas9 forma un complesso con tracr e con ciascun RNA virale.

5 Riconoscimento
L'enzima Cas9 riconosce la sequenza PAM sul DNA estraneo e poi, grazie ai suoi due RNA guida, una sequenza più lunga che lui stesso taglia a una distanza precisa da PAM (tre nucleotidi).

3 Nuova infezione
Un virus già incontrato inietta il suo DNA nel batterio.

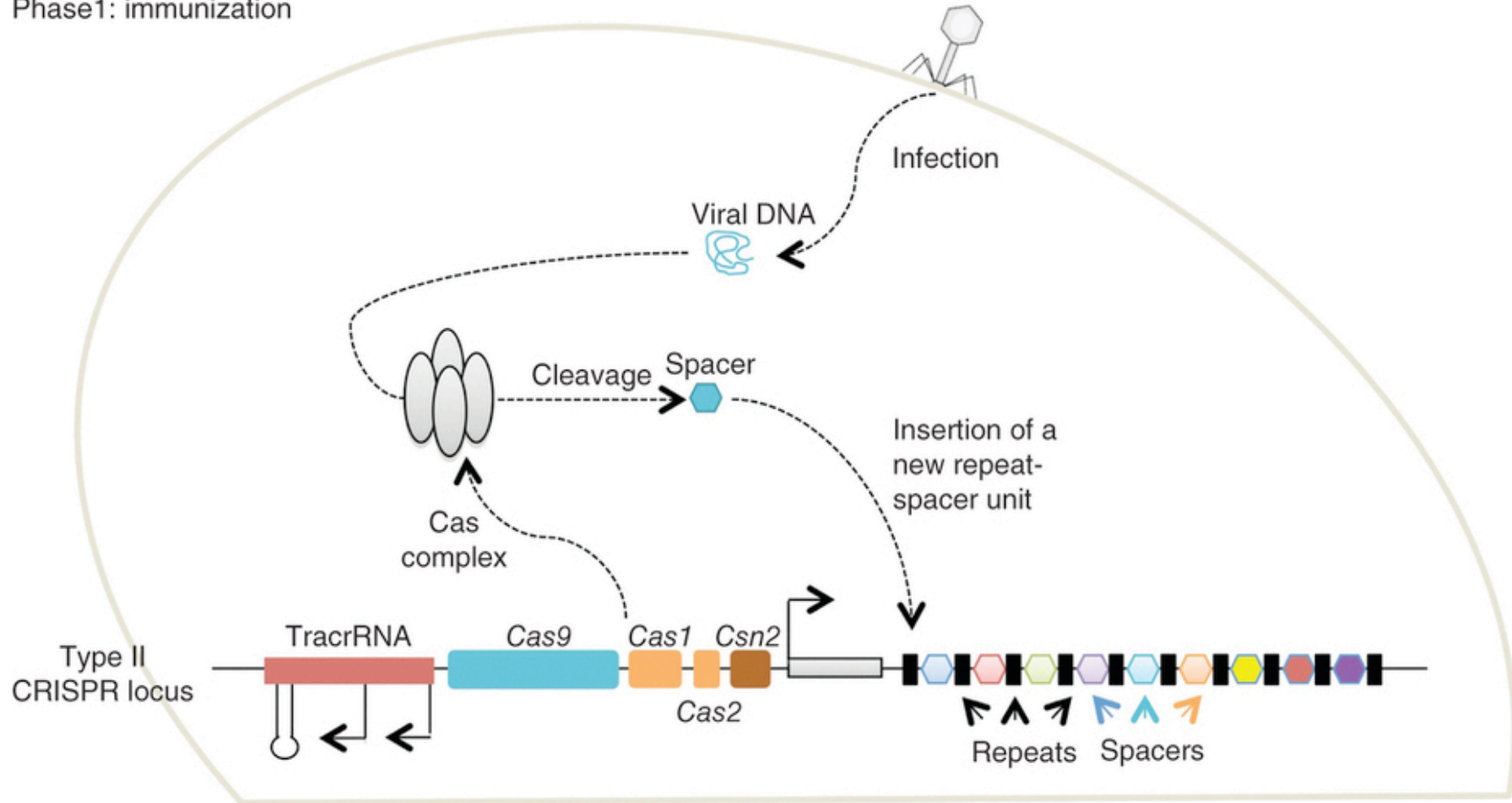
The **CRISP CAS** system

- ✓ In Bacteria and Archaea the **CRISPR*/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated system)** is a self-protecting mechanism against external DNA, such as virus genome or plasmids.
- ✓ It uses **CAS complex** to cut the external viral or plasmid DNA and integrating a short DNA segment into the **CRISPR** loci in the genome.
- ✓ This short DNA segment will be transcribed into **pre-crRNA** and bind to another CAS endonuclease called **Cas9** with the help of **tracrRNA**.
- ✓ The Cas9 endonuclease cuts the external DNA in the existence of not only **crRNA** but also a special recognizing sequence at the 3' end of the target DNA called **PAM (Protospacer Adjacent Motif)**.
- ✓ When the same external DNA invades next time, the **Cas9-tracrRNA-crRNA** complex will recognize and cut it in order to destroy its biological activity.

* Brevi ripetizioni palindromiche raggruppate e separate a intervalli regolari

The **CRISP CAS** system

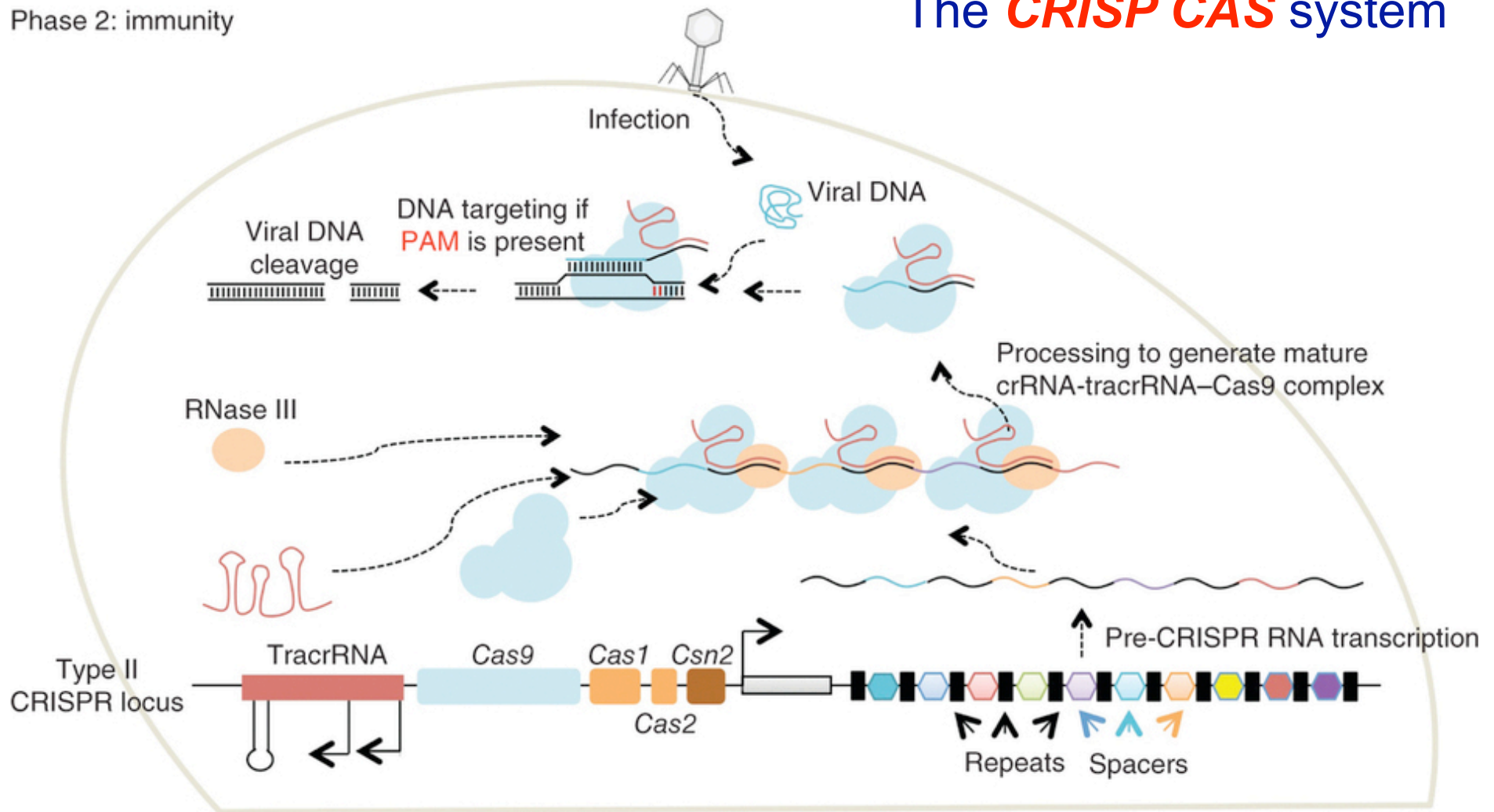
Phase 1: immunization



Phase 1: in the *immunization* phase, the CRISPR system stores the molecular signature of a previous infection by integrating fragments of invading phage or plasmid DNA into the CRISPR locus as '**spacers**'.

Phase 2: immunity

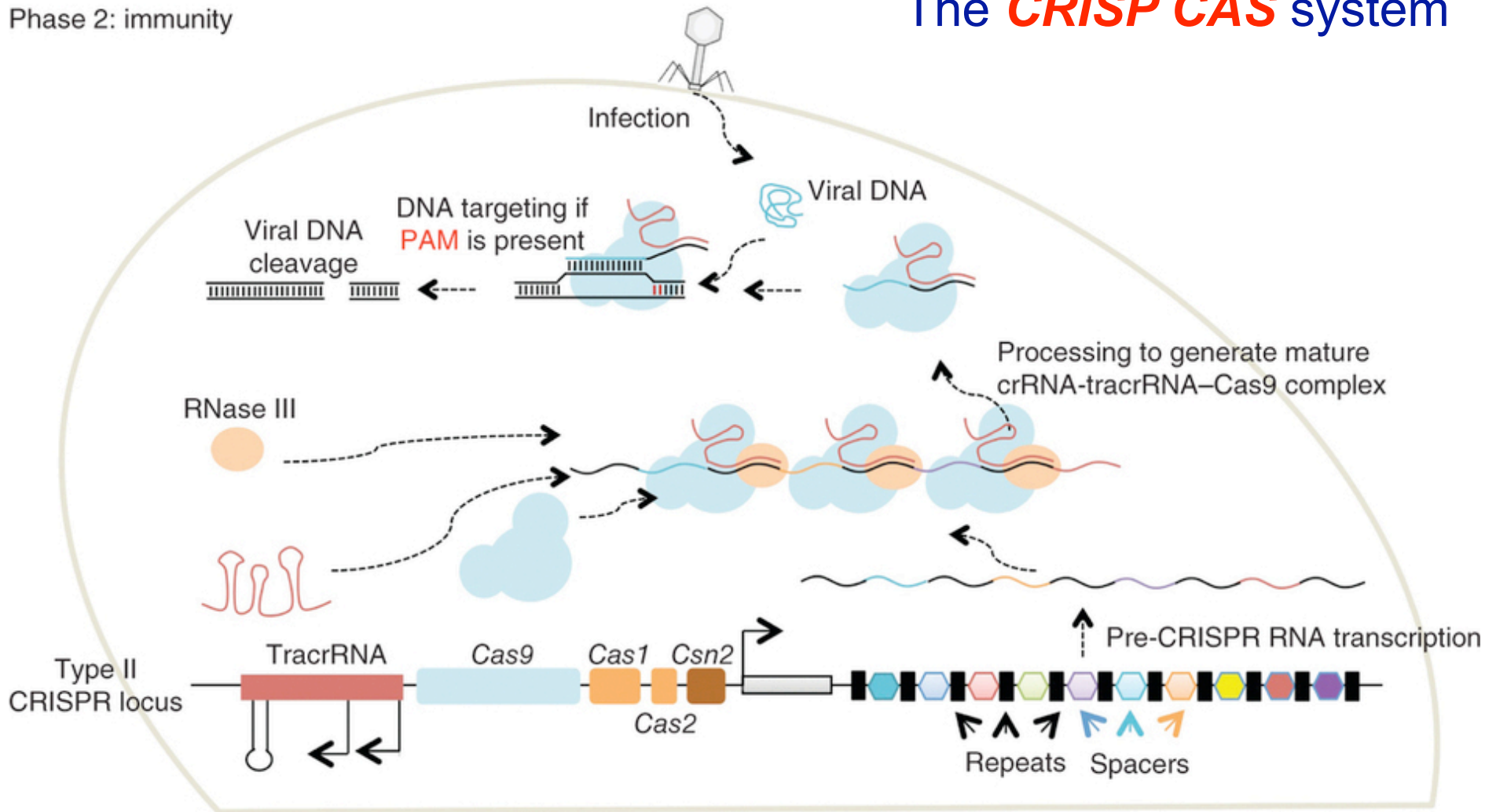
The **CRISP CAS** system



Phase 2: in the *immunity phase*, the bacterium uses this stored information to defend against invading pathogens by transcribing the locus and processing the resulting transcript to produce CRISPR RNAs (**crRNAs**) that guide effector nucleases to locate and cleave nucleic acids complementary to the spacer.

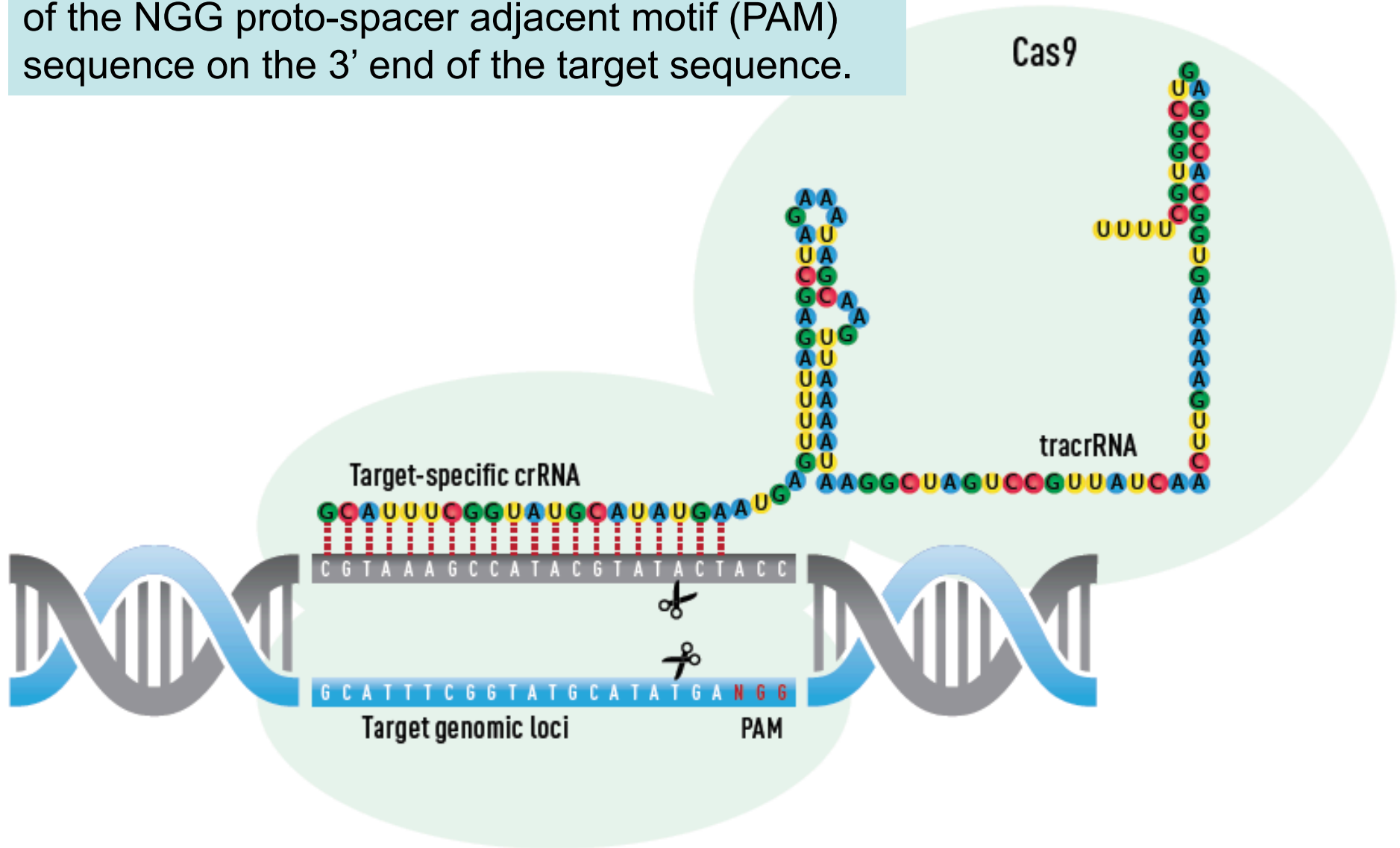
Phase 2: immunity

The **CRISP CAS** system



Phase 2: in the **immunity phase**, **tracrRNAs** hybridize to repeat regions of the **pre-crRNA**. Then, endogenous RNase III cleaves the hybridized **crRNA-tracrRNA**, and a second event removes the 5' end of the spacer, yielding mature **crRNAs** that remain associated with the **tracrRNA** and **Cas9**. The complex cleaves complementary '**protospacer**' sequences only if a **PAM** sequence is present.

A CRISPR/Cas9 targeted double-strand break. Cleavage occurs on both strands, 3 bp upstream of the NGG proto-spacer adjacent motif (PAM) sequence on the 3' end of the target sequence.



Genome editing

- ✓ Genome editing is a precise, site-specific DNA modification in a live cell.
- ✓ Genome editing involves the use of engineered nucleases, in conjunction with endogenous repair mechanisms, to insert, delete, or replace DNA sequences from a specific location in genomic DNA
- ✓ The ability to edit the genome in a precise and targeted manner can be used to provide a more comprehensive understanding of biology and disease mechanisms.
- ✓ Genome editing has a variety of applications, such as creating disease-resistant transgenic plants, stem cell engineering, and gene therapy, and is also widely used in creating tissue and animal disease model.

Genome editing

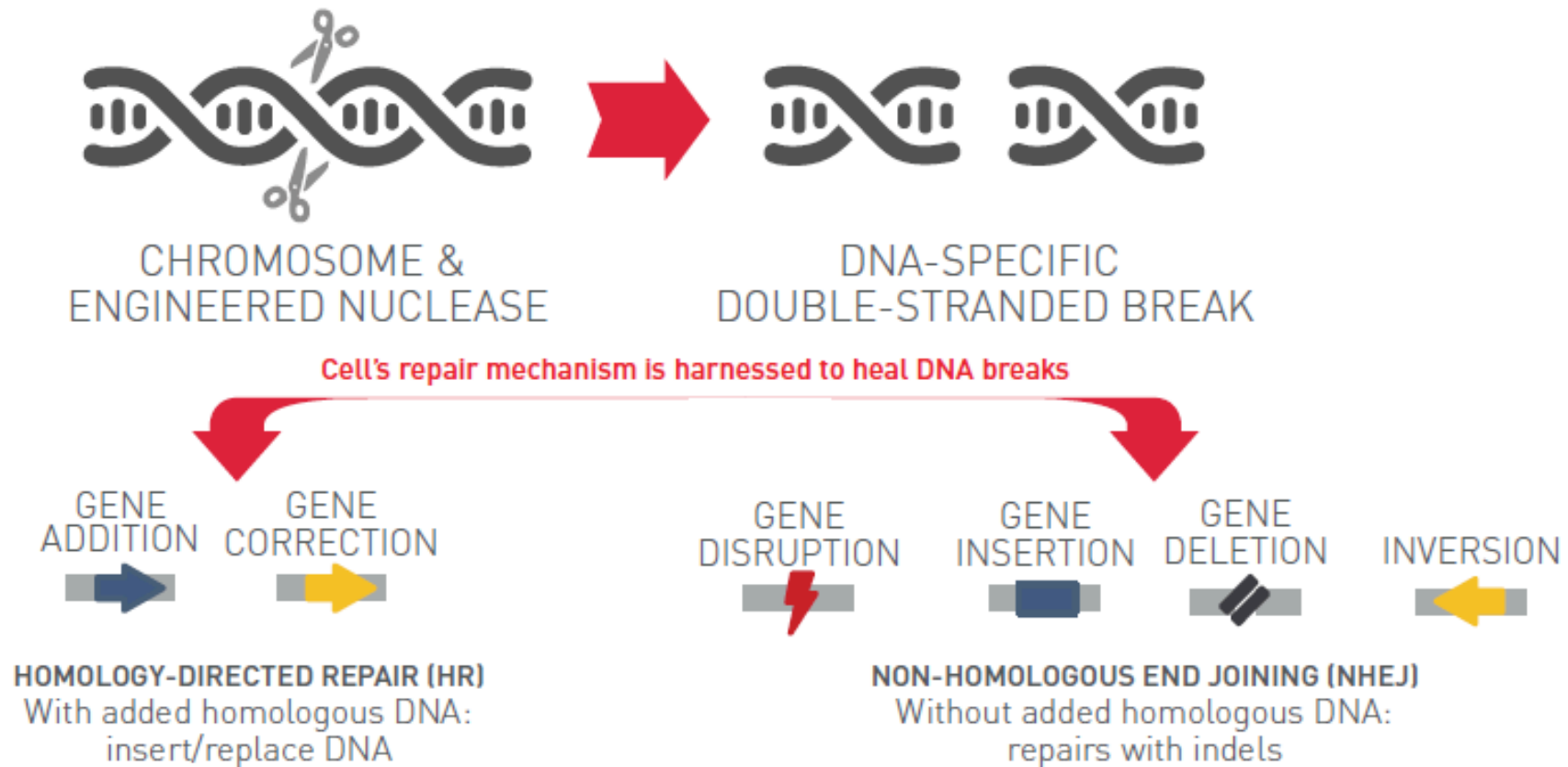


Figure 1. Engineered nuclease-mediated genome editing. Engineered nucleases such as the CRISPR-Cas9 or TAL effectors can be designed to target specific sites in the genome, creating double-strand breaks (DSBs) at desired locations. The natural repair mechanisms of the cell repair the break by either homologous recombination (HR) or non-homologous end joining (NHEJ). HR is more precise, since it requires a template, allowing the introduction of foreign DNA into the target gene. Homologous DNA "donor sequences" can be used with homology-directed repair (HDR) to introduce a defined new DNA sequence. DSB repair by NHEJ is likely to introduce errors such as insertions or deletions (indels), leading to a nonfunctional gene.



GENETICA

L'enzima che rivoluziona la genetica

Il sistema immunitario di difesa dei batteri CRISPR-Cas9 è uno strumento preciso, semplice e universale per modificare a piacere i geni in qualsiasi tipo di cellula

di Emmanuelle Charpentier e Pierre Kaeley

Genome editing by CRISPR-Cas

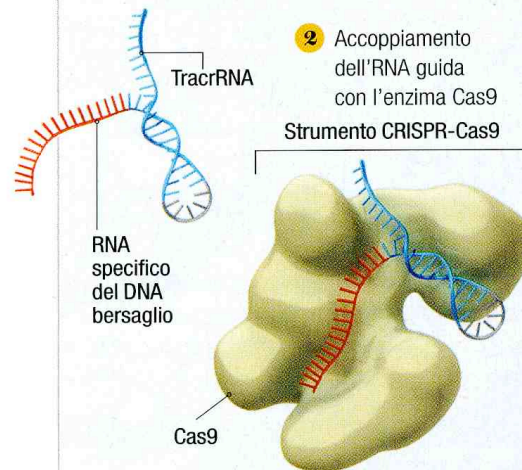
PRECISO, SEMPLICE ED EFFICACE

Come funziona lo strumento CRISPR-Cas9

I batteri hanno sviluppato un'arma precisa ed efficace, CRISPR-Cas9, contro le invasioni virali. I biologi l'hanno sfruttata per farne forbici molecolari che tagliano, nelle cellule, il DNA in un sito bersaglio. Contrariamente ai metodi precedenti per modificare il genoma, i quali richiedono enzimi spe-

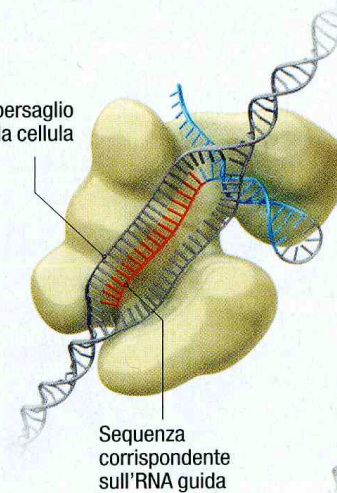
cifici in ciascuna situazione, lo strumento CRISPR-Cas9 utilizza la stessa proteina, l'enzima Cas9, per ogni situazione. Il solo elemento specifico da costruire è un RNA, che guida l'enzima Cas9 nel punto del genoma da tagliare. E gli RNA sono molto più semplici da sintetizzare degli enzimi.

- 1 Costruzione di un RNA guida per fusione delle sequenze di un RNA batterico (tracrRNA) e di un RNA specifico (complementare) della sequenza del DNA bersaglio.

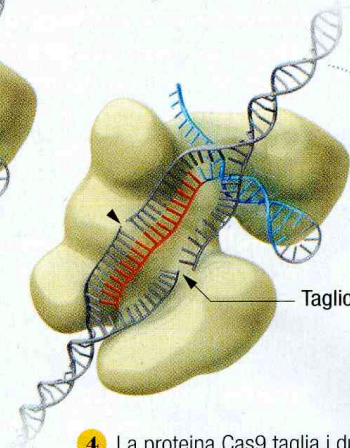


- 2 Accoppiamento dell'RNA guida con l'enzima Cas9

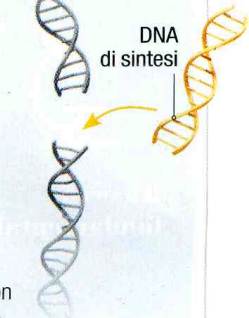
DNA bersaglio nella cellula



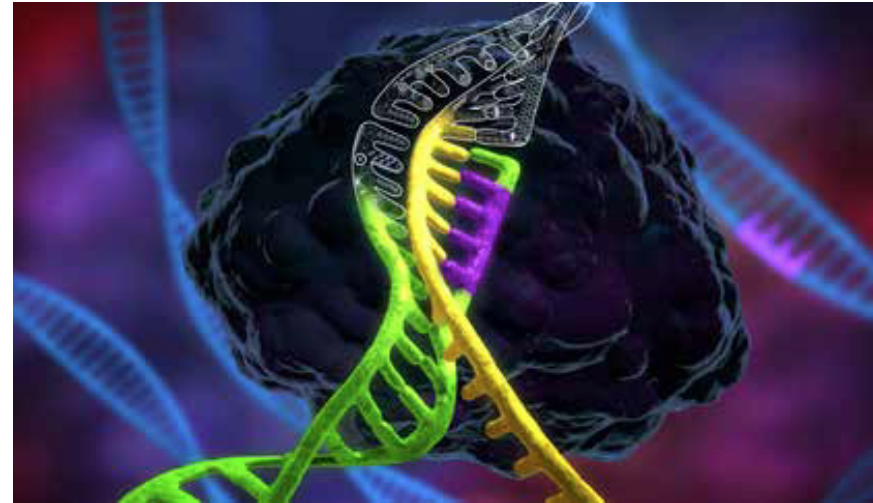
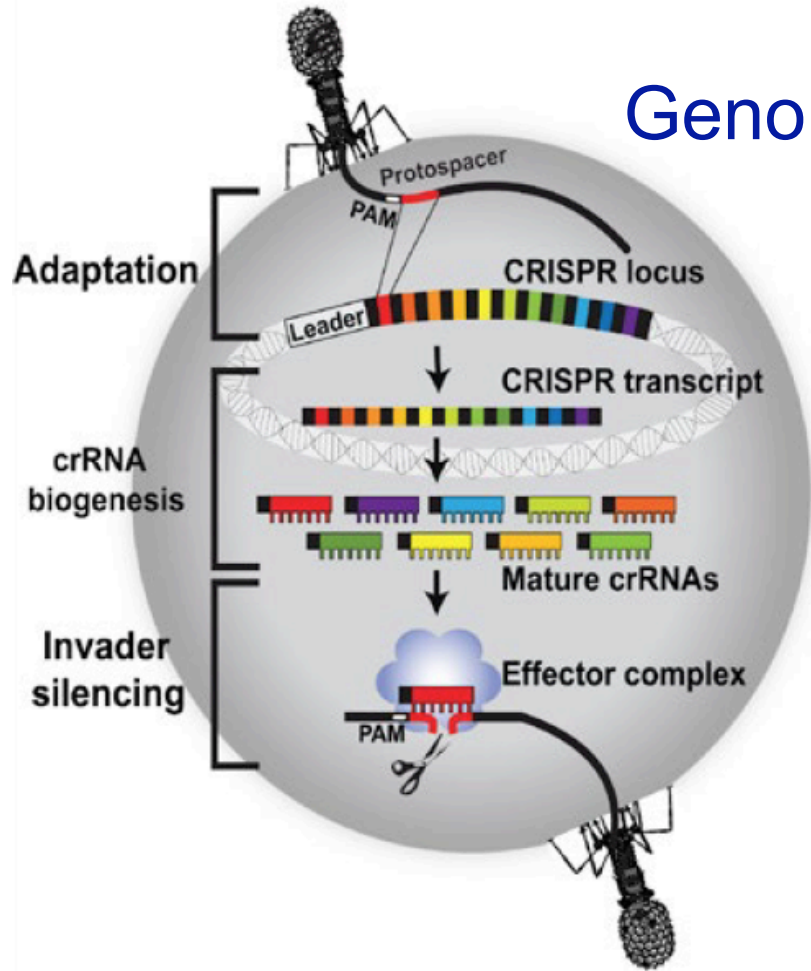
- 3 Introduzione nella cellula dello strumento CRISPR-Cas9. Cas9, con l'RNA guida, trova la sequenza del DNA bersaglio.



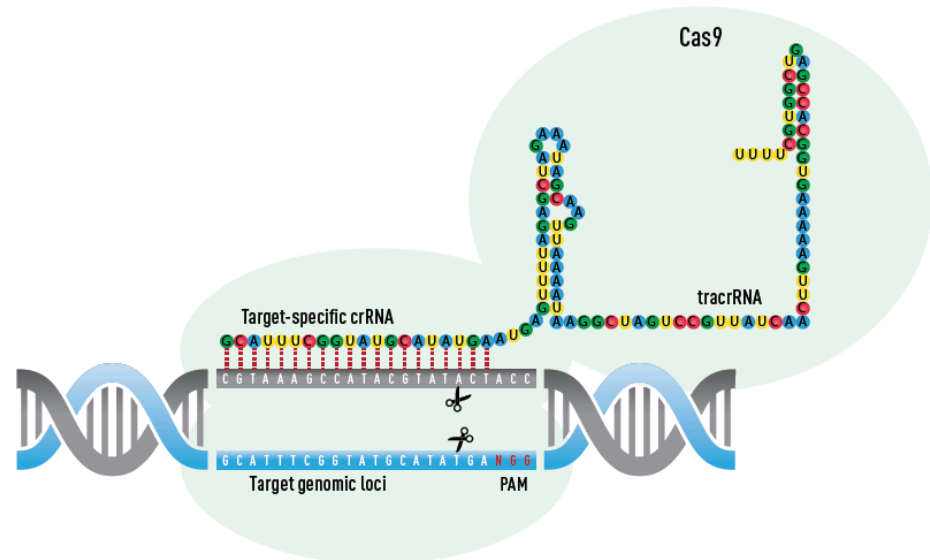
- 4 La proteina Cas9 taglia i due filamenti di DNA in un sito preciso. Il DNA può essere riparato per ricombinazione con un DNA omologo sintetizzato e iniettato nella cellula.



Genome editing by CRISPR-Cas



The specificity is supplied by the guide RNA (gRNA), and changing the target only requires a change in the design of the guide RNA. After the guide RNA has guided the Cas9 nuclease to a specific genomic locus, the cas9 protein induces a double-stranded break (DSB) at the specific target sequence.





L'enzima che rivoluziona la genetica

Il sistema immunitario di difesa dei batteri CRISPR-Cas9 è uno strumento preciso, semplice e universale per modificare a piacere i geni in qualsiasi tipo di cellula

di Emmanuelle Charpentier e Pierre Kaldy

I percorsi esplorati con Cas9

Permettendo di modificare uno o più geni contemporaneamente e in ogni tipo cellulare, il sistema CRISPR-Cas9 apre infinite possibilità che i biologi stanno cominciando a esplorare nei campi più diversi: agricoltura, ricerca fondamentale, terapia genica, sintesi di biocarburanti o di farmaci. Ecco alcuni esempi di lavori pionieristici già realizzati con l'enzima Cas9.



Agricoltura

Piante resistenti

Il gruppo di Caixia Gao e Jin-Long Qiu, dell'Accademia delle scienze di Pechino, ha prodotto nel 2014 un frumento tenero mutante che resiste a un fungo parassita, l'oidio del grano. Ha disattivato le sei forme di un gene sensibile a questo fungo e la pianta così modificata ha resistito al parassita. Lo strumento usato non era Cas9, ma un'altra forbice molecolare, TALEN. I biologi precisano però di avere ottenuto risultati preliminari confrontabili con Cas9. Il metodo sarebbe applicabile ad altre piante che presentano più di due copie dei loro cromosomi (piante poliploidi), come la patata, la colza, l'avena o la canna da zucchero. Finora non sapevamo produrre mutazioni multiple in queste piante.



Ricerca fondamentale

Modello animale di una malattia

Per studiare meglio la distrofia di Duchenne, nel 2015 un gruppo dell'Accademia delle scienze di Pechino ha ottenuto scimmie portatrici di mutazioni responsabili della malattia sul gene della distrofina, una proteina delle fibre muscolari. I primati hanno sviluppato la malattia.

Studio funzionale

Con l'aiuto di migliaia di virus portatori di RNA guida differenti, Aviv Regev e i colleghi del Broad Institute, del MIT e di Harvard, nel Massachusetts, nel 2015 hanno mutato più di 21.000 geni separatamente nelle cellule immunitarie del topo che esprimevano l'enzima Cas9. Lo studio della risposta di queste cellule dell'animale a un segnale batterico ha permesso di identificare numerose proteine necessarie alla secrezione del fattore di necrosi tumorale (TNF), un potente messaggero solubile dell'infiammazione.

Biologia dello sviluppo

Mutando un solo gene nel verme nematode *Caenorhabditis elegans*, alcuni ricercatori svizzeri dell'Istituto Friedrich Miescher di Basilea hanno confermato che esso era il solo a determinare la formazione della vulva negli individui di sesso femminile.



Terapia genica

Curare un organo difettoso

Nel 2014 il gruppo di Daniel Anderson al MIT di Boston ha corretto nel topo la tirosinemia, una malattia letale del fegato causata da una mutazione puntiforme nel genoma. Questa équipe ha sostituito la parte mutata del gene con una parte sana, iniettando nel sangue dell'animale l'enzima Cas9, tre RNA guida che hanno individuato il gene, e il frammento di DNA recante la sequenza sana. Solamente lo 0,4 per cento delle cellule del fegato sono state modificate, ma è stato sufficiente per guarire gli animali. Le cellule corrette sono riuscite nuovamente a proliferare e a rigenerare il fegato.

Ridurre il tasso di colesterolo

Il gruppo di Feng Zhang al MIT ha fatto diminuire della metà il tasso di colesterolo nel sangue dei topi in una settimana. Gli animali hanno ricevuto un vettore virale che ha trasportato il gene dell'enzima Cas9 e il suo RNA guida per disattivare, nelle cellule del fegato, un gene regolatore della sintesi del colesterolo. Più del 40 per cento del tessuto è stato modificato correttamente.

Riparare le cellule staminali ex vivo

L'anemia falciforme è una malattia del sangue causata da un'unica mutazione nel gene della catena β dell'emoglobina. Nel 2015 Linzhao Cheng e il suo gruppo alla Johns Hopkins University, a Baltimora, usando Cas9 hanno corretto questa mutazione nelle cellule staminali del sangue dei pazienti e ristabilito la produzione di una catena β normale. La reintroduzione nei pazienti di queste cellule sarà la prossima tappa. Questa strategia è immaginabile anche per altre malattie del sangue, come l'emofilia, e potrebbe sostituire le terapie geniche attuali mediante inserzione del gene.

Bloccare l'infezione del virus dell'AIDS

Le rare persone portatrici di mutazioni che disattivano il gene della proteina CCR5, un recettore del virus dell'AIDS, non sono infettate dal virus. Nel 2014, con l'aiuto di Cas9, il gruppo di Chad Cowan, della Harvard University, ha disattivato questo gene nelle cellule staminali del sistema immunitario. Un altro gruppo di ricerca, dell'Università della Pennsylvania, ha fatto la stessa cosa con una nucleasi a dita di zinco. Un primo studio su pazienti sieropositivi, che avevano ricevuto le loro cellule staminali così modificate, ha dimostrato nel 2014 una riduzione significativa del numero di cellule infettate, nonostante l'assenza del trattamento antivirale.



BIOLOGIA

CRISPR in agricoltura

Un nuovo e potente strumento di editing genomico potrebbe invadere l'industria agroalimentare e rivoluzionare il dibattito sugli OGM

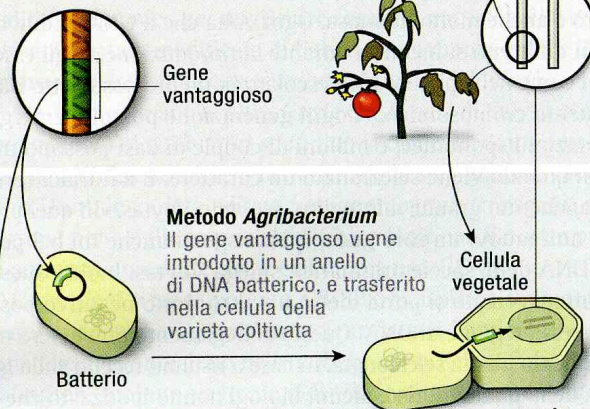
di Stephen S. Hall

LA MODIFICAZIONE GENETICA DI PRIMA GENERAZIONE

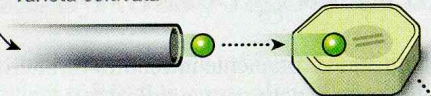
Negli anni ottanta del Novecento, ha preso il via la prima ondata di piante geneticamente ingegnerizzate, usando agenti biologici (*Agrobacterium tumefaciens*) o la forza fisica (microiniezione di particelle di DNA) per inserire nuovi gene nelle cellule. I geni possono essere estranei (transgenesi) o da specie imparentate (cisgenesi).

Gene vantaggioso
 Può venire da un organismo imparentato (incrocio cisgenico) o da uno estraneo (incrocio transgenico)

Varietà coltivata
 Frutto migliore, ma pianta suscettibile alla ruggine



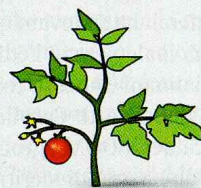
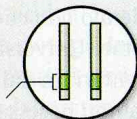
Microiniezione di particelle di DNA
 Particelle di metallo rivestite con frammenti di DNA vengono iniettate nella cellula della varietà coltivata



Le cellule che contengono il DNA modificato si dividono e quindi generano nuove piantine

Nuova varietà
 Frutto migliore, pianta resistente alla ruggine

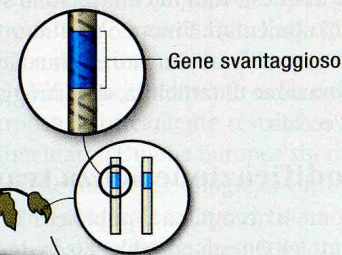
Gene vantaggioso introdotto



EDITING GENOMICO DI SECONDA GENERAZIONE

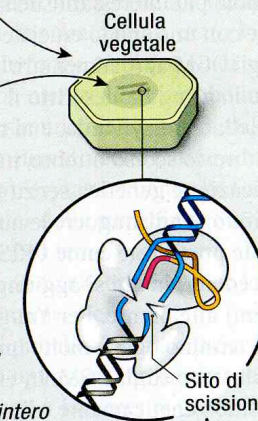
Con le tecnologie di editing genomico di precisione (dita di zinco, TALEN, CRISPR), ci si può concentrare su un gene specifico, disattivandolo (*sotto*) oppure sostituendolo. Il gene sostitutivo può provenire da una specie non imparentata (transgenico) o da una varietà correlata (cisgenico). Per quanto CRISPR possa essere indirizzata a un sito specifico, l'enzima Cas9 che la accompagna fa occasionalmente tagli inaspettati fuori bersaglio. Dati ancora limitati indicano che questi errori sono rari nelle piante.

Varietà coltivata
 Frutto migliore, ma pianta suscettibile alla ruggine



Costrutto CRISPR
 Composto di una guida a RNA che corrisponde alla sequenza cercata di DNA, e della proteina che taglia il DNA, Cas9

Guida a RNA
 Cas9



Il costrutto CRISPR si attacca alla sequenza target, e l'enzima Cas9 taglia entrambe le eliche di DNA. Quando la cellula ripara questo taglio, accidentalmente aggiunge numerose coppie di basi al DNA in quel sito, abbastanza da mutare (e spegnere) l'intero gene. La stessa tecnica può essere usata per inserire un nuovo gene che codifichi per un tratto vantaggioso: così si possono aggiungere centinaia, migliaia, o più coppie di basi.

Le cellule che contengono il DNA modificato si dividono e quindi generano nuove piantine

Pianta ingegnerizzata
 Pianta resistente alla ruggine e frutto migliore

Gene svantaggioso disattivato

