

Correzione di mutazioni patogenetiche in embrioni umani attraverso la tecnologia CRISPR- Cas9: un recente studio su Nature riporta la prima sperimentazione efficace nella terapia genica embrionale.



Dr. Antonio Capalbo, Biotecnologo specialista in Genetica Medica,

Per la Società Italiana di Embriologia Riproduzione e Ricerca (SIERR)

Direttore Laboratorio di genetica della riproduzione GENETYX e responsabile diagnosi preimpianto centri medicina della riproduzione GENERA.

La possibilità di modificare selettivamente alcune regioni del genoma umano utilizzando una tecnologia nota come CRISPR-Cas *genome editing* ha trasformato diverse aree della ricerca biologica contemporanea.

Il sistema di editing CRISPR-Cas consta di due componenti principali per modificare la sequenza di DNA di una cellula, un RNA guida che contiene informazioni per la specificità della sequenza bersaglio e un enzima con attività nucleasica, generalmente Cas9, che consente di indurre un *double-strand break* nella regione genomica bersaglio formando un complesso con la molecola di RNA guida. La rottura della doppia elica di DNA, generalmente, attiva uno dei due *pathway* endogeni di riparo del DNA: più comunemente in cellule somatiche e staminali il *non-homologous end joining* (NHEJ) *pathway* oppure *homology-directed repair* (HDR) *pathway*. Il NHEJ è un meccanismo di riparo *error prone*, in quanto aggiunge o rimuove casualmente nucleotidi nella regione interrotta, generando delezioni e inserzioni di poche paia di basi. Questo sistema è ovviamente non desiderabile per il contesto di terapia genica ma è ampiamente utilizzato per la generazione di modelli *knockout* genici di cellule e organismi. L'HDR usa, invece, un meccanismo di riparo basato su omologia di sequenza o con una molecola di DNA stampo esogena o complementare al secondo allele in cellule diploidi, rendendo possibile una correzione della sequenza target di DNA specifica e complementare alla sequenza template somministrata insieme al costrutto o già presente nello specifico genoma in esame.

Il tempo di somministrazione delle componenti CRISPR-Cas in relazione alla fase del ciclo cellulare e allo specifico tipo cellulare sono in grado di attivare l'uso preferenziale dell'uno o altro *pathway* di riparo.

Diversi trials clinici sono in corso in cui cellule somatiche umane sono modificate geneticamente e ingegnerizzate per svolgere una specifica funzione. Esempi comuni sono l'ingegnerizzazione genetica di cellule del sistema immunitario programmate per identificare cellule tumorali dopo trapianto. Queste nuove conoscenze e tecnologie non sono sfuggite anche all'attenzione della biologia e genetica della riproduzione dove la possibilità di correggere/modificare il genoma di cellule germinali o embrionali rappresenta una interessantissima area di ricerca e un potenziale ambito applicativo clinico per effettuare terapia genica in cicli di IVF.

Tuttavia in studi precedenti l'attivazione del *pathway* HDR, desiderabile ai fini della terapia genica, è risultata solo in circa il 2% delle cellule staminali embrionali e nel 15-25% degli embrioni umani. Fino ad oggi, essendo l'efficienza di attivazione del *pathway* HDR molto ridotta rispetto al NHEJ, la tecnologia CRISPR-Cas9 è stata quindi usata principalmente per introdurre mutazioni con perdita di funzione e le applicazioni di terapia genica sono rimaste limitate.

In un recente lavoro pubblicato su Nature di questo mese, Ma e colleghi hanno riportato la prima applicazione efficace della tecnologia CRISPR-Cas di *genome editing* per correggere mutazioni patogenetiche responsabili di una condizione genetica nota come cardiomiopia ipertrofica in embrioni umani.

RISULTATI PRINCIPALI DELLO STUDIO:

Il modello di studio utilizzato nello studio di Ma e colleghi è stato selezionato in base al fatto che sempre più si conoscono le basi genetiche di gravi condizioni ereditarie con effetto late-onset che si presentano a relativamente elevata frequenza nella popolazione. Esempi di comune conoscenza sono rappresentati dai tumori ereditari, quali mutazioni in BRCA1 e BRCA2 o dalle cardiomiopatie. Per la loro tardiva manifestazione, queste condizioni genetiche generalmente evadono la selezione naturale e vengono trasmesse alle generazioni successive dove si presentano ad elevata prevalenza. Tecnologie in grado di evitare la trasmissione transgenerazionale di queste comuni alterazioni genetiche nella popolazione sono sicuramente di notevole interesse clinico/scientifico e lo studio che descriviamo in questo report rappresenta sicuramente un significativo avanzamento tecnologico in questa direzione.

Nel lavoro pubblicato da un team internazionale guidato del biologo della riproduzione Mitalipov è stato creato un costrutto genetico basato sulla tecnologia CRISPR-Cas9 di *gene-editing* per correggere una comune delezione di poche paia di basi nel gene MYBPC3 che causa una prevalente forma di cardiomiopia (Ma et al., 2017). La cardiomiopia ipertrofica è una malattia con esordio tardivo dovuta in una considerevole quota dei casi da mutazioni con effetto dominante nel gene *cardiac myosin-binding protein C (MYBPC3)* che codifica per una proteina coinvolta nel mantenimento strutturale dei muscoli cardiaci e nella regolazione dei meccanismi di contrazione/rilassamento. La presenza di una copia mutata di *mybpc3* è la più frequente causa di arresto cardiaco e morte improvvisa nei giovani atleti.

L'efficacia del sistema CRISPR nel correggere il difetto genetico è stata prima verificata su cellule staminali umane e poi applicata su embrioni umani ottenuti dalla fecondazione di ovociti prelevati da donatrici con spermatozoi ottenuti da un soggetto portatore eterozigote di mutazione di MYBPC3.

La tecnologia è stata valutata inserendo il costrutto CRISPR-Cas9 completato da una sequenza stampo esogena di DNA complementare all'allele *wild-type* in diversi momenti dello sviluppo preimpianto. In particolare i ricercatori hanno veicolato il costrutto sia nello zigote, che nei blastomeri ma anche più precocemente, al momento della ICSI unitamente allo spermatozoo, in ovociti allo stadio di MII.

I risultati del lavoro hanno evidenziato come in 42 dei 58 (72%) embrioni testati la mutazione in *MYBPC3* veniva completamente corretta in tutte le cellule embrionali quando il costrutto era stato veicolato in ovociti MII durante la ICSI. L'approccio risultava in una uniforme correzione della mutazione negli embrioni trattati che procedevano efficientemente nello sviluppo. Per gli altri 16 embrioni, l'editing era avvenuto mediante meccanismi mediati da NHEJ, quindi con l'introduzione di nuove alterazioni genetiche e assenza della correzione alla copia *wild-type*.

Contrariamente, l'introduzione negli stadi seguenti di zigote o embrione allo stadio di clivaggio dimostrava una efficienza di correzione significativamente minore, probabilmente a causa dell'attivazione ridotta del *pathway* HDR in favore del NHEJ, deducibile dall'aumentato tasso di mutazioni *de novo*.

Questo importante dato suggerisce come allo stadio di MII l'ovocita sia intrinsecamente programmato per rispondere ai danni del DNA in maniera molto più fedele attivando preferenzialmente il *pathway* HDR in modo da preservare integrità del DNA germinale. Questa capacità di risposta preferenziale è probabilmente conseguenza della necessità peculiare dell'ovocita di preservare l'integrità genomica dall'elevato numero di rotture che si verificano per la risoluzione dei crossing-over meiotici.

Una seconda interessante osservazione è stata la capacità dell'ovocita di utilizzare come filamento stampo la sequenza endogena dell'allele *wildtype* al posto della sequenza templatata sintetica di DNA introdotta con il costrutto. Al contrario di quanto osservato nelle cellule staminali infatti, solo un embrione dei 42 che mostravano l'allele MYBPC3 *wildtype*, aveva utilizzato la sequenza esogena di DNA come stampo. Questo dato è di significativa importanza perché evidenzia come ad oggi sia tecnicamente possibile correggere il genoma embrionale solo con quello che è già esistente (ossia l'allele *wild-type*), ma non inserire o modificare in maniera selettiva la sequenza genica. Quindi, da un punto di vista meramente tecnologico, questo lavoro non rappresenta un passo verso il *designer baby*.

Infine, gli embrioni corretti dalla mutazione mostravano simili *performance* di sviluppo preimpianto fino allo stadio di blastocisti in relazione ai controlli non trattati, indicando che l'editing genomico non interferisce con lo sviluppo embrionale.

VALUTAZIONI DEI PRINCIPALI RISCHI GENETICI DELLA TECNOLOGIA DI MANIPOLAZIONE GENETICA

Uno dei principali limiti della tecnologia CRISPR-Cas9 per modificare il genoma umano è il fenomeno del mosaicismo genetico, dove alcune cellule dell'embrione risultano corrette dalla mutazione mentre altre no. Questo può risultare in un mix di cellule affette e sane nei vari tessuti e organi con possibilità di causare la patologia anche nella sua piena manifestazione clinica e dagli esiti imprevedibili.

Per minimizzare questo potenziale rischio già osservato in esperimenti su embrioni preimpianto di modelli animali, per la prima volta gli autori hanno inserito il costrutto CRISPR-Cas9 direttamente al momento della ICSI auspicando la correzione genetica prima della formazione dello zigote o comunque precedentemente alla prima divisione cellulare.

Gli autori hanno riportato che solo uno dei 42 embrioni corretti mostrava segni di mosaicismo genetico. Al contrario, nella serie di esperimenti eseguiti su zigoti o embrioni preimpianto un'elevata percentuale (25%) di questi mostrava segni di mosaicismo.

Un secondo *safety issue* di estrema importanza nelle applicazioni di terapia genica è rappresentato dai cosiddetti potenziali effetti *off-target*, cioè modificazioni genetiche non programmate che occorrono in altre aree del genoma al di fuori della regione d'interesse.

Questo è un problema molto frequente e dettagliato in diverse applicazioni della tecnologia CRISPR sia su linee cellulari somatiche o staminali che su embrioni animali.

Per migliorare la specificità di modificazione genetica gli autori hanno veicolato la proteina Cas9 esogena (evitando l'utilizzo dei macchinari di riparo esogeni con maggiore emivita) ottenendo una funzionalità proteica limitata nel tempo e con minori rischi di effetti *off-target*.

Dai dati di sequenziamento embrionale genomico (WGS) ed esonico (WES) riportati dagli autori di questo lavoro non emergono mutazioni *off target* indesiderate, dimostrando come la

veicolazione transiente del costrutto sia estremamente accurata nel modificare la regione di interesse.

Nonostante le prime misure di valutazione del rischio siano risultate incoraggianti, studi futuri dovranno conformare in modo indipendente ed estendere le valutazioni, in particolare relativamente al mosaicismo e ad effetti off-target. Per esempio, l'efficienza e la sicurezza della tecnologia dovranno essere testate per diverse regioni ed aree genomiche come anche dimostrarne la fattibilità per condizioni autosomiche recessive dove entrambi gli alleli risultano mutate e dove il filamento guida non può quindi essere quello endogeno.

Nonostante ciò, il lavoro di Ma e colleghi rappresenta indubbiamente un significativo passo tecnologico in avanti verso la possibilità di correggere, e non solo diagnosticare, difetti genetici in embrioni umani durante un ciclo IVF. Da un punto di vista di ricerca di base queste nuove conoscenze e tecnologie permetteranno sicuramente una più approfondita conoscenza nel campo della biologia dello sviluppo potendo attivare e disattivare geni in maniera più efficace rispetto a prima. Da un punto di vista clinico, qualora verrà dimostrata la validità della tecnologia, la terapia genica di embrioni umani potrà servire alle coppie che si sottopongono ad un ciclo di PGD per correggere gli embrioni che hanno ereditato il difetto genetico e aumentare le loro possibilità di concepimento. Ovviamente, ad oggi, la diagnosi preimpianto rappresenta l'unica procedura perseguibile per queste coppie per prevenire la trasmissione di malattie genetiche.

RACCOMANDAZIONI ASHG

A seguito della pubblicazione di questo importante lavoro, sono state rilasciate delle raccomandazioni riportate dall'American Society of Human Genetics e condivise da diverse società scientifiche nel mondo che riassumiamo di seguito:

(1) Data la natura sperimentale e le numerose questioni scientifiche, etiche e politiche ancora aperte, non è raccomandato l'impiego di questa tecnologia in ambito clinico, cioè modifiche genetiche della linea germinale ed embrionale per processi procreativi.

(2) Comunque, non esiste alcuna ragione per proibire la ricerca e lo sviluppo dell'editing genomico di embrioni e linea germinale che hanno la potenzialità di aumentare significativamente la nostra capacità di coscienza su svariati fronti della ricerca in campo medico/biologico. Si incentiva anche a disporre di fondi pubblici per la ricerca in questo campo, raccomandando particolare attenzione tuttavia allo sviluppo di esaustivi consensi informativi per i pazienti e ad un lavoro esaustivo dei comitati etici;

(3) In futuro l'applicazione clinica non deve procedere se:

- a) non sussiste un importante rationale medico;
- b) *evidence base* che supporta l'applicazione clinica;
- c) giustificazione etica;
- d) un trasparente processo di sviluppo che sia reso pubblico e condiviso.