

24.Novembre

CRISPR e il bias delle “differenze di ascendenza”

Un'origine è sempre la figlia di un'origine più anziana.

Erik Orsenna

Lo strumento di modifica genetica noto come **CRISPR**, vecchio di 10 anni, è indispensabile per ingegnerizzare piante, adattare animali da laboratorio e sondare la biologia di base. Ma c'è un avvertimento quando viene utilizzato per modificare i geni umani: a differenza dei topi di laboratorio, che di solito sono consanguinei e geneticamente identici, i genomi delle persone differiscono **individualmente e per ascendenza**.

Queste *differenze di ascendenza* significano che **CRISPR** non sempre modifica alcuni genomi come previsto, in particolare nelle persone di origine africana, i cui genomi hanno maggiori probabilità di differire da quelli usati per indirizzare **CRISPR** verso un gene specifico.

Uno studio del team del *Broad Institute of MIT and Harvard* coordinato da **Sean A. Misek**



rileva che la mancata considerazione dell'ascendenza ha leggermente distorto una massiccia ricerca di geni del cancro, facendogli mancare geni importanti come *bersagli farmacologici* in quelli di recente discendenza africana.

Misek s et Al Germline variation contributes to false negatives in CRISPR-based experiments with varying burden across ancestries.

Ridurre le disparità è fondamentale per promuovere l'equità di accesso ai *trattamenti di precisione* per tutti i pazienti affetti da cancro. Sebbene i *fattori socio-ambientali* siano uno dei principali fattori alla base di tali disparità, è probabile che vi contribuiscano anche le differenze biologiche.

La definizione delle priorità degli obiettivi dei farmaci antitumorali è fondamentale per la scoperta di farmaci, tuttavia non è stato esplorato se esistano segnali relativi agli antenati nelle pipeline di scoperta degli obiettivi a causa dell'assenza di dati su una scala appropriata.

Il team del **Broad Institute** ha analizzato i dati di **611** esperimenti di vitalità CRISPR/Cas9 su scala genomica in modelli di linee cellulari umane come parte della **Cancer Dependency Map** per identificare le dipendenze genetiche associate all'ascendenza. Sorprendentemente, ha scoperto che la maggior parte delle associazioni presunte tra ascendenza e dipendenza derivano da artefatti relativi a varianti germinali che sono presenti a frequenze diverse nei gruppi di discendenza. Nel **2-5%** dei geni profilati in ciascun modello cellulare, le varianti germinali nelle sequenze di targeting per sgRNA hanno probabilmente ridotto il taglio da parte della nucleasi CRISPR/Cas9.

Sfortunatamente, questo pregiudizio ha influenzato in modo sproporzionato i modelli cellulari derivati da individui di recente discendenza africana perché i loro genomi tendevano a divergere maggiormente dal genoma di consenso tipicamente utilizzato per la progettazione della guida CRISPR/Cas9.

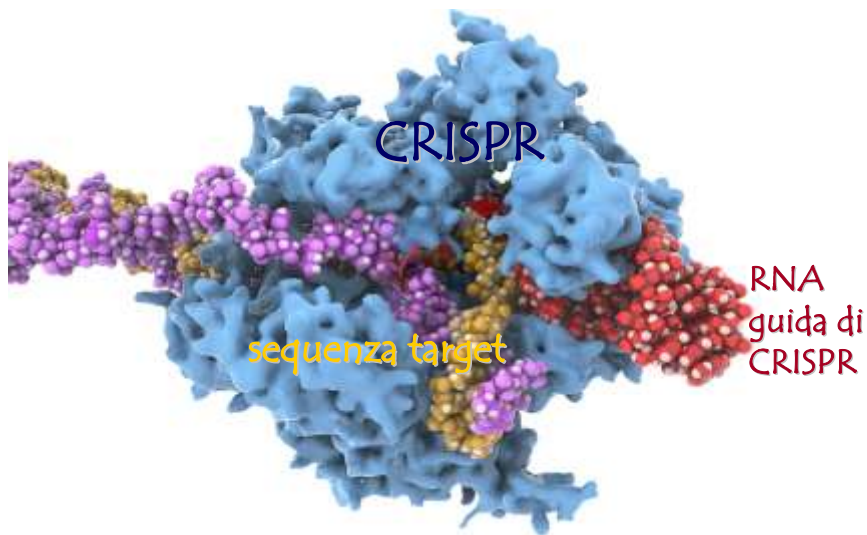
In perfetta sintonia **Luca Pinello** Professore Associato, *Patologia, Harvard Medical School* ritiene che i risultati sono una dimostrazione dell'importanza del **"problema di ascendenza"**



Luca Pinello è un biologo computazionale che studia i meccanismi funzionali del genoma non codificante e nell'ottica di sviluppare approcci computazionali nell' editing di singole cellule e del genoma, per analizzare sistematicamente le fonti di variazione genetica ed epigenetica che influenzano la regolazione genica nello sviluppo negli esseri umani. Ha sviluppato diverse strategie computazionali per svelare la relazione tra regolatori epigenetici, struttura della cromatina e sequenza del DNA e come questi fattori influenzano i modelli di espressione genica

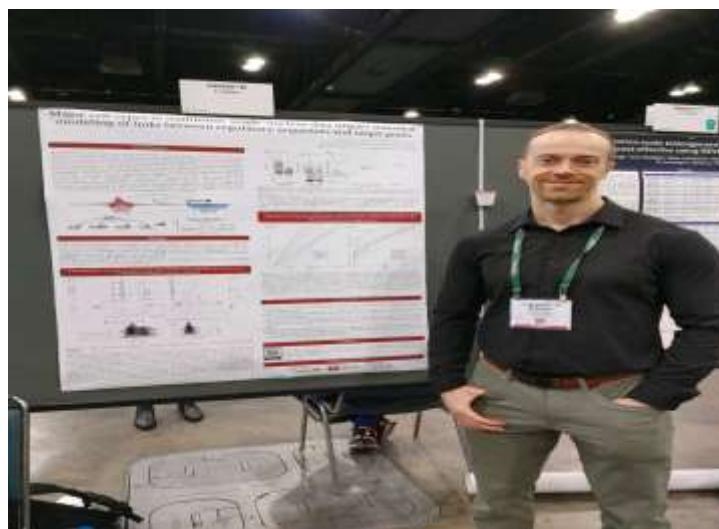
Per aiutare la comunità scientifica a iniziare a risolvere questa fonte di bias **Misek** e **Pinello** hanno pro posto una serie di *metodi complementari* per esperimenti **CRISPR** "agnostici di ascendenza".

Per modificare un gene umano, gli scienziati progettano innanzitutto un breve filamento di RNA che corrisponda a parte della sequenza del DNA del gene. Questo *RNA guida* quindi conduce l'enzima di taglio del DNA di CRISPR nel *punto giusto*. Se l'*RNA guida* non corrisponde strettamente al genoma in fase di modifica, CRISPR potrebbe non eseguire il taglio desiderato.



Gli *RNA guida* sono solitamente basati su un genoma di riferimento compilato dal DNA di poche persone che non cattura completamente la diversità umana. E le persone con origini africane sono geneticamente più diverse rispetto agli europei ed asiatici i cui antenati hanno lasciato l'Africa e si sono diffusi in tutto il mondo solo in tempi relativamente recenti.

I problemi di ascendenza con **CRISPR** sono stati segnalati per la prima volta da **Samuel Lessard** del *Research Center Montreal Heart Institute di Montréal*



Dimostriamo che la variazione genetica umana può alterare l'intero genoma del paesaggio fuori bersaglio, inclusa la creazione e la distruzione di motivi adiacenti protospaziali (PAM). Inoltre, i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) e le inserzioni/delezioni (indels) possono provocare siti bersaglio alterati e nuovi potenti siti fuori bersaglio, che possono predisporre i pazienti rispettivamente al fallimento del trattamento e agli effetti avversi; tuttavia, questi eventi sono rari.

Presi insieme, questi dati evidenziano l'importanza di considerare i singoli genomi per applicazioni terapeutiche di modifica del genoma per la progettazione e la valutazione di terapie basate su CRISPR per ridurre al minimo il rischio di fallimento del trattamento e/o esiti avversi. I polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) e le inserzioni/delezioni (indels) possono determinare siti bersaglio alterati e nuovi potenti siti fuori bersaglio, che possono predisporre i pazienti rispettivamente al fallimento del trattamento e agli effetti avversi; tuttavia, questi eventi sono rari

Lessard S et al. *Human genetic variation alters CRISPR-Cas9 on- and off-targeting specificity at therapeutically implicated loci.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Dec 26;114(52):E11257-E11266.

Il **team di Misek** si rivolto alla **Cancer Dependency Map**, per una collaborazione che ha utilizzato **CRISPR** per eliminare sistematicamente circa **18.000 geni** in **1000 linee di cellule tumorali** cresciute da singoli tumori umani. Il progetto ha cercato i geni coinvolti nella crescita o nella sopravvivenza del cancro che potrebbero essere presi di mira con i farmaci.

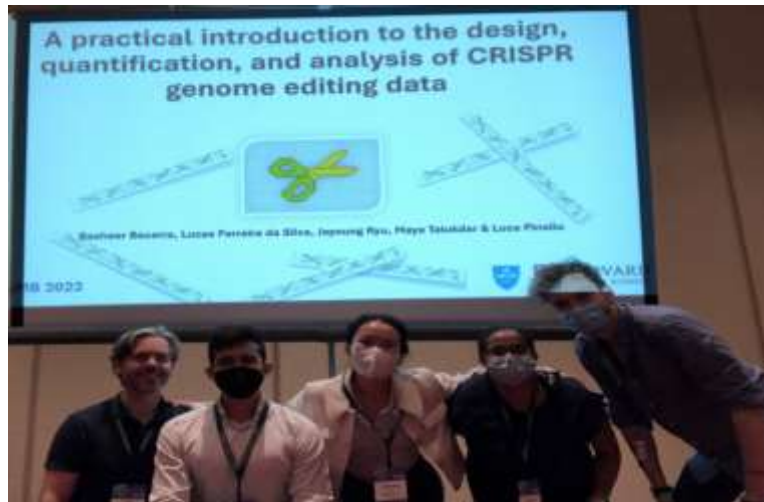
Il team, (che comprendeva gli autori senior Jesse Boehm del Massachusetts Institute of Technology e Broad e Rameen Beroukhim di Broad e del Dana Farber Cancer Institute) ha scoperto che **CRISPR non è riuscito a eliminare dal 2% al 5% dei 18.000 geni** in una singola linea cellulare.

Questi errori erano circa il **20% più comuni** nelle 41 linee cellulari di persone con origini africane recenti rispetto ad altri gruppi.

Di conseguenza si perdono importanti bersagli in individui di origine africana.

Allo stesso modo, il **team di Pinello** ha dimostrato come le *discrepanze di discendenza* possano indurre **CRISPR** a tagliare il genoma nel punto sbagliato quando viene utilizzato per trattare malattie come l'anemia falciforme, che colpisce principalmente le persone di origine africana.

Human genetic diversity alters therapeutic gene editing off-target outcomes



Tagli fuori bersaglio potrebbero portare al cancro.

Il **problema di ascendenza CRISPR** è un esempio di come l'esclusione di diverse popolazioni negli studi di genomica può inevitabilmente contribuire alla disuguaglianza in una terapia oncologica e spingere i ricercatori a ripensare a come stanno usando **CRISPR** in laboratorio

Entrambi i team hanno creato strumenti web gratuiti che confrontano un RNA guida proposto con decine di migliaia di genomi ottenuti da diverse popolazioni. *Ancestrygarden.org* dei laboratori Boehm e Beroukhim consente agli utenti di valutare l'impatto della diversità ancestrale sugli RNA guida CRISPR standard. *E CRISPRme del team Pinello controlla le partite fuori bersaglio.* "La speranza qui è che spingiamo le persone a ripensare a come stanno usando CRISPR in laboratorio

Un anno fa... Baedeker/Replay del 24. Novembre

I sette esperimenti (preoccupanti) che non dovrebbero essere fatti secondo la National Academy of Sciences (USA)

Premessa: La previsione del tempo è un esercizio puramente osservativo. Abbiamo satelliti e svariati strumenti per monitorare il tempo e prevedere gli uragani. Il processo di previsione inizia da semplici osservazioni per sviluppare poi modelli complessi che studiano utilizzando la fluidodinamica geofisica la formazione e la progressione degli uragani Attraverso l'analisi della densità, velocità del flusso, pressione e temperatura e possibile costruire modelli atmosferici e climatici in grado di prevederne la nascita e l'evoluzione.

Guadagno e perdita di funzione Analogamente è possibile prevedere la trasformazione di una epidemia in pandemia attraverso la ricerca sul guadagno di funzione o GoF (Gain of function) o perdita di funzione LoF (loss of Function) che consiste nel produrre, in un organismo, ad esempio un virus, delle mutazioni attivanti in grado di determinare l'acquisizione di una nuova funzione o il potenziamento di una preesistente o disattivare funzioni essenziali. I guadagni di funzione modificano il prodotto genico in modo tale che il suo effetto diventi più forte (attivazione potenziata) o addirittura sia sostituito da una funzione diversa e anormale. I virologi utilizzano esperimenti di GoF o di LoF guadagno/perdita per comprendere la composizione genetica dei virus e le specifiche dell'interazione virus-ospite. Questo esperimenti sono fondamentali per comprendere la biologia, l'ecologia e la patogenesi dei virus. I termini Gof e LoF sono state coniate per la prima volta nel 2012 in una riunione del National Institutes of Health (NIH), al fine di sostituire termini più descrittivi che indicavano preoccupazioni e perplessità sulla ricerca che generava ceppi di virus respiratori altamente trasmissibili e altamente patogeni. Quando viene costruito il nuovo allele, un eterozigote contenente l'allele appena creato lo esprimerà e conterrà nel suo genoma una mutazione dominante "neomorfica" (nuova formazione) o e così l'originale esprimerà il nuovo allele. Da un

punto di vista genetico si definiscono queste mutazioni responsabili di fenotipi dominanti detti "hypermorph" (aumento dell'espressione genica) Attraverso la tecnologia del "guadagno/perdita" si possono generare virus con proprietà che non esistono in natura, o virus che possono essere più patogeni o più trasmissibili dei virus wild type, ma che sono comunque comparabili a quelli esistenti in natura, o meno problematici; oppure una terza categoria, ovvero virus che si mostrano assai patogeni e/o trasmissibili in modelli animali che tuttavia, anche questi, non sembrano costituire un grave problema di salute per l'uomo. Queste tecnologie trovano impiego, anche, in ambiti diversi dalla virologia, ad esempio in oncologia. Infatti, mutazioni spontanee di tipo GOF hanno un ruolo decisivo nello sviluppo e nella progressione di vari tipi di cancro. La ricerca sulle mutazioni di GOF può portare a identificare potenziali bersagli terapeutici. Il goal di queste tecnologie è di segnalare ed attenzionare quei virus che nell'immediato futuro potrebbero invaderci, in ultima analisi a prevedere una pandemia Sapere come e quando potrebbe iniziare la prossima pandemia è indubbiamente importante, ma manomettere i virus per farlo è, per molti virologi, una procedura sbagliata ricca di incognite ed imprevisti. Purtroppo prevedere le pandemie non è come prevedere il tempo. I meteorologi non fanno esperimenti sulle nuvole per vedere se possono causare uragani !

Il poeta boemo Rainer Rilke riteneva che Nulla nel mondo può essere immaginato in anticipo, neppure la minima cosa. Tutto è fatto di così tanti particolari unici che non possono essere previsti. Prevedere significherebbe saper discernere. il probabile dall'improbabile, il possibile dall'impossibile. Dopotutto le previsioni sono estremamente difficili. Specialmente sul futuro. (Niels Bohr) Perché creare virus pericolosi in laboratorio è un pessimo modo per proteggersi da future pandemie

Nel lontano 2004 la National Academy of Sciences pubblicò il rapporto Biotchnology Research in an Age of terrorismo , in cui elencava i sette esperimenti preoccupanti che non dovrebbero essere fatti.

1-Dimostrare come rendere inefficace un vaccino

2-Conferire resistenza ad antibiotici o agenti antivirali

3-Migliora la virulenza di un agente patogeno o rende virulento un microbo non virulento

4-Aumentare la trasmissibilità di un agente patogeno

5-Alterare la gamma dei potenziali ospiti di un agente patogeno

6-Rendere capace ad un agente patogeno di eludere le modalità diagnostiche o di rilevamento

7-Bioingegneria dei coronavirus correlati alla SARS

In particolare i punti 3, 4, 5, come vedremo più avanti, sono stati sviluppati silenziosamente dall'azione congiunta "cino-americana tra EcoHealth e i partner di Wuhan. Nel 2011, alcuni scienziati riportarono l'opinione del Governo degli Stati Uniti in un articolo apparso su The Washington Post sostenendo perché la ricerca che modificava l'influenza aviaria ad alta patogenicità (H5N1) era stata un "impresa degna e importante" . Ritenevano che creare mutazioni potenzialmente pericolose nel virus era il prezzo necessario per proteggere l'umanità, nel caso in cui tali mutazioni si evolvessero naturalmente. Anthony Fauci e Gary Nabel del National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Francis Collins espressero la loro perplessità: "Non possiamo prevedere se qualcosa sorgerà naturalmente, né quando o dove potrebbe apparire. Date queste incertezze, informazioni e approfondimenti importanti possono provenire dalla generazione di un virus potenzialmente pericoloso in laboratorio" Tra le polemiche generate da questa ricerca sull'influenza, (vedi Badeker 17 settembre Perché dobbiamo temere seriamente H5N1). il governo degli Stati Uniti ha attuato una "pausa" sui finanziamenti federali nel 2014 per ricerche selezionate ragionevolmente previste per aumentare la trasmissibilità o la patogenicità dei virus dell'influenza, della SARS e della MERS. Erano questi esperimenti che facevano parte di un sottoinsieme di studi scientifici che rientravano nei progetti di "guadagno di funzione". Tuttavia Nel 2017, il Governo degli Stati Uniti ha revocato la pausa e ha stabilito che il Dipartimento della salute e dei servizi umani degli Stati Uniti conduca una valutazione del rapporto rischio beneficio sulla ricerca che potrebbe conferire questi attributi a potenziali agenti patogeni pandemici.

Nel 2018, EcoHealth Alliance, un'organizzazione di ricerca senza scopo di lucro con sede negli Stati Uniti, ha presentato una proposta di sovvenzione alla Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA) chiamata DEFUSE: Defusing the threat of bat-borne Coronavirus chiedendo oltre 14 milioni di dollari per un

progetto di un anno e mezzo per studiare come , impedire a un coronavirus di pipistrello di infettare nelle persone e originare un focolaio. Il team avrebbe studiato "l'evoluzione virale e il rischio di ricaduta" dei coronavirus di pipistrello legati alla SARS raccogliendo virus dalle grotte nello Yunnan, in Cina, e facendo esperimenti che includevano test di coronavirus di pipistrello ibridi creati in laboratorio su topi umanizzati che possedevano recettori umani. Un aspetto intrigante nella proposta EcoHealth del 2018 alla DARPA si focalizza sulla ricerca dei cosiddetti "siti di scissione del furin". Nella SARS-CoV-2, il virus che causa il COVID-19, un sito di scissione della furina che consente di modificare la sua proteina spike rendendo il virus in grado di infettare più facilmente le cellule della mucosa del tratto pre-respiratorio. Il sito di scissione della furina rappresenta una differenza cruciale tra il virus COVID-19 e i suoi parenti, incluso il SARS-CoV, il virus responsabile dell'epidemia del 2003. Il processo mediante il quale i virus dirottano il macchinario cellulare dei loro ospiti per riprodursi è "sciatto" e i virus prodotti da una cellula non sempre sono identici a quelli che hanno infettato la cellula all'inizio. Questa "sciatteria" aiuta il virus a evolversi e ad adattarsi a nuovi host, come noi. Alcuni sostenitori dell'idea che la pandemia sia iniziata con un incidente di laboratorio a Wuhan, tuttavia, si chiedono se la presenza del sito di scissione della furina nel virus COVID-19 sia semplicemente un segno dell'evoluzione virale naturale, un artefatto della riproduzione virale sciatta, o piuttosto sia un segno di bioingegneria umana.

La DARPA non ha approvato...

(Per continuare vai all'originale)