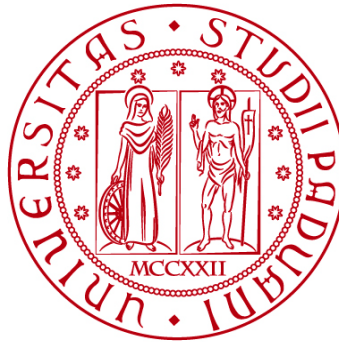


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**SVILUPPO DI VETTORI VIRALI PER IL DELIVERY DEL
SISTEMA CRISPR-CAS9:
APPLICAZIONE ALL'ERADICAZIONE DELL'INFEZIONE DA
HIV-1**

**Tutor: Prof.ssa Arianna Calistri
Dipartimento di Medicina Molecolare**

Laureanda: Elisa Poncato

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

1. ABSTRACT

2. INTRODUZIONE

1. Il sistema CRISPR-Cas9
2. CRISPR-Cas9 per l'editing genomico
3. Metodologie di delivery del sistema CRISPR-Cas9

3. APPLICAZIONE DEI VIRUS AL SISTEMA CRISPR-CAS9

1. Vettori basati sui virus adeno-associati
2. Vettori basati sugli adenovirus
3. Vettori basati sui lentivirus

4. L'USO DEL SISTEMA CRISPR-CAS9 PER L'ERADICAZIONE DELL'INFEZIONE DA HIV

1. Infezione da virus HIV
2. Sistema CRISPR-Cas9 per l'eradicazione dell'infezione da HIV
3. CRISPR-CAS9: futuro vaccino per la prevenzione dell'infezione da HIV?

5. CONCLUSIONI

1. ABSTRACT

Il sistema CRISPR-Cas9 è un'innovativa tecnologia adibita all'editing del DNA. Derivato da un meccanismo di difesa attuato dai batteri, il sistema CRISPR-Cas9 rappresenta una nuova frontiera nella cura di numerose patologie, in particolar modo quelle che coinvolgono mutazioni del genoma. Tuttavia, le maggiori difficoltà di questo sistema riguardano il suo direzionamento per garantire un'azione efficace e impedire mutazioni off-target. Questa tesi ha l'obiettivo di descrivere i vari sistemi per il delivery del sistema CRISPR-Cas9, con particolare attenzione sui vettori virali. I vettori virali maggiormente impiegati sono quelli basati sugli adenovirus, sui virus adeno-associati e sui lentivirus.

Una delle applicazioni più recenti del sistema CRISPR-Cas9 riguarda l'eradicazione dell'infezione da HIV. L'infezione da HIV che, se non opportunamente curata può essere causa dello sviluppo di AIDS, non presenta attualmente una cura farmacologica che permetta l'eradicazione del virus. Il problema principale è infatti rappresentato dalla capacità del virus di integrarsi nel genoma della cellula ospite. Da recenti clinical trials il sistema CRISPR-Cas9 presenta buone potenzialità per l'eliminazione del genoma virale dalla cellula ospite, rappresentando una possibile cura efficace contro l'infezione da HIV.

2. INTRODUZIONE

2.1 Il sistema CRISPR-Cas9

Il sistema CRISPR-Cas9 è un'innovativa tecnologia molecolare adibita all'editing del DNA. Questa tecnica, che ha valso il Nobel per la Chimica nel 2020 alle ricercatrici Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna, è basata sul locus CRISPR e su una proteina ad esso associata, Cas9. Questa metodologia di editing genomico è derivata da un meccanismo di difesa che alcune cellule procariotiche operano per contrastare le infezioni virali. Quando i batteri e gli Archea che possiedono questo complesso vengono infettati da un virus, essi hanno la capacità di digerire il genoma virale, portando alla formazione di frammenti di DNA, che, una volta elaborati, si inseriscono all'interno dei loci CRISPR. L'incorporazione di questi frammenti, che vanno a costituire dei distanziatori (spacer) in una sequenza CRISPR, attribuisce

alla cellula ospite una resistenza allo specifico virus e rappresenteranno una memoria della passata infezione.

Durante uno studio del 1987, all'interno del genoma di *Escherichia coli* è stato infatti osservato che tra le unità fondamentali del DNA erano presenti delle sequenze palindrome alternate da dei distanziatori, delle sequenze non ripetitive lunghe 25-75 pb. È stato successivamente dimostrato che questi distanziatori erano costituiti da DNA esogeno proveniente da fagi che avevano precedentemente infettato la cellula batterica.

Sono stati identificati vari meccanismi dei sistemi CRISPR, quello maggiormente studiato è il meccanismo CRISPR di tipo II, basato sulla proteina Cas9.

Il sistema CRISPR-Cas9 richiede due componenti fondamentali: la proteina enzimatica Cas9 che ha il ruolo di tagliare la sequenza target e l'RNA guida sgRNA che interagisce con la sequenza target per complementarità di basi.

L'immunità adattativa del batterio è garantita dalla trascrizione dei loci CRISPR con la formazione di filamenti di pre-crRNAs. Questi filamenti precursori subiscono in seguito un taglio proteolitico convertendosi in filamenti di crRNAs maturi. Questi crRNAs presentano all'estremità 5' un distanziatore che possiede una sequenza complementare a quella del genoma virale che aveva precedentemente infettato il batterio e al 3' una sequenza ripetuta. Questa sequenza ripetuta al 3' si può appaiare per complementarità di basi al tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA), un filamento trascritto a partire da una regione a monte dei geni codificanti la proteina Cas9, all'interno del locus CRISPR. L'appaiamento tra tracrRNA e crRNA comporta la formazione di un RNA a doppio filamento che, in seguito al processamento ad opera dell'enzima RNAsi III, forma l'RNA guida. Questo RNA guida costituito da tracrRNA e crRNA è ora nella condizione di associarsi alla proteina Cas9 con la formazione di un complesso ribonucleoproteico. La porzione al 5' di crRNA permette il riconoscimento sequenza-specifica del genoma del virus e ne consegue una degradazione di questo ad opera della proteina Cas9.

L'associazione della proteina Cas9 al genoma esogeno è garantita dalla regione virale PAM (protospacer adjacent motif), un insieme di sequenze di circa 3-5 basi. Se è presente la regione PAM, è possibile l'attivazione del complesso

ribonucleoproteico, in particolare di due domini di Cas9, RuvC e HNH, che taglieranno il genoma fagico tre nucleotidi a monte del sito PAM riconosciuto.

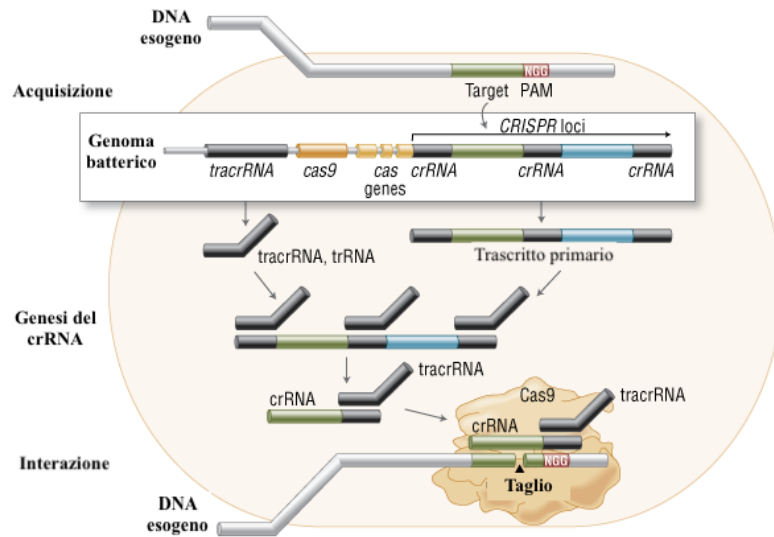


Fig 1. Meccanismo molecolare di difesa CRISPR-Cas9 in vivo. Modificato da “CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes.” *Nat. Biotechnol.* Sander, J. D. & Joung, J. K. (2014)¹.

2.2 CRISPR-Cas9 per l’editing genomico.

Il sistema CRISPR-Cas9 è ampiamente impiegato in ingegneria genetica con lo scopo di introdurre tagli a doppio filamento (DSB – double strand break) all’interno del genoma umano e indurre i meccanismi di riparazione del DNA. In questo modo è possibile silenziare o alterare l’espressione di determinati geni coinvolti ad esempio in patologie genetiche. Vi sono due principali meccanismi di riparazione del DNA cellulare, NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*) e HDR (*Homology-Directed Repair*). Il sistema di riparazione NHEJ rappresenta il sistema più attivo all’interno della cellula (non necessita infatti la presenza di DNA omologo, potendo perciò avvenire durante ogni fase del ciclo cellulare) e comporta frequentemente l’inserzione o la delezione di alcuni nucleotidi in presenza di una rottura a doppio filamento. Le estremità del taglio a doppio filamento vengono riconosciute dal complesso multiproteico Ku70, che interagisce con una proteina chinasi e successivamente con il complesso MRN. Questa interazione porta ad un

processamento localizzato delle estremità, le quali saranno saldate insieme ad opera della DNA ligasi. Il sistema di riparazione HDR avviene con una frequenza inferiore rispetto al meccanismo NHEJ, ma è il sistema più utilizzato per l'editing genomico, poiché permette di prevedere le modifiche che verranno introdotte. Questo meccanismo di riparazione richiede la presenza di una copia di DNA intatta sul cromosoma omologo o nel cromatide fratello. Nell'utilizzo di questo metodo di riparazione del DNA in ingegneria genetica viene fornito un modello che permette specifiche mutazioni o inserzioni. Le estremità del DSB vengono processate mediante l'azione del complesso eterotrimerico MRN, che porta alla formazione di estremità 3' sporgenti. Una delle estremità 3' OH, grazie all'intervento di numerose proteine ricombinative, riconoscerà la sequenza omologa sulla copia di DNA intatta, formando una giunzione di Holliday. Questa permette la neosintesi di DNA, e la risoluzione degli intermedi genera insieme all'azione della DNA ligasi due molecole di DNA riparate. La copia di DNA intatta utilizzata durante il sistema di riparazione HDR può essere rappresentata da una molecola di DNA esogeno, che presenta al suo interno delle modifiche rispetto alla copia di DNA che ha subito la rottura a doppio filamento (ad opera, per esempio della proteina Cas9). Il filamento di DNA esogeno permetterà in questo modo l'introduzione di mutazioni prevedibili all'interno del genoma che ha subito l'azione del meccanismo CRISPR-Cas9.

2.3 Metodologie di delivery del sistema CRISPR-Cas9

Il sistema CRISPR-Cas9 può essere introdotto sotto forma di DNA plasmidico che contiene le sequenze necessarie per l'espressione dell'RNA guida e della proteina Cas9, sotto forma di mRNA che permette la traduzione di Cas9 e di un RNA guida separato oppure sotto forma di complesso ribonucleoproteico, già comprensivo della proteina Cas e dell'RNA guida.

Il trasporto del sistema CRISPR-Cas9 può essere suddiviso in tre macrocategorie: trasporto basato sui vettori virali, basato su meccanismi non virali e su metodi fisici. Il trasporto che usufruisce di meccanismi non virali è principalmente basato sull'impiego di liposomi e nanoparticelle lipidiche. Nonostante il loro frequente impiego, i liposomi corrono il rischio di essere degradati dai lisosomi in seguito alla loro fagocitazione ad opera di endosomi con conseguente difficoltà nel raggiungimento della cellula bersaglio.

Tra le tecniche fisiche più utilizzate vi sono l'elettroporazione e la microiniezione. L'elettroporazione, tuttavia, non fornisce efficienti risultati quando impiegata su cellule di mammifero, in quanto queste sono molto più sensibili alle correnti elettriche mentre la microiniezione non è adatta agli studi in vivo. Presentano invece un grande potenziale di impiego i vettori virali. I vettori virali rappresentano il sistema di trasporto più efficiente per CRISPR-Cas9 in vivo, specialmente per le cellule di mammifero. Lo svantaggio associato all'impiego di questi vettori virali è il rischio di introduzione di mutazioni indesiderate all'interno del genoma del paziente. I vettori virali sono stati perciò modificati con il fine di ridurre il rischio di questi potenziali effetti collaterali. I vettori virali maggiormente utilizzati per il delivery del sistema CRISPR-Cas9 sono i vettori basati sugli adenovirus, sui virus adeno-associati e sui lentivirus².

3. APPLICAZIONE DEI VIRUS AL SISTEMA CRISPR-CAS9

3.1 Vettori basati sui virus adeno-associati

I vettori basati sui virus adeno-associati (AAV) sono una delle classi di vettori virali maggiormente impiegata per il delivery del sistema CRISPR-Cas9. I virus adeno-associati sono dei piccoli virus (circa 20 nm) a DNA a singolo filamento non dotati di envelope. Il largo impiego dei vettori virali basati sui virus adeno-associati è dovuto alla bassa patogenicità e immunogenicità di questi virus, alla loro capacità di infettare cellule sia in attiva divisione che quiescenti e ai numerosi sierotipi con diversa specificità. Questo ultimo aspetto in particolare permetterebbe di direzionare il sistema CRISPR-Cas9 presso uno specifico tessuto riducendo di conseguenza possibili effetti collaterali². Inoltre, l'integrazione di virus adeno-associati avviene con una frequenza particolarmente ridotta (circa 0,1%) riducendo il rischio di effetti indesiderati a lungo termine. Recentemente è stato però osservato che, poiché l'integrazione di genoma virale avviene in corrispondenza di tagli del DNA e che il sistema CRISPR-Cas9 genera nella sede di interesse proprio un taglio a doppio filamento, la frequenza di integrazione è notevolmente aumentata in prossimità di questo sito³. Tuttavia, il sistema CRISPR aumenta la frequenza di integrazione del genoma virale solo in prossimità del sito di interesse e questo non sembra avere conseguenze rilevanti. È però necessario l'impiego di sistemi

CRISPR-Cas9 particolarmente precisi al fine di limitare i siti taglio e ridurre di conseguenza l'integrazione del genoma virale.

Un altro limite riguardante l'uso di vettori adeno-associati per il delivery di CRISPR-Cas9 è strettamente legato alla loro dimensione. Questi vettori infatti presentano dimensione ridotta e presentano una capacità di circa 4,7 Kb, non sufficiente per il trasporto di tutte le componenti del sistema CRISPR (una delle proteine Cas9 maggiormente impiegate, proveniente da *Streptococcus pyogenes* presenta una grandezza di 4,2 Kb). Per risolvere questo problema sono perciò stati ingegnerizzati dei sistemi duali di vettori basati sui virus adeno-associati (Dual AAV) raggiungendo una capacità di circa 9 Kb. Questa nuova tecnica consiste nell'ingegnerizzazione di due vettori basati sui virus adeno-associati, uno dei quali esprime la proteina Cas9 e l'altro l'RNA guida⁴.

3.2 Vettori basati sugli adenovirus

Gli adenovirus sono una classe di virus a DNA a doppio filamento non dotata di envelope. L'impiego di vettori basati sugli adenovirus per il delivery del sistema CRISPR-Cas9 offre numerosi vantaggi. Questi, infatti, sono la classe di vettori che permette il direzionamento del sistema CRISPR in vivo in modo più efficiente, in quanto la maggioranza delle cellule umane esprimono i recettori per gli adenovirus come CD46 e i recettori per le integrine. Gli adenovirus hanno la capacità, come i virus adeno-associati, di infettare cellule sia in attiva divisione che quiescenti, ma, a differenza di questi, presentano un genoma di dimensioni maggiori (34-43 Kb). Questa loro caratteristica permette ai vettori basati sugli adenovirus il trasporto del sistema CRISPR completo, senza le complicazioni insorte durante l'impiego di vettori basati sui virus adeno-associati. Un ulteriore vantaggio associato agli adenovirus è che sono impiegati in numerose applicazioni terapeutiche ed è quindi ben definita la sicurezza e l'efficacia dei vettori adenovirali. L'elevato tropismo caratterizzante questi virus può inoltre essere sfruttato per permettere al sistema CRISPR-Cas9 il raggiungimento di differenti tessuti ed evitare potenziali mutazioni in siti off-target.

I vettori basati sugli adenovirus possono tuttavia comportare una risposta immunitaria particolarmente potente, probabilmente causata dal capsido virale. Inoltre, poiché le infezioni causate da adenovirus sono molto comuni, vi è il rischio

che il soggetto possa aver sviluppato degli anticorpi contro alcuni dei sierotipi². A causa di questi due aspetti, nonostante il direzionamento del sistema CRISPR-Cas9 sia altamente efficiente, si riduce drasticamente l'effetto terapeutico desiderato.

I vettori basati sugli adenovirus vedono attualmente applicazione in numerosi clinical trials riguardanti lo sviluppo di farmaci e terapie. In particolar modo il sistema CRISPR-Cas9 è stato impiegato mediante vettori adenovirali per il trattamento della distrofia muscolare di Duchenne, in vitro in cellule derivanti dal paziente e in vivo nel topo.

3.3 Vettori basati sui lentivirus

I lentivirus, il cui maggiormente noto è il virus dell'immunodeficienza umana HIV, sono una classe virale appartenente alla famiglia dei retrovirus e, a differenza di questi, possono rimanere latenti per molti anni. I lentivirus sono virus presentanti l'envelope e sono costituiti da un genoma a RNA a singolo filamento con polarità positiva. L'RNA contenuto all'interno del virione ha la particolarità di essere convertito, ad opera di una trascrittasi inversa contenuta nella particella virale stessa, in un DNA a doppio filamento. In seguito, il dsDNA si integra nel genoma della cellula ospite nella forma provirale, fungendo quindi da stampo per la sintesi degli mRNA virali e dell'RNA genomico attraverso l'azione dell'RNA polimerasi cellulare.

Il grande vantaggio dell'impiego dei vettori lentivirali è che questi infettano in modo particolarmente efficace le cellule target, anche le cellule che non sono in attiva divisione e questo può rappresentare un enorme vantaggio quando si intende trattare determinati tessuti (come, ad esempio, il cervello o il muscolo). Inoltre, i vettori lentivirali possono essere pseudotipizzati con l'obiettivo di esprimere l'envelope di altri virus, variando di conseguenza il tropismo del vettore virale per un determinato tessuto.

Un aspetto che distingue i vettori lentivirali dagli altri vettori virali è la loro capacità di integrarsi nel genoma dell'organismo ospite. Questa loro caratteristica, nell'ambito del sistema CRISPR-Cas9, può rappresentare uno svantaggio poiché ne potrebbero conseguire mutazioni off target con effetti collaterali anche a lungo termine. Per impedire integrazioni indesiderate sono stati ingegnerizzati dei vettori lentivirali non in grado di esprimere l'enzima integrasi necessario. Sono state quindi

indotte delle mutazioni all'interno della regione codificante l'integrasi senza però influire sulla trascrittasi inversa e sul trasporto del complesso di preintegrazione nel nucleo². L'integrazione off-target può essere impedita anche utilizzando un RNA guida particolarmente specifico per la sequenza bersaglio. In questo modo il DNA virale si integrerà esclusivamente in corrispondenza di questa, riducendo al minimo il rischio di effetti collaterali dovuti a mutazioni indesiderate. Quando sono utilizzati vettori lentivirali è quindi fondamentale impiegare un RNA guida con elevata specificità per il target, permettendo l'integrazione esclusivamente nella regione di interesse. Da questo ne consegue che, poiché il DNA si sarà integrato, i geni trasferiti mediante l'impiego di vettori virali presenteranno una lenta espressione e questo può rappresentare un grande vantaggio per il trattamento di determinate patologie⁴.

I vettori lentivirali maggiormente utilizzati derivano dal virus HIV e presentano di conseguenza una capacità di circa 9 Kb.

4. L'USO DEL SISTEMA CRISPR-CAS9 PER L'ERADICAZIONE DELL'INFEZIONE DA HIV

4.1 Infezione da virus HIV

HIV-1 (virus dell'immunodeficienza umana) è un virus appartenente alla classe virale dei lentivirus e presenta elevato tropismo per i linfociti T CD4+, cellule con un ruolo chiave nella risposta immunitaria. Un'infezione da HIV può causare, in un soggetto non opportunamente curato, lo svilupparsi di AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome). Lo sviluppo della sindrome di AIDS comporta un indebolimento progressivo del sistema immunitario e questo ne consegue con un aumentato rischio di sviluppare tumori, infezioni o neoplasie insolite nel paziente. Il virus HIV si trasmette mediante via sessuale attraverso rapporti sessuali non protetti, via ematica attraverso lo scambio di siringhe o trasfusione di sangue contaminato o mediante la via verticale ovvero durante la gravidanza, il parto o l'allattamento.

Nonostante l'infezione da HIV abbia avuto la sua massima diffusione durante gli anni 80, è ancora largamente presente. Si stima che attualmente siano quasi 38

milioni i soggetti che hanno contratto l'infezione da HIV con un totale di morti, dal 1981, di circa 36 milioni⁵. Tuttavia non esistono ancora delle cure per l'eradicazione dell'infezione da HIV ma esistono delle terapie (HAART therapy) che permettono, mediante una combinazione di farmaci, il controllo del virus andando a bloccare la sua replicazione virale. La HAART therapy (Highly Active Antiretroviral Therapy) è infatti una terapia basata sull'impiego di almeno tre farmaci che agiscono su meccanismi differenti del ciclo replicativo del virus, andando a ridurre il più possibile la sua replicazione. Nonostante questa terapia abbia permesso di ridurre notevolmente le morti associate ad un'infezione da HIV, la terapia farmacologica attualmente a disposizione non permette di rimuovere il DNA virale presente a livello dei reservoir. Il sistema CRISPR-Cas9 sembra rappresentare una nuova frontiera di ricerca per rimuovere il genoma virale integrato dalle cellule del paziente.

L'intero genoma di HIV è fiancheggiato al 3' e al 5' da due sequenze LTR (long terminal repeat) che sono fondamentali per la regolazione della trascrizione degli mRNA e rappresentano anche uno dei principali bersagli della terapia basata sul sistema CRISPR-Cas9 che sarà illustrata in seguito. All'interno del genoma sono presenti tre geni necessari per la produzione di progenie virale: il gene *gag* che codifica una poliproteina che viene in seguito processata per formare le proteine strutturali interne (matrice, capside e nucleocapside), il gene *pol* che codifica la proteasi, la trascrittasi inversa e l'integrasi e il gene *env* che codifica le proteine costituenti l'envelope. Sono inoltre presenti ulteriori geni che codificano delle proteine regolatorie.

Il virus HIV può instaurare due diverse tipologie di infezione: un'infezione attiva e un'infezione latente (Figura 2). Durante l'infezione attiva il virus HIV si lega ai recettori CD4 presenti sulla superficie di alcune cellule del sistema immunitario, in particolar modo sulla superficie di alcuni linfociti T. Per poter penetrare nella cellula il virus necessita di un legame con un co-recettore, rappresentato da CCR5 o da CXCR4. In seguito a questo legame avviene la fusione di HIV con la membrana cellulare e l'entrata del materiale genetico virale. L'RNA virale rilasciato all'interno della cellula viene convertito in DNA a doppio filamento ad

opera dell'enzima retrotrascrittasi. Il DNA formatosi può raggiungere il nucleo della cellula infettata e, mediante l'attività dell'enzima integrasi, integrarsi nel genoma della cellula ospite e sfruttare questo per la produzione di proteine e RNA virale. Le componenti virali che si saranno formate dalla trascrizione e traduzione del genoma integrato traslocheranno verso la membrana cellulare e formeranno una particella virale immatura. Questa verrà rilasciata all'esterno della cellula e mediante l'attività dell'enzima proteasi diventerà una particella virale matura idonea ad infettare ulteriori cellule. Nel caso dell'infezione latente il processo di replicazione virale si ferma all'integrazione del DNA virale all'interno del genoma della cellula ospite e non viene prodotta progenie virale. Tuttavia, in seguito a particolari risposte immunitarie è possibile che le cellule latenti nelle quali si era precedentemente integrato il virus vengano attivate e riprendano a produrre virioni.

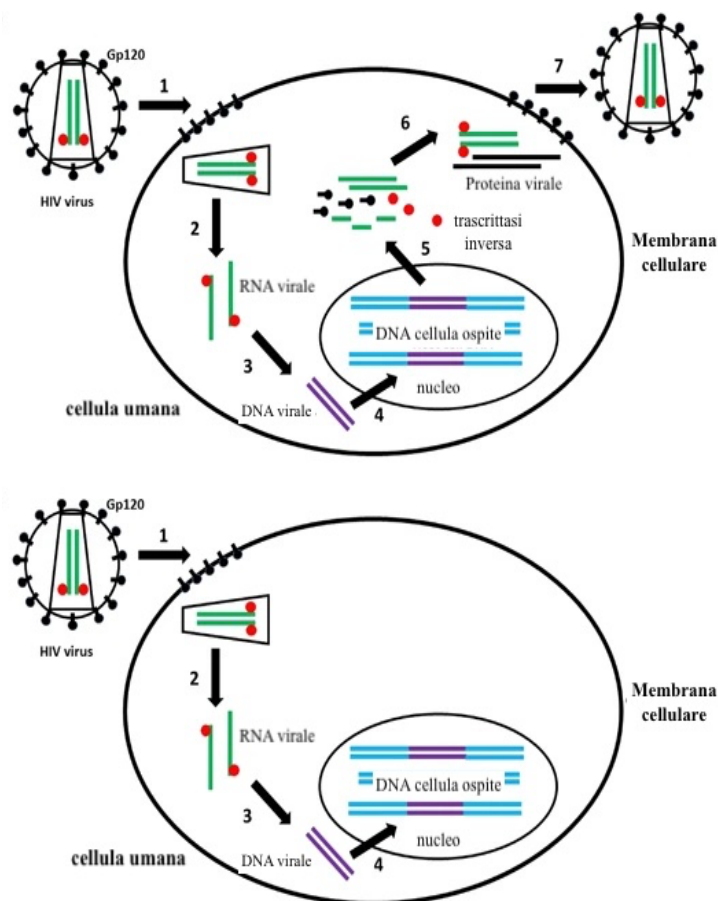


Fig 2. ciclo replicativo di HIV: infezione attiva e infezione latente. Modificato da "Current application of CRISPR/Cas9 gene-editing technique to eradication of HIV/AIDS." *Gene Ther.* Huang, Z., Tomitaka, A., Raymond, A. & Nair, M. (2017)⁶.

Uno dei principali compartimenti cellulari di riserva, ovvero nei quali il virus non si replica attivamente ma rimane latente integrato nel genoma, sono proprio i linfociti T CD4+ della memoria. Essendo cellule immunitarie della memoria e dovendo quindi garantire all'organismo una protezione immunitaria verso antigeni precedentemente incontrati, questi linfociti presentano un'emivita particolarmente lunga. Nonostante il virus integrato nel genoma rimanga latente può essere che, in seguito al riconoscimento tra il TCR del linfocita T e l'MHC (histocompatibility complex) di una cellula nucleata che esprime il peptide di attivazione, il linfocita T CD4 della memoria venga riattivato portando alla produzione di nuovi virioni. In seguito ad alcuni cicli di replicazione alcune cellule T andranno incontro a morte ed altre ritorneranno alla fase di latenza. Poiché queste cellule presentano il genoma virale integrato permetteranno un mantenimento stabile di riserva virale. È proprio questa riserva virale la principale responsabile della persistenza dell'infezione nonostante un'efficace terapia antiretrovirale, rappresentando in questo modo il più importante ostacolo alla eradicazione dell'infezione⁷.

4.2 Applicazione del sistema CRISPR-Cas9 per l'eradicazione dell'infezione da HIV

L'obiettivo dei numerosi clinical trials riguardanti l'applicazione del sistema CRISPR-Cas9 nei confronti dell'infezione da HIV è quello di escindere copie del DNA provirale dal genoma di cellule umane, in particolare numerosi sono stati gli esperimenti riguardanti cellule umane della linea linfoide.

Uno dei primi tentativi dell'applicazione del sistema CRISPR-Cas9 all'infezione da HIV è stato eseguito in Giappone nel 2013⁶. Si è cercato di eliminare il DNA provirale dai linfociti T andando a direzionare il sistema CRISPR-Cas9 presso le regioni LTR del provirus. In particolare, il DNA guida direzionava il sistema CRISPR-Cas9 alla sequenza di legame con Nf-Kb di U3 e alla sequenza TAR della regione R. L'introduzione di tagli all'interno della regione LTR, soprattutto della regione TAR, ha portato ad una efficiente riduzione dell'espressione di provirus attivo e una ridotta risposta del provirus latente. Tuttavia, durante questo studio sono emersi numerosi dubbi principalmente riguardo il delivery in vivo del sistema CRISPR-Cas9 e dei suoi possibili effetti off-target. L'abilità del sistema CRISPR-

Cas9 di agire sul DNA provirale è stata confermata e dimostrata un paio di anni dopo. Precedentemente si riteneva infatti che il sistema CRISPR-Cas9 fosse efficiente esclusivamente sulle cellule che stavano subendo un'infezione attiva da parte del virus, con una produzione di progenie virale. Durante questo studio è stato invece dimostrato che l'attività del sistema CRISPR-Cas9 non era maggiore su cellule pretrattate con attivatori trascrizionali come, ad esempio, TNF α rispetto a cellule non trattate, indice del fatto che agiva sul provirus.

Durante questi studi è emersa anche la necessità di direzionare la proteina Cas9 attraverso almeno due RNA guida con differenti target. Utilizzando un unico RNA guida si è osservato che spesso il virus era in grado di evadere da questo sistema, rendendo in questo modo la terapia inefficace. Il problema è stato risolto attraverso l'utilizzo combinato di due differenti RNA guida. Inoltre, al fine di limitare la formazione di mutanti virali in grado di evadere il sistema CRISPR-Cas9 è consigliato delineare degli RNA guida che presentano come target delle regioni molto conservate del genoma virale e che sono quindi fondamentali per la sopravvivenza del virus. Numerosi studi sono stati anche eseguiti per permettere l'eradicazione del DNA provirale da alcune cellule cerebrali, in particolar modo astrociti e cellule microgliali. La presenza di DNA provirale integrato a livello di queste cellule è infatti associato a numerosi disturbi neurologici (HAND) che possono essere cognitivi, motori o comportamentali. Questi disturbi sono molto frequenti tra gli individui che hanno sviluppato AIDS, in circa il 30-50% dei soggetti⁸. Lo studio eseguito nel 2017 si proponeva in particolar modo di individuare quali RNA guida fossero i più appropriati per un loro potenziale uso in vivo per l'eradicazione di DNA provirale integrato negli astrociti. Lo studio è stato eseguito in vitro e gli astrociti, una volta infettati da HIV, permettevano la produzione di una proteina fluorescente. In seguito, veniva somministrato il sistema CRISPR-Cas9 e, andando a misurare la fluorescenza ottenuta, si poteva dedurre quale RNA guida fosse più appropriato per permettere l'eradicazione del provirus dagli astrociti.

Molti degli studi eseguiti con l'obiettivo di eradicare il DNA provirale di HIV sono rimasti sospesi quando si è passato a studi non più in vitro ma in vivo. Infatti, agli studi in vivo si associano numerosi problemi principalmente dovuti al delivery del sistema CRISPR-Cas9. Numerosi siti di riserva del virus latente sono infatti

difficilmente raggiungibili mediante i sistemi più comunemente utilizzati. Il primo studio in vivo è stato eseguito nel 2016 sui topi per dimostrare che il sistema CRISPR-Cas9 era utilizzabile per l'eliminazione del DNA provirale in un'elevata varietà di cellule e tessuti. In questi studi il sistema CRISPR è stato trasportato mediante un vettore basato su un virus adeno-associati in cui sono stati inseriti i trascritti dei due RNA guida (uno verso la regione LTR e uno verso il gene *gag*). Da questo studio emersero ottimi risultati, infatti, dalle analisi condotte mediante PCR, si è notato che i geni *gag* e *pol* presenti nel genoma virale si erano ridotti di circa l'80-90% nei linfociti circolanti.

Una delle strategie più recenti in studio per l'eradicazione dell'infezione da HIV è basata sull'impiego coordinato di una terapia farmacologica LASER ART (Long Acting Slow Effective Release ART) e del sistema CRISPR-Cas9⁹. I profarmaci impiegati per la terapia LASER ART presentavano un elevato grado di liposolubilità e di idrofobicità, permettendo un'efficiente entrata nelle cellule presentanti il reservoir virale. Riguardo questa potenziale terapia coordinata è stata completata una sperimentazione preclinica in topi umanizzati infettati da HIV, portando all'eradicazione del genoma provirale in circa un terzo degli animali senza l'insorgenza di mutazioni off-target. Durante questo studio sono stati utilizzati dei topi umanizzati che presentassero la capacità di produrre linfociti T umani in modo tale da essere suscettibili all'infezione da HIV-1¹⁰. I 29 topi umanizzati che sono stati infettati da HIV sono stati suddivisi in quattro gruppi: un gruppo di controllo senza nessun trattamento, uno ha ricevuto il sistema CRISPR-Cas9 mediante adenovirus, un gruppo è stato trattato con la terapia farmacologica LASER ART e l'ultimo gruppo è stato prima trattato con la terapia LASER ART e, tre settimane dopo, è stato somministrato il sistema CRISPR-Cas9 mediante adenovirus. Il sistema CRISPR-Cas9 è stato direzionato mediante due RNA guida, uno per la regione LTR e uno per la sequenza del gene *gag*. Dopo 14 settimane è stata misurata la carica virale plasmatica e si è osservato che 2 dei 7 topi del gruppo trattato sia con la terapia farmacologica che con il sistema CRISPR non presentavano una carica virale rilevabile. Inoltre, in seguito ad un'analisi sui tessuti, è emersa una maggiore riduzione di DNA virale all'interno del gruppo che era stato trattato sia con la terapia LASER ART che con il sistema CRISPR-Cas9 rispetto agli altri gruppi che avevano subito solo uno dei due trattamenti. Nonostante il DNA

provirale non sia stato eliminato completamente in tutti gli animali trattati con questa strategia e che l'applicazione di questa terapia sull'uomo possa portare a dei risultati leggermente diversi, principalmente dovuti alla mancanza di un adeguato modello animale per queste sperimentazioni in vivo, questo studio ha dimostrato che l'eradicazione del DNA provirale in vivo è possibile e che potenzialmente potrà, in futuro, essere applicata anche all'uomo.

4.3 CRISPR-CAS9: futuro vaccino per la prevenzione dell'infezione da HIV?

Sono in corso numerosi studi focalizzati sull'applicazione del sistema CRISPR-Cas9 per la prevenzione dell'infezione da HIV. In particolare, gli studi si sono concentrati sull'eliminazione dei recettori impiegati dal virus HIV durante la sua prima fase del ciclo replicativo. Il virus HIV per penetrare all'interno della cellula necessita del legame con la proteina CD4. Tuttavia, la proteina CD4 rappresenta il principale recettore primario dei linfociti T umani ed è di fondamentale importanza per numerose azioni fisiologiche e di conseguenza non è possibile la sua delezione. Oltre al legame con CD4, HIV necessita però anche di un legame con uno dei co-recettori per proseguire con l'entrata nella cellula. Questi co-recettori presenti sulle cellule T sono rappresentati da CXCR4 e CCR5 e sono dei potenziali bersagli per il sistema CRISPR-Cas9 per la prevenzione da HIV. In particolare, in uno studio eseguito nel 2017¹¹, si è osservato che l'eliminazione dei co-recettori CXCR4 e CCR5 mediante il sistema CRISPR-Cas9 veicolato da un vettore lentivirale ha permesso una maggiore resistenza della cellula T all'infezione da HIV. Per eseguire questo studio è stata usata una combinazione di due differenti RNA guida in grado di legare i geni codificanti i co-recettori CXCR4 e CCR5 in cellule T CD4+. Per il delivery del sistema CRISPR-Cas9 è stato impiegato un vettore lentivirale (lenti-X4R5-Cas9) all'interno del quale sono state inserite le sequenze di RNA guida (Figura 3).

Il vettore lentivirale prodotto è stato in seguito utilizzato per trasdurre delle cellule T CD4+ isolate da campioni di sangue di donatori sani. Le cellule T CD4+ ottenute sono state in seguito testate per quantificare il numero di co-recettori CXCR4 e CCR5 espressi sulla superficie e per verificare la resistenza di queste cellule ad un'infezione da HIV. I livelli di espressione di CXCR4 e di CCR5 sono stati misurati dopo 3 giorni mediante cito-fluorimetria e i risultati hanno dimostrato che

i livelli di espressione si sono ridotti significativamente. La resistenza di queste cellule è stata in seguito testata esponendole alle due varianti tropiche del virus HIV (per CXCR4 e CCR5) e quantificando mediante test ELISA i livelli di p24 (antigene indicatore dell'attività di HIV) nel sovrinatante delle cellule 1, 3, 5 e 7 giorni dopo l'infezione. È stato osservato che il gruppo di cellule in cui era stato down-regolato sia il co-recettore CXCR4 che il co-recettore CCR5 presentava una maggior resistenza ad entrambe le varianti tropiche del virus, a differenza degli altri gruppi di cellule in cui veniva ridotta l'espressione di uno solo dei due co-recettori. Durante questo studio sono state eseguite delle analisi per la ricerca di mutazioni off-target senza però individuarne, confermando l'elevata specificità degli RNA guida utilizzati. Per escludere la potenziale tossicità conseguente dalla eliminazione dei co-recettori CXCR4 e CCR5 sono state eseguite delle analisi riguardanti il numero di cellule apoptotiche. Tuttavia non sono stati registrati valori significativamente diversi da quelli delle cellule non modificate. Nonostante sia necessaria maggiore efficienza del delivery in vivo del sistema CRISPR-Cas9 per permettere una protezione completa e non parziale dall'infezione, questo studio suggerisce la possibilità di sviluppo di un vaccino per la prevenzione e la cura dall'infezione da HIV¹¹.



Fig 3. Struttura del vettore lentivirale lenti-X4R5-Cas9. All'interno del vettore virale sono stati inseriti gli RNA guida per direzionare il sistema CRISPR-Cas9 verso i geni codificanti CXCR4 (gX4-1) e CCR5 (gR5). Da "Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection." *Cell Biosci.* Liu, Z. *et al.* (2017)¹¹.

4. CONCLUSIONI

L'infezione da HIV-1, nonostante le numerose cure attualmente disponibili che migliorano enormemente le aspettative di vita dei soggetti infetti, non permette un'eradicazione del DNA provirale. Per anni, prima dell'avvento della tecnologia CRISPR, si è tentato di trovare una cura definitiva per l'infezione da HIV, ma

invano. Negli ultimi anni, in seguito alla scoperta e al perfezionamento del sistema CRISPR-Cas9, numerosi sono stati i progressi nella ricerca di cura per l'infezione da HIV, in particolare per l'eradicazione del DNA provirale. Ciò che ha reso lo sviluppo di terapie così complicato è proprio la presenza del genoma virale integrato che permette una permanenza indeterminata del virus all'interno dell'organismo. Lo sviluppo di un appropriato RNA guida e di un vettore virale in grado di trasportare in modo efficiente il sistema CRISPR, sono alla base di quella che potrà essere considerata la cura per l'HIV. In particolar modo è fondamentale riuscire a sviluppare un vettore virale che permetta di veicolare il sistema CRISPR anche presso quelle cellule che presentano il virus latente, anche a livello delle cellule cerebrali poiché, come si è osservato in numerosi studi, numerosi sono gli aspetti neuro-patologici che ne derivano. Gli ottimi risultati emersi negli studi più recenti promettono ottime aspettative per potenziali future applicazioni terapeutiche. La combinazione della tecnologia CRISPR-Cas9 con la terapia HAART attualmente in uso può fornire un concreto miglioramento delle condizioni cliniche dei soggetti infetti da HIV, fino ad ottenere potenzialmente una loro guarigione.

Inoltre, l'enorme potenziale del sistema CRISPR è anche rappresentato dalla possibilità di sviluppare un vaccino che permetta la prevenzione dall'infezione da HIV. Grazie al silenziamento dei geni codificanti i co-recettori CXCR4 e CCR5 è possibile bloccare la fusione del virus HIV con la cellula CD4+ impedendo di conseguenza una sua replicazione. L'eliminazione di questi co-recettori, sulla base degli studi più recenti, non sembra avere conseguenze sull'attività fisiologica delle cellule, rappresentando così un ottimo target per il sistema CRISPR. Oltre che a fini preventivi, il silenziamento di questi geni può essere anche applicabile per ridurre la replicazione virale in un soggetto già infettato da HIV.

Dagli studi attualmente eseguiti emergono dati molto positivi e sembra che la ricerca si stia avvicinando sempre più ad una cura per una patologia che ormai da oltre quarant'anni risulta incurabile.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Sander, J. D. & Joung, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* **32**, 347–355 (2014).
2. Xu, C. L., Ruan, M. Z. C., Mahajan, V. B. & Tsang, S. H. Viral Delivery Systems for CRISPR. *Viruses* **11**, 28 (2019).
3. Hanlon, K. S., Kleinstiver, B. P., Garcia, S. P., Zaborowski, M. P., Volak, A., Spirig, S. E., Muller, A., Sousa, A. A., Tsai, S. Q., Bengtsson, N. E., Lööv, C., Ingelsson, M., Chamberlain, J. S., Corey, D. P., Aryee, M. J., Joung, J. K., Breakefield, X. O., Maguire, C. A. & György, B. High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat. Commun.* **10**, 4439 (2019).
4. Liu, C., Zhang, L., Liu, H. & Cheng, K. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *J. Controlled Release* **266**, 17–26 (2017).
5. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>.
6. Huang, Z., Tomitaka, A., Raymond, A. & Nair, M. Current application of CRISPR/Cas9 gene-editing technique to eradication of HIV/AIDS. *Gene Ther.* **24**, 377–384 (2017).
7. Ferguson, M. R., Rojo, D. R., von Lindern, J. J. & O'Brien, W. A. HIV-1 replication cycle. *Clin. Lab. Med.* **22**, 611–635 (2002).
8. Huang, Z. & Nair, M. A CRISPR/Cas9 guidance RNA screen platform for HIV provirus disruption and HIV/AIDS gene therapy in astrocytes. *Sci. Rep.* **7**, 5955 (2017).
9. Dash, P. K., Kevadiya, B. D., Su, H., Banoub, M. G. & Gendelman, H. E. Pathways towards human immunodeficiency virus elimination. *eBioMedicine* **53**, (2020).
10. Dash, P. K., Kaminski, R., Bella, R., Su, H., Mathews, S., Ahooyi, T. M., Chen, C., Mancuso, P., Sariyer, R., Ferrante, P., Donadoni, M., Robinson, J. A., Sillman, B., Lin, Z., Hilaire, J. R., Banoub, M., Elango, M., Gautam, N., Mosley, R. L., Poluektova, L. Y., McMillan, J., Bade, A. N., Gorantla, S., Sariyer, I. K., Burdo, T. H., Young, W., Amini, S., Gordon, J., Jacobson, J. M., Edagwa, B., Khalili, K. & Gendelman, H.E. Sequential LASER ART and CRISPR Treatments Eliminate HIV-1 in a Subset of Infected Humanized Mice. *Nat. Commun.* **10**, 2753 (2019).
11. Liu, Z., Chen, S., Jin, X., Wang, Q., Yang, K., Li, C., Xiao, Q., Hou, P., Liu, S., Wu, S., Hou, W., Xiong, Y., Kong, C., Zhao, X., Wu, L., Li, C., Sun, C. & Guo, D. Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Cell Biosci.* **7**, 47 (2017).