

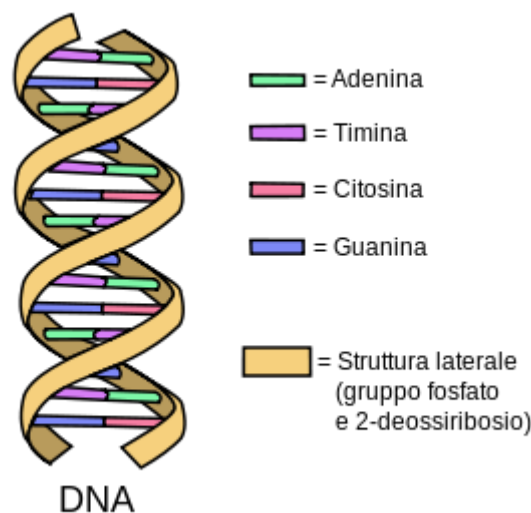
II CRISPR Cas9

Volgarizzato da Alberto Guidorzi

Ormai modificare un genoma di un vivente se non è di routine è comunque divenuto corrente: si può aggiungere un gene o attenuare un gene, ma il difficile era modificare un gene già inserito nel DNA. Ecco ora con la tecnica del CRISPR Cas9 la cosa è divenuta possibile.

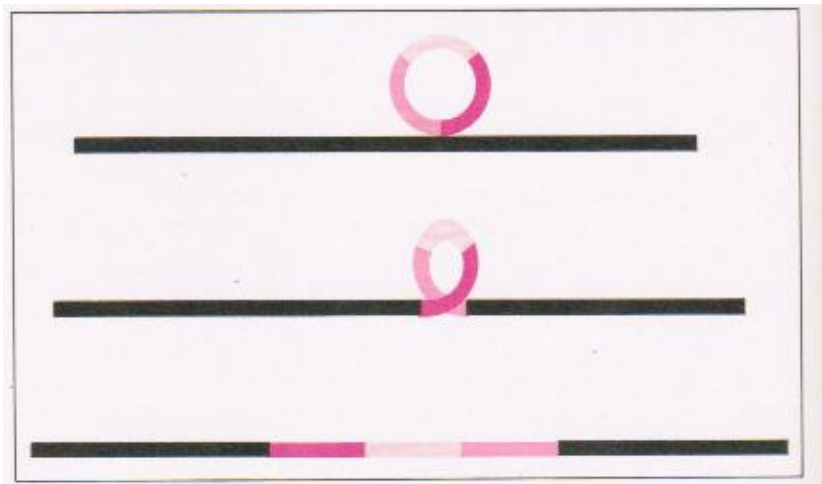
Come spesso capita, questa biotecnologia è scaturita da osservazioni fatte in tutt'altro contesto. Nel 1987 dei ricercatori giapponesi si sono accorti, studiando un batterio che al suo interno vi erano delle sequenze di basi azotate ripetute, ma che erano dei palindromi o meglio avevano una simmetria diadica. Per esemplificare, se noi osserviamo il vocabolo "ALA" lo possiamo leggere in ambedue i sensi, sia da destra che da sinistra, e pronunciamo sempre lo stesso vocabolo. Ecco questo si chiama "palindromo" e ne esistono anche di sillabici come le parole: "le-ta-le", "Ma-rem-ma", "Ne-ro-ne".

Vediamo di chiarire meglio cos'è un palindromo nel DNA. Il DNA è come una lunga scala elicoidale formata da due montanti che portano dei "mezzi pioli". Nella realtà sono delle basi azotate che si innestano una sull'altra per formare il piolo intero. Queste basi azotate che si susseguono nel DNA sono solo quattro: T (che sta per Timina), C (che sta per Citosina), G (che sta per Guanina), A (che sta per Adenina) ed in più vi è complementarità tra queste, nel senso che la Timina portata da un montante della scala forma il piolo solo con l'Adenina, mentre la Guanina forma il piolo solo con la Citosina. In altri termini un solo montante del DNA vedrà il susseguirsi di una serie lunghissima di 4 basi disposte senza un ordine preciso, mentre l'altro montante sarà la stessa cosa del primo ma la sequenza della basi dovrà essere tale che combacino solo il T con l'A e viceversa ed il G con il C e viceversa. Tutti gli esseri viventi hanno il loro DNA con questa struttura, ciò che varia è l'ordine del succedersi lungo i montanti delle 4 basi. Schematicamente questa è la rappresentazione:



Nel batterio si era scoperto che delle basi azotate erano palindromiche non proprio nel senso suddetto: TAGCCGAT..., ma presentavano un simmetria diadica come questa:AGGCGCCT... dove le prime quattro basi (AGGC) sono complementari delle ultime quattro (GCCT) lette all'inverso. Tale disposizione presenta il vantaggio che nella loro trascrizione in RNA (qui la timina è sostituita dall'Uracile) si appaiano come una forcina da capelli. Inoltre nulla vieta di vedere inserite tra le due sequenze altre serie diverse di basi azotate. Da qui il nome di CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats).

Questa osservazione dei ricercatori giapponesi rimase senza significato per una ventina d'anni, cioè fino a quando si scoprì che in questi batteri non era importante il palindromo, quanto quello che vi era in mezzo al palindromo. Infatti, si trattava di una sequenza di basi di origine virale e di conseguenza ci si chiese cosa ci faceva del DNA virale in mezzo al DNA batterico. La vera scoperta fu che esso serviva per difendere il batterio da un attacco virale, è, infatti, ben noto che in natura esistono virus batteriofagi. Vale a dire che il batterio è capace di una vita propria, mentre il virus ne è incapace, ecco spiegato il perché posso combattere un batterio parassita con un antibiotico e non posso usare lo stesso per combattere un virus (devo necessariamente uccidere anche la cellula che lo ospita). Il virus a DNA è costituito da un involucro proteico che ricopre un acido nucleico e finché non sono virulenti, ossia sono nello stato di riposo, rimangono tali, ma quando decidono di riprodursi allora si constata la loro suddetta incapacità, cioè devono iniettare il loro acido nucleico in un essere vivente in quanto solo questo gli riproduce il suo DNA (infezione virale) e gli permette di creare tante copie di quel virus che man mano, sempre all'interno del batterio, fa produrre le proteine involucrali che ricoprendolo lo fa entrare in stato di riposo, Ma in questo modo il virus si è riprodotto in tante copie. Solo che le pareti della cellula del batterio sono per queste copie di virus come una prigione, ecco che allora avviene la lisi della parete cellulare che, dissolvendosi, lascia liberi i virus. In questo modo il batterio viene distrutto ed ecco perché questo tipo di virus si chiama batteriofago. Il batterio però non è privo di difese, anzi mette in atto la produzione del "repressore" che impedisce la replicazione del DNA del virus e convive con quello iniziale iniettato, anzi lo inserisce nel suo DNA acquisendo altre caratteristiche utili per lui.



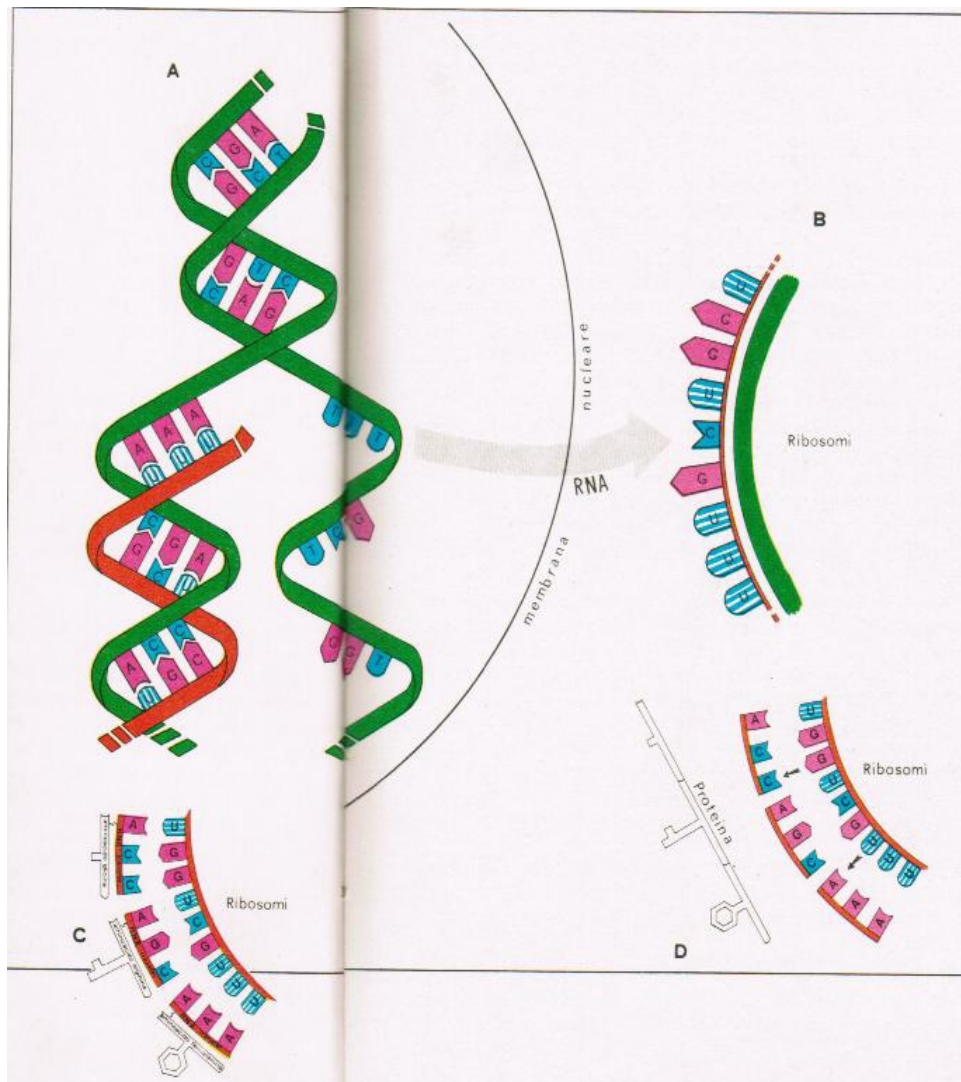
In colore è il DNA del batteriofago, mentre in nero è il DNA del batterio. Il primo taglia il DNA del batterio e vi si inserisce andando a far parte del genoma del batterio.

Poi si dice che è solo l'uomo a modificare il genoma dei viventi.....o con ciò fa una cosa innaturale.

Ecco il batterio incorpora anche solo dei piccoli tratti di DNA virale che una volta inframmezzati a sequenze palindromiche gli servono per individuare un eventuale virus che lo ha infettato una prima volta. Una specie di vaccinazione dunque, ma con una caratteristica importante rispetto alla vaccinazione che l'uomo pratica, vale a dire che questa è ereditaria, cioè ogni batterio figlio avrà questa informazione. Volgarizzando possiamo dire che quelle sequenze virali incorporate fungono esattamente come i manifesti che nei film western si affiggevano per informare il pubblico che si trattava di un ricercato e sull'individuo raffigurato era stata decretata una taglia che attira i cacciatori di taglie. Ecco, i cacciatori di taglie dei film, nel caso del CRISPR, sono degli enzimi denominati CAS che scoprono il materiale genetico nel genoma batterico e lo tagliano per neutralizzarlo.

Facciamo ora un passo ulteriore e diciamo che la disposizione delle basi azotate lungo i montanti del DNA (acido desossiribonucleico) è il "linguaggio" attraverso il quale il DNA (detto anche ADN) si esprime per dirigere la sintesi delle proteine che sono alla base di tutti i meccanismi vitali dei viventi e che sono formate da tante molecole concatenate dei 20 amminoacidi (i soli considerati proteinogenici) esistenti (ultimamente se ne sono aggiunti altri 2 o 3). La successione delle basi azotate costituisce dunque un vero e proprio "codice", detto appunto "codice genetico" ed è questo che permette di trasmettere alla cellula degli ordini ben

precisi (quando non sono precisi o modificati si determina una mutazione genetica) che servono appunto alla cellula per produrre quelle determinate proteine e non altre, Solo che affinché tale codice genetico "scritto" nel DNA possa effettivamente essere utilizzato per la sintesi delle proteine, è necessario l'intervento di un altro fattore che sia capace di trasportare il messaggio dal nucleo della cellula ai punti di fabbricazione delle proteine, cioè i ribosomi. Tale fattore è simile ad un singolo montante del DNA e si chiama RNA (acido ribonucleico). E' solo simile in quanto lo zucchero è il ribosio e non il desossiribosio, mentre una della quattro basi azotate non è più la timina, ma è l'uracile (U). Schematicamente avviene questo:



In A) la molecola di RNA messaggero (mRNA) viene sintetizzata su informazione del DNA (processo di trascrizione); In B) l'mRNA si è portato sul citoplasma nei ribosomi; In C) si ha la traduzione del codice genetico: le tre triplette dell'mRNA UGG, UCG e UUU corrispondono ai tre aminoacidi glicina, arginina e fenilalanina che vengono portati sul mRNA tramite i rispettivi RNA transfer; in D) si ha il distacco degli RNA transfer dall'mRNA, mentre gli aminoacidi si legano tra loro per formare la molecola proteica. Il numero e la posizione degli aminoacidi che costituiscono la proteina viene in tal modo determinato dal numero e dalla posizione delle basi azotate del tratto del DNA su cui si è formato l'mRNA specifico per quella proteina (Da Cognetti, Biologia oggi, Calderini)

Ecco che adesso possiamo spiegare come agisce l'enzima CAS. Quando in un batterio avviene un'aggressione da parte di un virus, egli si mette a indagare tra i suoi "manifesti dei ricercati" se ha subito un'altra aggressione da parte di quel virus. Per fare ciò va a ricercare tra tutte le parti di DNA racchiuse tra palindromi le sequenze virali memorizzate, le ritrascrive e le trasmette agli enzimi CAS (in altri termini fa come quando ai cacciatori di taglie si fornisce la foto dei vari ricercati). Essi si mettono a circolare nel citoplasma della cellula batterica e quando incontrano delle sequenze perfettamente sovrapponibili a quelle ricevute in memoria vi

si attaccano e provvedono al taglio ed a distruggere il virus prima che metta in atto il suo meccanismo di proliferazione.

Si tratta quindi di un meccanismo perfettamente naturale, ma per l'uomo rappresenta anche un meccanismo da copiare e usare per i suoi scopi. Cosa vi sia di tanta forzatura della natura a fare tesoro di una scoperta, come si vuol far credere, almeno per me è difficile da concepire. Io capisco solo che si tratta di paure inconsulte. L'idea dello sfruttamento è venuta a due donne una francese (Emmanuelle Charpentier) ed ad un'americana (Jennifer Doudna). Esse hanno lavorato con un enzima particolare denominato CAS9 (ecco svelato il nome dato al sistema) che non agiva solo su sequenze virali in modo preciso ma agiva anche in particolari punti del DNA cellulare in modo estremamente preciso. In altri termini il CAS9 operava una ricerca e eseguiva il taglio, ma alle ricercatrici interessava trasformare l'enzima da ricercatore-tagliatore in ricercatore-rimpiazzatore. Vale a dire che una volta individuata quella particolare sequenza si potesse levare e rimpiazzare con qualcosa d'altro. Ecco che allora si programmò il CAS9 per tagliare in punto preciso e si sfruttò il meccanismo naturale insito nelle cellule e che si mette in atto quando vi è una rottura del DNA di qualsiasi tipo sia. Si chiama *ricombinazione omologa*. In altri termini se noi mettiamo nelle vicinanze del taglio una sequenza da noi preparata essa viene usata per la riparazione, ma così facendo possiamo modificare il DNA di quella cellula e da qui costruire un individuo modificato secondo i nostri scopi. Ecco in questo caso indipendentemente dalla tecnica qui esposta si crea un OGM (si è trasferito del DNA esogeno) che quindi deve sottostare alle regolamentazioni vigenti per questa categoria di esseri viventi, piante, animali e uomo che siano.

Ma si possono ottenere risultati pratici interessanti anche operando solo queste due modifiche:

- ! Inattivazione di un gene con rottura in un punto predisposto e con riparazione difettosa (eliminazione o inserzione di qualche base)
- ! Gene editing, modificazione in un sito predisposto a priori di qualche nucleotide di quel determinato gene. La matrice preparata in laboratorio non inficia l'assimilazione.

Solo che in questo caso non si tratta di OGM (non si è trasferito nessun pezzo di DNA esogeno come esige la definizione), si è solo modificato in modo puntiforme una sequenza nelle basi azotate del DNA, che evidentemente provoca un comportamento diverso dell'essere vivente modificato, ma che è assimilabile, da un punto di vista degli effetti, alle mutazioni spontanee che avvengono numerose in natura. In termini meno criptici: se uno non dice che ha usato il CRISPR CAS9 per operare la modifica ed invece afferma che ha solo sfruttato una mutazione naturale che ha avuto la fortuna di osservare, sfugge alla regolamentazione OGM. Infatti non vi è nessuna tecnica che possa svelare l'agire umano o la casualità nella modifica apparsa.

Che cosa fa differire il metodo CRISPR CAS9 per creare OGM e le metodologie già in uso come l'uso dell'Agrobatterio o dello sparare DNA esogeno all'interno del nucleo di una cellula? Sono tre e non indifferenti: la precisione (si agisce a livello di base azotata), i costi ed i tempi. Questi ultimi due aspetti ci sembrano la vera novità. Infatti, anche prima occorreva creare una proteina enzimatica che tagliasse in un punto preciso, ma per crearla occorrevano anche 10 anni e con costi notevoli, oggi invece la proteina è sempre quella, basta programmarla diversamente con un piccolo tratto di RNA. Più in chiaro, una volta stabilito il punto preciso del DNA da bersagliare per tagliarlo basta comprare l'RNA specifico. Esso si trova in commercio a dei prezzi ormai irrisori (65 € per ogni RNA specifico). Quindi a tutti i laboratori pubblici o privati sono accessibili questi veri e propri kit specifici. Infatti assistiamo ormai nel mondo ad un proliferare di modifiche genetiche in vegetale, animale e perfino nell'uomo (batteri, lieviti, vermi, topi pesci e cellule umane). In altri termini il meccanismo è universale e funziona ovunque ed è divenuto di uso routinario per:

- ! Scoprire a cosa serve un gene e quale funzione biologica svolge (noi ormai sappiamo la precisa localizzazione dei geni sul DNA di certi esseri viventi interessanti, ma non sappiamo qual è la funzione di tutti questi geni, ma solo di alcuni). Infatti basta modificare o tagliare un gene con la nucleasi CAS9 per vedere quale carattere è

venuto meno. Ad esempio, la modifica di geni specifici in linee cellulari per studiare una malattia oppure la creazione di pool di delezione del gene per saperne di più sul cancro.

- ! Rendere di routine certe modifiche di batteri, cosa già eseguita con i metodi tradizionali con l'E. Coli OGM a cui si è inserito il gene per fargli produrre insulina che ormai i diabetici insulinodipendenti usano per iniettarsi, al fine di far loro produrre tante altre sostanze a noi utili, come ad esempio produrre biocarburanti.
- ! Realizzare programmi di salute pubblica come quella di non rendere infettanti tramite il plasmodio della malaria le zanzare anofele. Ricordo che la malaria è il più grande assassino mondiale in quanto fa circa 655.000 morti l'anno.
- ! Ridare speranze a genitori portatori di malattie ereditarie causate da un solo gene difettoso (mucoviscidosi, miopia, malattia di Huntington, emofilia A, fenilacetoneuria ecc. ecc.). Certo bisogna qui subito dire che le modifiche non serve portarle a livello di cellula somatica (sarebbero miliardi da modificare e poi e poi ...) ma occorre modificare l'embrione per poter trasmettere questa a tutte le cellule che si formeranno. La cosa è stata operata per sperimentazione sui macachi (un particolare tipo di scimmia) e in Cina lo hanno fatto anche su un embrione umano modificando il gene che provoca la talassemia. Si comprende che qui entriamo in un campo molto delicato perché entriamo nell'ambito dell'eugenetica. Infatti le implicazioni hanno già fatto oggetto di una conferenza:
http://www.lescienze.it/news/2015/12/07/news/dibattito_eticoo_miglioramento_genoma_washington_crispr-2885570/?refresh_ce

Conclusioni: La tecnica del CRISPR CAS9 ha dell'inimmaginabile: messa a punto nel 2013 essa ha avuto uno sviluppo folgorante e come traspare da quanto detto le implicazioni sono divenute molto impattanti in tutto il mondo della scienza, La sua semplicità e disponibilità diffusa ha avviato una corsa all'uso. Solo che si intravedono possibilità di oltrepassare limiti che investono l'etica, la convivenza, ma anche i rapporti di forza tra Stati e zone geografiche quindi è ora che si prendano decisioni, consci anche che i tempi sono molto ristretti perché la scienza avanza in modo che lascia interdetti. Attenzione: bisogna darsi un codice, non serve a niente la semplice proibizione; la scienza prima o dopo la aggirerebbe, come è avvenuto tra OGM creati tramite agrobatterio e OGM creati con tanti altri sistemi oggi alla portata di tutti.