



Manlio Palumbo
Studioso senior dell'Università di Padova
manlio.palumbo@unipd.it

FORBICI GENETICHE: NOBEL 2020 PER LA CHIMICA

Le forbici genetiche, messe a punto da Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna, Premi Nobel 2020 per la Chimica, rappresentano un nuovo potente strumento per modificare in modo univoco e predefinito il DNA genomico. Le ricadute pratiche sono di enorme portata sia nel campo della salute dell'uomo per la cura di malattie genetiche, incluso il cancro, sia nel settore agro-alimentare. L'uso della nuova metodologia sull'uomo presenta cruciali risvolti etici.



Emmanuelle Charpentier (a destra) e Jennifer Doudna (a sinistra), Premi Nobel 2020 per la Chimica

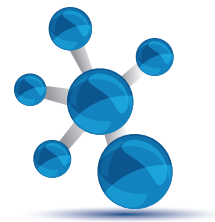
È da sempre un'aspirazione dell'uomo trascendere le leggi della natura per impartire alla materia proprietà nuove e predefinite. Nei tempi antichi questo desiderio si estrinsecava nella ricerca del *lapis philosophorum*, dotato di tre proprietà sostanziali. Fungeva infatti da elisir per donare l'immortalità e curare ogni tipo di malattia, conferiva la conoscenza del passato e del futuro, oltre che del bene e del male, e, infine, godeva della prerogativa, rimasta maggiormente impressa nell'immaginario collettivo, di trasformare in oro i vili metalli. Ahimè, questo catalizzatore onnivale, prezioso e misterioso, è rimasto confinato nell'ambito filosofico (con qualche digressione nella magia e nell'astrologia), oggetto di disquisizione parascientifica nel periodo dell'alchimia e della iatrochimica.

Oggi non occorre più invocare la metafisica per operare modifiche sostanziali sulla materia, quella

vivente *in primis*, né inventare complicati processi artificiali di esito incerto. Possiamo, infatti, sfruttare meccanismi fisiologici, e quindi naturali, già messi a punto dai processi evolutivi, che non necessitano di venire concepiti, ma solo di essere portati alla luce. E non è che la scoperta valga meno dell'invenzione, perché, citando Marcel Proust, *le véritable voyage de découverte ne consiste pas à chercher de nouveaux paysages, mais à avoir de nouveaux yeux* (il vero viaggio di scoperta non consiste nel cercare nuovi orizzonti, ma nello scrutare con nuovi occhi). Proprio questo è capitato a Emmanuelle Charpentier e a Jennifer Doudna, insignite del Premio Nobel 2020 per la Chimica. Con l'inevitabile corollario che la serendipità gioca sempre un ruolo considerevole nell'accompagnare l'uomo sulla via della conoscenza.

Le premesse

Ecco due ricercatrici interessate, con finalità originariamente diverse, allo studio dei meccanismi tramite i quali le cellule batteriche si proteggono dall'infezione di virus o altri agenti. La francese Charpentier, specializzata in ambito microbiologico, sviluppa le sue ricerche in Paesi diversi e in vari laboratori prima in Francia (dottorato all'Istituto Pasteur con un periodo alla Rockefeller University), poi per cinque anni negli Stati Uniti e, infine, nuovamente in Europa (Austria e Paesi Nordici). Nonostante la vocazione da *globetrotter* tutte le indagini di Charpentier hanno come denominatore comune i processi di infezione di batteri da parte di virus.



In parallelo un'altra studiosa di valore, la statunitense Doudna, di qualche anno meno giovane, completa il Dottorato in Chimica Biologica e Farmacologia Molecolare alla Harvard Medical School sotto la guida di Jack Szostak, Premio Nobel per la Medicina nel 2009. In seguito, svolge per quattro anni attività post-dottorato all'Università del Colorado con Thomas Cech, Premio Nobel per la Chimica nel 1989, acquisendo, come la collega francese, esperienza multidisciplinare ad altissimo livello nell'ambito chimico e biologico-farmacologico. Specificatamente, ha affrontato il mondo dell'RNA, cavallo di battaglia del laboratorio di Cech. In quel periodo si studiavano nella cellula le funzioni di corte sequenze di RNA interferenti quali regolatori dei processi di espressione genica. Prima ancora di entrare nel merito degli studi che hanno portato al prestigioso riconoscimento del Nobel, vorrei fare alcune considerazioni su come Emmanuelle e Jennifer si siano preparate a diventare ricercatrici di successo, per trasferire il messaggio ai numerosi giovani in formazione nelle nostre università.

Appare anzitutto particolarmente utile acquisire esperienza in più di un laboratorio di alto profilo, affrontando tematiche distinte, possibilmente convergenti, sia per orientarsi sulle scelte future riguardo a se stessi, sia per poter interloquire autorevolmente con colleghi/collaboratori nell'ambito multidisciplinare, oggi imprescindibile a livello internazionale. Un secondo aspetto critico è la scelta di mentori di indiscusso valore scientifico, come nei casi appena esaminati. Nobel genera Nobel...

Tra gli ulteriori ingredienti richiesti a un valido ricercatore sottolineo, sempre rifacendomi alle due premiate, doti personali quali l'amor di sapienza (la φιλοσοφία di Platone e di Pitagora), la dedizione agli studi e il sacrificio: la ricerca scientifica richiede disponibilità incondizionata delle nostre risorse fisiche e mentali e lascia ben poco spazio ad altri interessi o impegni. In cambio procura soddisfazioni inestimabili, come quella celebrata in questo articolo. Incoraggiato dai fulgidi esempi passati in rivista, mi permetto anche di sollecitare una riflessione sull'organizzazione delle nostre Scuole per offrire percorsi di formazione adeguati e competitivi, destinati a far crescere l'Uomo nel suo complesso, oltre che lo Scienziato.

L'incontro

Torniamo ora alle premiate, dopo averne apprezzato l'approfondita preparazione scientifica in realtà stimolanti e produttive. L'interesse scientifico comune e le competenze complementari facevano presagire potenziali sinergie collaborative. L'occasione di un incontro si presentò casualmente nel 2011 non in una prestigiosa sede accademica, ma in un modesto caffè di Porto Rico, quasi in sordina, fuori dai circuiti scientifici che contano. Bastarono pochi minuti per capire che la possibile collaborazione avrebbe portato buoni frutti. Infatti, a circa un anno di distanza, appare sull'esclusiva rivista *Science* la prima pubblicazione congiunta dal titolo: *A Programmable Dual-RNA - Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity*, che chiarisce i dettagli molecolari delle forbici genetiche o, per gli addetti ai lavori, di CRISPR.

CRISPR

Questo iniziale, ma fondamentale contributo che ha spianato la strada verso il Premio Nobel 2020, spiega in modo esauriente la strategia di difesa di un batterio (nel caso in esame *Streptococcus pyogenes*) di fronte a infezioni virali che ne causano la lisi. A tale processo è stato attribuito il nome CRISPR/Cas9 o più semplicemente CRISPR. La sigla rappresenta l'acronimo per *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*. Infatti, nel genoma batterico si trovano brevi sequenze palindromiche ripetitive di DNA raggruppate a intervalli regolari. Questo particolare arrangiamento (sequenza ripetitiva alternata a sequenza non ripetitiva) era già stato descritto in letteratura una quindicina d'anni prima del fatidico incontro di Porto Rico, ma all'epoca gli autori non avevano approfondito l'argomento, limitandosi ad affermare che la funzione di queste ripetizioni era sconosciuta.

Il merito di Charpentier e Doudna è di aver capito che le sequenze variabili corrispondono a materiale genetico proveniente da sequenze virali immagazzinate dal batterio a memoria dell'insulto subito. Una specie di sistema immunitario con repertorio di sequenze virali che servono per immunizzare il batterio da infezioni successive prodotte dallo stesso microorganismo. Come spesso accade, i primi tentativi *in vitro* usando il DNA bersaglio e la desossiribo-

nucleasi che lo processa (Cas, **CRISPR-associated**) non sortirono l'effetto sperato, in quanto non si produceva alcuna degradazione dell'acido nucleico. La formazione a livello cellulare di corte sequenze di RNA complementari con tratti dell'acido nucleico infettante, a somiglianza dei processi di interferenza a RNA, fece balenare l'idea che i corti frammenti presenti nel batterio non fossero meramente prodotti di degradazione, ma svolgessero un ruolo funzionale. Infatti, per realizzare la frammentazione del DNA bersaglio sono necessari due brevi filamenti guida di RNA **CRISPR** (crRNA) in parte complementari tra loro e in parte con la sequenza di taglio, caratteristica della specie infettante. Legandosi alla/e Cas e al DNA bersaglio, i ribonucleotidi producono in entrambi i componenti le modificazioni conformazionali necessarie per consentire l'assemblaggio del complesso attivato e, di conseguenza, la demolizione della componente desossiribonucleica. A riprova, aggiunti *in vitro* alla miscela nucleoproteica, i crRNA causano l'immediata rottura del DNA, confermando il ruolo attivo nel processo di taglio. L'effetto permane quando si uniscano covalentemente le due catene di crRNA attraverso un *linker*, formando una sequenza chimerica.

Il meccanismo che ne emerge, schematizzato in Fig. 1, si svolge in tre momenti:

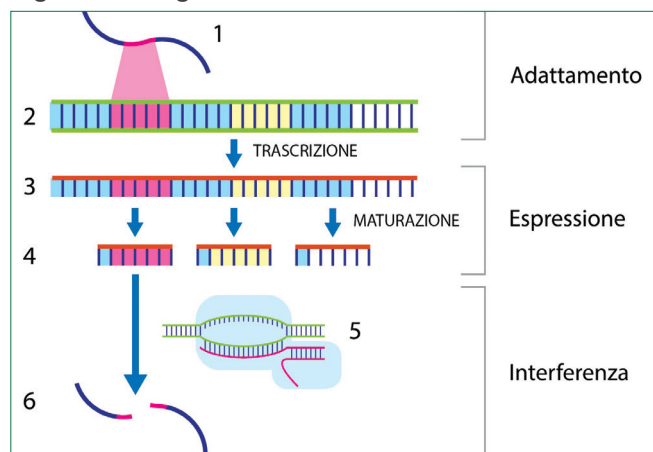


Fig. 1 - Meccanismo di difesa tramite il processo CRISPR di un batterio infettato da un virus. Nella fase di adattamento, il batterio incorpora frammenti di DNA virale (1) nel proprio genoma (2). Nella fase di espressione, il trascritto (3) si scinde in corte sequenze di crRNA interferenti (4) le quali attivano il processo CRISPR (5, vedi Fig. 2). Nella fase di interferenza, il DNA virale (6) viene degradato nel complesso nucleo-proteico e, di conseguenza, l'infezione si arresta. Le barre tra i filamenti rappresentano l'appaiamento di basi complementari

- 1) adattamento, che prevede l'incorporazione di una sequenza di DNA infettante nel genoma batterico;
- 2) espressione (trascrizione e maturazione) della sequenza di RNA codificata, che produce una serie di frammenti CRISPR (uno per tipo di infettante);
- 3) interferenza in occasione di successivo inserimento di materiale genetico infettante, che viene scisso nel complesso nucleo-proteico formato dal DNA bersaglio, da due molecole di crRNA guida e una o più unità di nucleasi Cas (a seconda del tipo di batterio) che provocano il taglio del DNA invasore, degradandolo e quindi impedendone la replicazione. Il caso più semplice è rappresentato da Cas9, presente come unica nucleasi nello *Streptococcus pyogenes* e quindi più facile da utilizzare.

Il complesso CRISPR è schematizzato in maggiore dettaglio in Fig. 2, dove sono evidenziate le interazioni DNA-crRNA e crRNA-crRNA.

Elucidare un meccanismo come quello citato poteva sembrare più che soddisfacente per un buon ricercatore, ma, si sa, l'appetito viene mangiando, e in questo caso la domanda successiva che Charpentier e

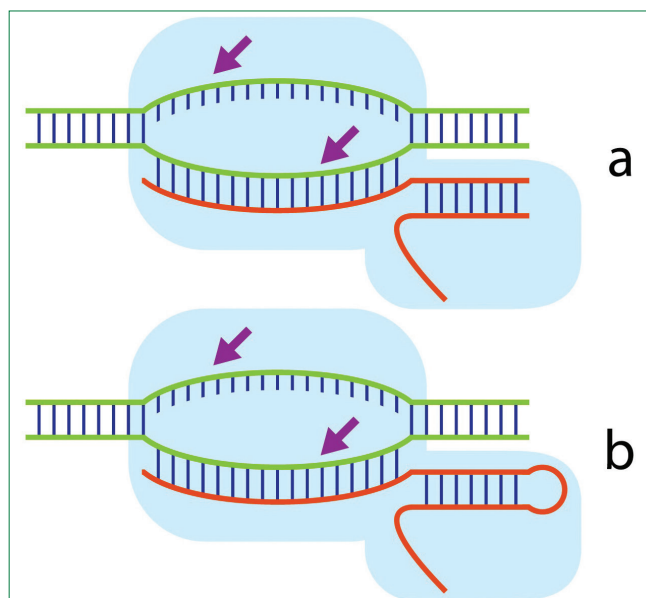
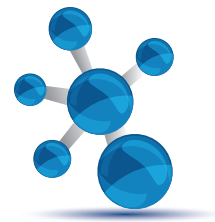


Fig. 2 - Modello del complesso CRISPR composto dalla/e proteina/e Cas (in azzurro), dal DNA virale infettante (in verde) e da due sequenze di crRNA guida (in rosso) accoppiate tra loro tramite l'appaiamento di basi, pannello a), o fuse in una struttura chimerica che unisce covalentemente i terminali 3' e 5' delle sequenze guida, pannello b). Le frecce indicano i siti di taglio



Doudna si sono poste riguarda la possibile estensione della metodologia a qualsiasi sequenza di DNA, ingegnerizzando opportunamente la struttura del crRNA (o della chimera, vedi Fig. 2, pannello b), per renderlo complementare alla sequenza di DNA che si vuole scindere. Si ottiene così un sistema di taglio universale estremamente preciso in quanto indirizzato dai crRNA, che apre le porte all'impiego di CRISPR per operazioni di *editing* del genoma con una tecnica di taglio semplice, accurata, rapida e poco costosa, seguita dai collaudati protocolli di ricombinazione omologa e non omologa del DNA (Fig. 3). Tale approccio permette di studiare la funzione di un singolo gene, o di vari geni in contemporanea, tramite delezioni o mutazioni, nonché di modificare la sequenza locale di un gene mutato, ripristinando il genotipo originale o alterandolo in modo predeterminato per creare nuovi genotipi personalizzati. L'orizzonte che si apre fa capire come l'elucidazione del processo CRISPR rappresenti un evento epocale capace di trasformare radicalmente i paradigmi e le prospettive della ricerca genomica, facendole compiere un sostanziale balzo in avanti. Per comprendere l'attenzione che riceve la tematica e il vasto interesse che suscita, basti pensare che sull'argomento vengono attualmente pubblicati circa 6.000 articoli all'anno. Inoltre, è stato fondato *The CRISPR Journal* (Mary Ann Liebert) dedicato totalmente alla nuova tecnologia.

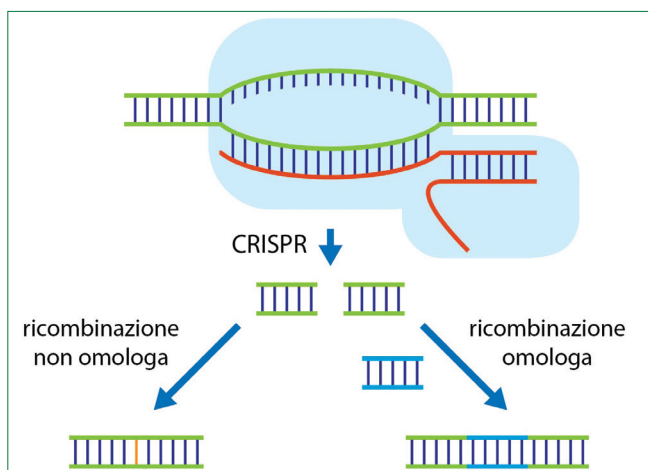


Fig. 3 - Impiego del meccanismo CRISPR per processi di *editing* genomico con ricombinazione omologa che produce l'inserimento di nuove sequenze (in blu), o ricombinazione non omologa che produce delezioni o inserzioni (barra verticale gialla)

Gli sviluppi

Gli sviluppi riguardano vari aspetti migliorativi della metodologia e le sue possibili applicazioni.

Prima di tutto il processo CRISPR si attua su microorganismi infettanti con genoma a DNA a doppio filamento (Fig. 2). Con opportune modificazioni è divenuto estensibile anche a virus a singola catena di DNA o RNA. Si può interferire, dunque, praticamente con tutti i possibili infettanti. Inoltre, sono state caratterizzate numerose tipologie di Cas, con specifici ambiti di applicazione. Si può variare, infatti, il peso molecolare della proteina, il numero di molecole di crRNA necessarie per scindere il DNA bersaglio, i siti d'azione delle nucleasi, le modalità di taglio e i requisiti per il processo di trascrizione, aumentando a dismisura il già amplissimo armamentario disponibile per la procedura di *editing* genomico guidato. L'ambito di utilizzo riguarda studi di base condotti a scopo conoscitivo, oppure studi applicativi in campo biotecnologico. Mentre per i primi il panorama è così vasto da non poter essere riassunto in poche righe, se non ripetendo un'affermazione riportata di recente che identificava la fantasia quale unico limite ai progetti realizzabili, la situazione si fa diversa quando si passa a studi *ex-vivo* o *in vivo*. Questi possono essere svolti su piante, su animali e sull'uomo, quindi riguardano i settori agro-alimentare e della salute con lo scopo di migliorare le proprietà dei cibi (vegetali e animali), come durata, appetibilità e caratteristiche organolettiche, preservare le specie da infezioni o insulti da parte di microrganismi e altri agenti esogeni, curare le malattie genetiche, produrre nuovi protocolli terapeutici e sviluppare metodologie diagnostiche ad alta efficienza. Anche in questi casi, come si vede, le prospettive di CRISPR appaiono quasi illimitate. Soffermandoci sugli studi correlati alla salute dell'uomo, per quanto riguarda la diagnostica molecolare, la metodica CRISPR può venire utilizzata con successo in test genetici, accoppiandola a piattaforme note, per rilevare la presenza di acidi nucleici infettanti di provenienza virale e batterica. Come sottolineato in precedenza, la tecnica è rapida, con alta resa e costi ridotti.

Sono tristemente noti a tutti noi gli effetti devastanti prodotti dalla pandemia da SARS-CoV-2 tuttora in corso. Come sappiamo, la rivelazione dell'infezione

richiede attualmente tempi lunghi. Esistono anche metodi rapidi, ma la loro attendibilità diminuisce a livelli preoccupanti, dando, in particolare, falsi negativi. È ora in corso la messa a punto di una metodica CRISPR per la rivelazione del Coronavirus, che potrebbe presto soppiantare le metodiche di analisi sin qui applicate.

Sperimentazione su pazienti

Un altro discorso vale per l'uso di terapie geniche sull'uomo. Qui la problematica della sicurezza del paziente acquista un valore preponderante dato che è in gioco la vita umana e, per quanto molto precisa, anche la tecnica CRISPR può procurare spiacevoli sorprese a causa dell'enorme complessità degli organismi viventi. A volte quello che non si riscontra *in vitro*, può verificarsi *in vivo* per interazioni, anche deboli, fuori bersaglio. Dato che finora il fenomeno si è presentato in circa il 50% dei casi, forse a buona ragione i clinici pensano che i tempi del CRISPR non siano ancora del tutto maturi. I tentativi in atto tendono a utilizzare forme ingegnerizzate di Cas9 capaci di rendere sempre meno efficaci i legami aspecifici rispetto a quelli specifici.

La somministrazione può avvenire sia *ex vivo* con cellule del paziente espianate, ingegnerizzate e reimpiantate o direttamente *in vivo*. Con grande attenzione ai problemi della sicurezza del paziente si stanno ora conducendo trial clinici riguardanti il trattamento contro l'HIV, un approccio immunoterapico per il cancro e, infine, un tentativo di cura della cecità ereditaria. Molti altri sono in fase di allestimento. Non possiamo ancora dare una valutazione certa dei risultati perché gli studi sono iniziati solo di recente. Le aspettative sono, al momento, improntate a un cauto ottimismo.

Bioetica

La precisione e l'accuratezza con cui si può oggi modificare il patrimonio genetico di un essere umano usando la metodologia CRISPR generano inevitabilmente questioni etiche e morali, particolarmente sentite qualora si operi su cellule staminali, o ancor più, su embrioni in grado di trasmettere nuovi tratti genetici.

Non si disserta di fantascienza perché recentissime pubblicazioni rivendicano di aver effettuato in em-

brioni l'*editing* desiderato solo sulla sequenza pre-stabilita e con efficienza totale, quindi senza effetti collaterali. Dato che spesso si invoca prudenza per l'uso di metodologie non completamente affidabili, oggi l'annunciato raggiungimento di adeguati livelli di sicurezza con i nuovi protocolli, anche se ancora da verificare appieno, suggerisce un'accelerazione degli studi sull'uomo. Si pensi, infatti, agli enormi vantaggi che comporterebbe il ripristino della funzionalità fisiologica in geni correlati a patologia, se si considera che le malattie genetiche riportate sono oltre 3.000, incluso il cancro.

Ovviamente ogni medaglia ha il suo rovescio. Se la tecnica cadesse nelle mani di ricercatori senza scrupoli, in assenza di strette regolamentazioni, potrebbero nascere fabbriche di "uomini su misura" con conseguenze disastrose per la specie umana. Parafrasando Manzoni: *adelante CRISPR con juicio*.

Abbreviazioni

Acronimo	Termine esteso
CRISPR	Brevi sequenze palindromiche ripetitive di DNA raggruppate a intervalli regolari
Cas crRNA	Proteine associate a CRISPR Brevi sequenze di RNA associate a CRISPR
DNA	Acido desossiribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
HIV	Virus dell'immunodeficienza umana
SARS-CoV-2	Sindrome respiratoria acuta grave da Coronavirus 2

Bibliografia

Data l'enorme quantità di riferimenti reperibili nelle banche dati relativi alla delucidazione del meccanismo molecolare CRISPR e agli sviluppi che ne conseguono (Charpentier e Doudna da sole contano oltre 60 pubblicazioni nelle prestigiosissime riviste *Nature* e *Science*), mi limito a citare i quattro (!) lavori che vedono insieme come co-autrici entrambe le premiate. Evidentemente sono bastati a lasciare una traccia indelebile nella storia della Scienza.

[1] M. Jinek *et al.*, *Science*, 2012, **33**, 816.

[2] E. Charpentier, J.A. Doudna, *Nature*, 2013, **495**, 50.

[3] M. Jinek *et al.*, *Science*, 2014, **343**, 1247997.

[4] J.A. Doudna, E. Charpentier, *Science*, 2014, **346**, 1258096.