

Conferenza

6 marzo 2018

Dal Laboratorio alla Clinica: le nuove scienze bio-mediche tra etica, creatività e tecnologia

F. Belli

Le biotecnologie costituiscono una delle frontiere estreme della ricerca e stanno trasformando per sempre la scienza e il nostro modo di intendere la natura e noi stessi; pongono straordinarie sfide culturali, politiche e sociali, come l'accesso ai dati genetici, le nuove prospettive della terapia attraverso la medicina personalizzata, le applicazioni sempre più sofisticate della ricerca di base, dal laboratorio, alla clinica. In particolare, la genetica oggi coinvolge ogni aspetto della nostra vita, dalla medicina all'alimentazione, dall'agricoltura alle indagini poliziesche e forensi; le sue applicazioni pratiche "creano" nuove terapie. A livello etico, filosofico e psicologico, ne scaturisce una congerie di argomenti su cui si concentra un acceso dibattito: attrazione o repulsione verso la prospettiva di conoscere tutti i segreti del nostro genoma, ambizioni di immortalità, vita sintetica o artificiale, ricerca di DNA di esseri estinti, clonazione e nuove modalità riproduttive, cibi transgenici; sono tutti temi che dobbiamo imparare ad affrontare con razionalità e senso di responsabilità, senza lasciarci prendere da entusiasmi acritici o da paure immotivate¹. Fino all'ultima frontiera: l'editing e la manipolazione del nostro e di altri genomi. In quest'ambito, CRISPR-Cas9, introdotta solo 4 anni fa, si propone già come una metodica di riferimento per semplicità, precisione ed economicità, superiore alle altre finora utilizzate e dalle enormi potenzialità anche nella pratica clinica²; messa a punto nelle impostazioni teoriche da J. Doudna, grande esperta in RNA e dalla microbiologa E. Charpentier, è stata impiegata ben presto in sperimentazioni sulle cellule eucariotiche, comprese quelle umane, grazie al lavoro di F. Zhang³, già famoso per aver ideato l'optogenetica e di G. Church⁴, biologo visionario e futurista. Questi ricercatori, indicati come prossimi premi Nobel, si sono comunque avvalsi di precedenti, fondamentali osservazioni di altri non meno importanti scienziati, a iniziare da F. Mojica⁵, cui si deve la prima osservazione in un batterio, *Haloferox mediterranei*, e poi in altre specie di batteri e archeobatteri, di sequenze ripetute di origine virale, un archivio connesso con la difesa immunitaria, poi denominato da lui stesso CRISPR.

Dopo soli 18/24 mesi dalla comparsa ufficiale di CRIPR-Cas9 sulle principali riviste scientifiche, sono stati pubblicati da ricercatori cinesi i primi due articoli riguardo l'utilizzo della nuova tecnica su cellule germinali umane: era quasi inevitabile che prima o poi apparissero reports di esperimenti, con le nuove tecniche di editing genetico, sulle cellule embrionali e germinali umane, dunque in grado di indurre modificazioni ereditabili dalla progenie e teoricamente irreversibili. I due studi, che riporteremo più avanti in dettaglio, non hanno dato i risultati sperati; riguardavano, il primo, la possibilità di prevenire le mutazioni responsabili delle talassemie, il secondo, di replicare nel gene codificante il corecettore CCR5 dei linfociti una rara mutazione che rende le cellule resistenti

all'infezione da HIV. Ma tanto è bastato per rinfocolare polemiche e dibattiti sulle sperimentazioni nelle cellule staminali ed embrionali umane, come già avvenuto in passato con l'introduzione di nuove procedure (DNA ricombinante, clonazione).

CRISPR è comunque ritenuta la maggior innovazione biotech dai tempi della PCR⁶: ci chiediamo se sia una scoperta o un'invenzione, un processo naturale o una piattaforma tecnologica, dato che in definitiva è un'arma di difesa dei batteri dalle infezioni; non è una differenza di poco conto, perché alla sua definizione sono legati brevetti, premi e un giro vorticoso di denaro. Rimane, indiscutibile, la creatività degli scienziati, che sono stati in poco tempo capaci di applicarla alle cellule eucariotiche in migliaia di impieghi: fondamentale è che coloro i quali si aggiudicheranno i diritti di proprietà intellettuale, li facciano sempre valere nella ricerca pubblica.

Rimangono, per ora inconciliabili, da una parte la visione secondo cui il lavoro dei genetisti segna un progresso, dall'altra l'opinione che sia solo il più recente esempio di "hybris"^a scientifica, una colpa che ci condurrà in modo inevitabile ad una catastrofe morale, fisica ed ecologica⁷.

Ma come siamo arrivati a questo punto della ricerca, dei successi scientifici, ma anche delle polemiche? Facciamo un po' di storia.

STORIA

Seconda metà dell'ottocento. G. Mendel pubblica nel 1866 il saggio comprensivo dei suoi studi sull'ereditarietà, sintetizzati in 3 leggi generali: principio di segregazione, assortimento indipendente, principio di dominanza e puntualizza il metodo statistico con cui formulare e prevedere i risultati degli incroci. Mendel, a differenza di altri percorsi di ricerca, non ha predecessori: *"è stato il primo a concepire in maniera del tutto originale un approccio sperimentale geniale per risolvere il problema dell'eredità"*⁸; idea e applica 3 percorsi di ricerca innovativi e originali: separazione concettuale dei meccanismi ereditari da quelli dello sviluppo; metodi probabilistici e statistici per stabilire i rapporti numerici tra i componenti di una progenie; scelta dell'organismo modello più adatto per lo studio dell'eredità.

^aὕβρις: «insolenza, tracotanza», nella cultura greca antica è la personificazione della prevaricazione dell'uomo contro il volere divino; è la colpa per la quale Prometeo viene punito in eterno⁹.

Nelle opere di Mendel rintracciamo i concetti di fattori ereditari (poi chiamati geni), genotipo e fenotipo, dominante e recessivo, omozigosi ed eterozigosi, eredità mono/polifattoriale. Sono studiati e differenziati gli ibridi in costanti e variabili.

Il lavoro di Mendel non fu all'epoca apprezzato e diffuso, anzi persino osteggiato e cadde nell'oblio per circa quarant'anni.

Mendel lesse le opere di Darwin (non viceversa), senza accorgersi della complementarità di molti spunti. Darwin studiò le piccole variazioni continue e quantitative, che non manifestano le proporzioni mendeliane; aveva in mente una teoria dell'ereditarietà per mescolamento (sbagliata) e non possedeva una formazione statistico-matematica, che gli consentisse di interpretare i dati ottenuti mediante incroci con la stessa chiarezza mendeliana.

Sul finire del secolo, viene dimostrato il ruolo della meiosi come processo fondamentale nella riproduzione sessuale; nel 1876 A. Weismann propone la distinzione tra cellule somatiche e germinali e afferma che il materiale genetico che si trasmette nelle generazioni è contenuto nel nucleo; nel 1879 W. Fleming, impiegando coloranti specifici per il nucleo, individua i cromosomi.

1900-1940. Nel 1900 tre botanici, H. De Vries, C. Correns e E. Tschermak riscoprono il lavoro di Mendel caduto quasi nell'oblio; H. De Vries descrive e introduce il termine mutazione. Si intensificano gli studi sulla struttura del nucleo cellulare, i caratteri mendeliani sono associati ai cromosomi, ove vengono localizzati e allineati i geni, depositari delle manifestazioni fenotipiche; le leggi di Mendel sono integrate nella visione evuzionistica darwiniana, dando origine ai programmi di ricerca di sintesi moderna.

Sono scoperte e studiate numerose mutazioni; abbiamo i primi riscontri di patologie ereditarie connesse con anomalie genetiche: nel 1902 L. Cuenot dimostra che nei topi l'albinismo è un carattere mendeliano recessivo e A. E. Garrod dimostra la prima malattia genetica umana ereditaria, l'alcaptonuria, trasmessa anch'essa con un carattere mendeliano recessivo.

Nel 1902 W. Bateson, all'epoca il maggior esperto delle relazioni tra variabilità ed evoluzione, chiama la scienza che studia l'ereditarietà "genetica" e dà impulso alla biologia cellulare; introduce il concetto di allele. Contemporaneamente, T. H. Morgan, considerato il fondatore della genetica moderna, inizia ad analizzare i cromosomi e la dislocazione dei fattori ereditari (geni); introduce i concetti di linkage e crossing-over, fonda la citologia genetica; è tra i primi a condurre esperimenti su *Drosophila melanogaster*, ove dimostra il 1° carattere legato al sesso, il colore degli occhi, che dipende da geni presenti o assenti nei cromosomi sessuali, che codificano per proteine legate a pigmenti della retina.

Nel 1910 W. L. Johannsen definisce i termini di gene, genotipo e fenotipo e differenzia i caratteri ereditari legati a uno o più geni (eredità mono/poligenica).

Nel 1926 H. J. Muller afferma: *"il gene è la base della vita, un concetto unificante che determina la dinamica cellulare e le cui modificazioni, rigidamente riproducibili nei processi ereditari, sono la base dell'evoluzione darwiniana"*¹⁰. In precedenza aveva scoperto gli effetti mutageni delle radiazioni, mentre C. Auerbach dimostrava la mutagenesi da iprite e altre sostanze chimiche.

Negli anni '30 G. W. Beadle, E. L. Tatum e B. Ephrussi approfondiscono le funzioni dei geni nel campo della biochimica e ricordano quest'ultima con la genetica: ogni reazione biochimica è controllata da uno o più specifici geni e ogni gene contiene l'informazione per la sintesi di un enzima. A. Sturtevant inizia la mappatura dei geni sui cromosomi di *Drosophila* e T. S. Painter (1934) su quelli umani. S. Benzer, studiando i fagi, afferma che i geni sono formati da numerose sub-unità: pur senza conoscerli, preconizza i nucleotidi. Nel 1940 B. McClintock scopre i trasposoni.

Negli anni prima della guerra assistiamo ad un grande sforzo dottrinale per legare genetica ed evoluzione: protagonisti sono E. Mayr nelle scienze naturali, G. G. Simpson in paleontologia, J. B. Sanderson-Haldane e S. Wright in analisi statistica, J. Huxley che propone la "sintesi moderna"; vengono pubblicate opere fondamentali, quali *"The genetical theory of natural selection"*, di R. Fisher, 1930; *"Genetics and the origin of species"*, di T. Dobzhansky, 1937, ma soprattutto *"What is the life"*, del fisico E. Schrödinger, 1938, che

può essere considerato l'incipit delle moderne scienze bio-mediche; si affrontava l'organizzazione cellulare da un punto di vista fisico, pur riconoscendone dei limiti: una cellula vivente ha in se un ordine che risponde a leggi della natura. Schrödinger era convinto che i cromosomi contengono un codice cifrato con scritto l'intero disegno dello sviluppo dell'individuo e le basi dell'ereditarietà e che tale codice è semplice come quello binario o l'alfabeto Morse¹¹.

Anni '40: non solo guerra. F. Griffith ipotizza che negli streptococchi la trasmissione dei caratteri ereditari è insita in un'unica molecola, sconosciuta; nel 1944 O. Avery, C. McLeod e M. McCarthy individuano questa molecola nel DNA, non solo nei batteri, ma nella quasi totalità degli esseri viventi. I fisici L. Pauling e E. Schrödinger portano un grande contributo alla comprensione della struttura del DNA, utilizzando metodiche di loro competenza.

E. Chargaff dimostra i rapporti quantitativi fra le 4 basi azotate, ponendo le basi per la comprensione dell'accoppiamento adenina/timina e citosina/guanina. I tempi sono ormai maturi per identificare ed interpretare il codice molecolare della vita e le basi strutturali dell'ereditarietà.

Anni '50. R. Franklin e M. Wilkins nel 1951-52 ipotizzano la struttura elicoidale del DNA, quale appare in immagini, ormai divenute storiche, ottenute mediante diffrazione ai raggi X dalla stessa Franklin e da L. Pauling. L'anno successivo, nel numero del 25 Aprile 1953 di *Nature*, compare il lavoro epocale di J. Watson e F. Crick¹² in cui è descritto il modello a doppia elica del DNA: è la pietra miliare per le scienze bio-mediche, tale da segnare uno spartiacque definitivo fra ciò che si sapeva prima e quanto verrà compreso dopo questa dimostrazione.

Nasce la biologia molecolare, che sposta il focus degli studi da un piano prettamente chimico-fisico, strutturale, alla comprensione di "come funziona" il codice genetico; emerge *"l'esistenza di oggetti (organismi) naturali dotati di un progetto, di un programma, risultato della storia evolutiva"*¹³.

Dopo il 1951 sono clonate e immortalizzate le prime cellule, le famose "HeLa": saranno utilizzate in 11.000 brevetti per vaccini, farmaci, test diagnostici e genetici, ricerche in oncologia, virologia, etc.

Nel 1954 F. Crick dimostra che una delle due eliche del DNA può essere lo stampo per una molecola complementare, svelando così il meccanismo di auto/replicazione dell'acido nucleico. Nel 1956 F. Crick, S. Brenner, L. Barnett e R. J. Watts-Tobin scrivono: *"La specificità dei sistemi biologici è determinata esclusivamente dall'informazione contenuta negli acidi nucleici, la quale, letta attraverso un codice, passa alle proteine, ma mai viceversa. Abbiamo decifrato tale codice: la corrispondenza fra una tripletta di basi nucleotidiche (codone) e uno specifico aminoacido oppure un segno di punteggiatura nel messaggio genetico. Questo codice è universale, è lo stesso in tutti gli organismi conosciuti, il che costituisce un'ulteriore dimostrazione della validità della teoria darwiniana dell'evoluzione"*¹⁴. A fine decennio M. W. Nirenberg e coll. dimostrano la trascrizione e la traduzione dell'informazione genetica dal DNA, all'RNA alle proteine, mentre S. Luria e M. Belbruck analizzano i geni a livello sub-microscopico, mediante la cristallografia.

Anni '60. F. Jacob, J. Monod e A. Pardee (1961) studiano i meccanismi di regolazione genica¹⁵; i geni sono gli stessi in tutte le cellule di un organismo, ma varia la

loro espressione (attivazione o repressione, con diversi gradi di variabilità), il che conduce alla differenziazione morfo-funzionale delle stesse cellule in più citotipi. Sono evidenziati gli aspetti funzionali dei geni, le gerarchie funzionali, il grado di espressione nel determinismo del differenziamento cellulare e dell'acquisizione di funzioni specifiche.

S. Brenner studia ed espone i principi dell'apoptosi.

Nasce l'epigenetica, che studia *“le relazioni tra patrimonio ereditario e le variazioni prodotte dall'influenza delle condizioni ambientali, spostando l'accento dalla sequenza agli eventi cellulari che controllano, modulano e regolano l'espressione dei geni, anche in risposta a stimoli ambientali”*¹. In pratica, si occupa di tutti i cambiamenti di espressione e regolazione dei geni che non implicano modifiche della sequenza primaria del DNA, bensì della componente proteica del cromosoma. Alcune di queste modifiche possono ereditarsi per più generazioni.

Anni '70. E' un decennio di grandi innovazioni tecnologiche: tante conoscenze teoriche precedentemente acquisite vengono tradotte in applicazioni pratiche attraverso metodologie decisamente rivoluzionarie; nel 1975 G. Koehler e C. Milstein ottengono i primi anticorpi monoclonali¹⁶; F. Sanger mette a punto le tecniche per il sequenziamento del DNA¹⁷: nel 1980 avrà il suo secondo Nobel, il primo lo aveva ricevuto nel 1968 per la determinazione della sequenza dell'insulina; sono condotti esperimenti preliminari di clonazione, terapeutica o riproduttiva.

Momento topico è l'introduzione, con le prime applicazioni, della tecnologia del DNA ricombinante: permette di “creare” sequenze di DNA che non esistono in natura, assemblando frammenti anche eterogenei, persino da specie differenti (non esistono barriere specie-specifiche per il funzionamento di un gene), mediante enzimi di restrizione e polimerizzazione (W. Arber e H. O. Smith); ceppi di *E. coli* accolgono nuovi geni che codificano per proteine sintetiche: vaccini, ormoni (somatostatina, insulina, EPO), farmaci (interferone), fattori della coagulazione. S. Cohen e H. Boyer ottengono i primi organismi OGM (in *E. coli* innestano geni di stafilococchi e anfibio e la progenie è capace di duplicarsi).

Nel 1976 R. Dawkins pubblica *“Il gene egoista” (“I geni non sono agenti morali, la loro apparente volontà di affermazione è il risultato di quel gioco di probabilità che è la selezione naturale”)*¹⁸.

Anni '80. Nel 1983 K. B. Mullis mette a punto la PCR, Polymerase Chain Reaction¹⁹. Sono “creati” i primi animali (in particolare topi) transgenici: dopo 20 anni ne saranno sequenziati anche i genomi.

S. J. Gould, uno dei massimi pensatori scientifici della nostra epoca, enuncia le 3 teorie fondamentali della nuova biologia: “Evo-Devo”, “Punctuated equilibria”, “Exaptation”²⁰.

Anni '90. Il pensiero di Gould e altri scienziati innovativi, dà impulso alla “Biologia evuzionistica”, applicando i principi e le più recenti scoperte della genetica all'evoluzione umana e animale. Un esempio sono i geni omeotici, in comune fra più specie, ancestrali, ereditati durante l'evoluzione delle specie, alla base di eventi fondamentali dello sviluppo; spesso mutazioni di questi geni sono alla radice, in diverse specie animali, della comparsa di nuovi caratteri (persino organi) o di nuove specializzazioni morfo-funzionali di strutture

pre-esistenti, come il gene Pax6 nelle sue numerose varianti che è alla base della formazione di quasi tutti i tipi di occhio nei vertebrati (uomo incluso) e negli invertebrati.

A. Fire e C. C. Mello dimostrano sequenze regolatorie dei geni nel DNA non codificante.

Nasce la terapia genica: Il 1° intervento coronato da successo è del 1990, in un bambino affetto da S.C.I.D; nel 2016 una leucemia linfoide acuta sarà guarita ingegnerizzando i linfociti T. Oggi la base di ogni terapia genica consiste nell'introdurre nelle cellule bersaglio un tratto di DNA con i geni corretti al posto di quelli alterati (o assenti o comunque difettosi) mediante un vettore virale plasmidico; a seconda delle cellule interessate, parliamo di terapia genica somatica o germinale: in questo secondo caso la correzione introdotta si trasmetterà alla progenie.

Clonazione. Nell'ultima decade del '900 e ora nel nuovo millennio si hanno i primi risultati concreti di un complesso di studi che sfocia nella clonazione di esseri viventi. In realtà dobbiamo risalire al 1891 e alle pionieristiche indagini di H. Driesch sui ricci di mare (Napoli, stazione zoologica); nel 1938, H. Spemann condusse esperimenti per comprendere se il nucleo di una cellula differenziata fosse riprogrammabile al punto di ripercorrere un percorso evolutivo e differenziativo come una cellula uovo. Fra il 1940 e il 1960 furono eseguiti tentativi di transfer, veri e propri trapianti, di nuclei di cellule somatiche differenziate in cellule-uovo della stessa specie, private del nucleo; ricordiamo R. Briggs e T. J. King, che lavoravano sulla rana leopardo, J. Gurdon sul rospo africano. Lo stesso Gurdon e S. Yamanaka studiano in seguito la riprogrammazione cellulare e concepiscono le "cellule staminali indotte": si riprogrammano cellule somatiche adulte e già differenziate; queste cellule, sdifferenziatesi, possono guidare lo sviluppo di un embrione che, una volta trapiantato in utero, si sviluppa in un nuovo individuo identico (clone) genetico di colui da cui è stata prelevata la cellula somatica.

1996: I. Wilmut e K. Campbell, a Edinburgo, annunciano di aver clonato la prima pecora, Dolly, partendo da una cellula somatica di adulto, prelevata dalla ghiandola mammaria, riprogrammata e trasferita in una cellula uovo anucleata. Nel 1997 R. Yanagimachi procede alla clonazione di una topolina, Cumulina, cui seguiranno figli e nipoti per tre generazioni di cloni derivati dal primo esemplare. Negli anni successivi vengono clonati anfibi, topi e bovini partendo da cellule embrionali; nel 1999 in Italia è clonato un toro, Galileo. Ormai si clonano diverse specie di animali: per l'allevamento e la zootecnia, al fine di migliorarle elevando la qualità zootecnica, ma anche per scopi commerciali e ludici. La clonazione può sostituire le tecniche degli incroci e delle ibridazioni, impiegate per 10.000 anni dall'uomo per piante e animali: si producono cloni identici di quegli esemplari che si rivelano migliori e più adatti ad un determinato fine (OGM: Organismi Geneticamente Migliorati).

Anni 2000. Il 26 Giugno 2000 viene presentata la bozza del primo sequenziamento (quasi) completo del genoma umano; i dati furono pubblicati su Science e Nature nel febbraio 2001 (Human Genome Project); anche enti privati conducono a termine il sequenziamento del nostro genoma: tra questi, la "Celera Genomics" di C. Venter²¹. I geni umani sono circa 22.000. Al 2016, risultano sequenziali i genomi di 21.173 specie animali, viventi o estinti.

L'indagine archeo-paleontologica si avvale della ricerca del DNA antico; sono persino in corso tentativi di riportare in vita animali estinti (de-estinzione), invertendo molecolarmente il processo di estinzione.

C. Venter si dedica a produrre organismi sintetici (vita o biologia sintetica), riscrivendo, riprogettando e trapiantando in cellule viventi codici genetici sintetici. *“Oggi l'ingegneria genetica mediante operazioni di taglia, copia e ricuci riunisce sequenze di DNA differenti in modo da ottenere combinazioni di geni che non esistono in natura; le biotecnologie stanno entrando nell'era delle forbici molecolari a basso costo, rapide e precise, che permettono una vera e propria correzione delle bozze genetiche su larga scala o genome editing”*²². Venter ha ottenuto micoplasmi sintetici il cui genoma comprende circa 500 geni²³.

Sequenziamento. Per molti anni le tecniche di sequenziamento hanno consentito di ricostruire solo brevi tratti di DNA, un po' più lunghi per RNA (tecnica EST, indicatore di sequenza espressa); quando i sequenziatori automatici sono progrediti, abbiamo assistito ad un vero e proprio boom del sequenziamento dei genomi, da quello umano a centinaia di altri esseri viventi, attuali e persino estinti. In successione, nel 1965 fu ricostruito un tRNA batterico e due anni dopo rRNA di *E. coli*; nel 1976 venne sequenziato il genoma di un virus a RNA, il batteriofago MS2 e nel 1977, ad opera di Sanger, di un virus a DNA, phi X 174, batteriofago di *E. coli*, contenente 5386 basi, che vent'anni dopo sarà riprodotto sinteticamente da Venter, dimostrando altresì come forma sintetica e forma naturale siano parimenti infettanti. Tra il 1995 e il 1997 Venter sequenzia il primo batterio (*H. influenzae*), il primo micoplasma, *genitalium*, che servirà da base per la cellula sintetica ottenuta nel 2010 e il primo *Archaea*, *Methanococcus jannaschii*. La metodica impiegata è “Genome Shotgun Sequencing”, utilizzata anche nel 2000 per il genoma umano, insieme alla tecnica convenzionale di Sanger.

Va doverosamente segnalato che la distruzione di virus e altri microrganismi ormai debellati, come il vaiolo, può non essere più definitiva: se ne sequenziamo il genoma e lo immagazziniamo in un database, rendiamo il patogeno praticamente immortale.

DALLE IBRIDAZIONI ALL'EDITING GENOMICO

Per millenni, l'unico approccio al miglioramento di specie animali e vegetali sono stati gli incroci, ibridazioni “home-made”: si mescolano i geni di due o più varietà parentali e tra le nuove generazioni, casuali, si scelgono le migliori e più idonee. Con l'ingegneria genetica si agisce solo sui geni bersaglio, ottenuti dalla stessa o altre specie; finora è rimasta una prassi d'élite, con le tecniche convenzionali (nucleasi a dita di zinco, TALEN), lunghe, complesse e costose, pur se applicabili anche alle cellule umane. Con il DNA ricombinante si è fatto un passo in avanti formidabile, anche se rimane il problema della giusta posizione in cui il gene corretto o modificato va a inserirsi. L'editing genomico dovrebbe superare anche questo ostacolo. Il codice genetico, oltre che letto e interpretato, può anche essere ri-iscritto, con interventi tecnologici sull'informazione genetica e ricadute sia nella sequenza che, soprattutto, nella funzione; le tecniche di ingegneria genetica permettono di intervenire volontariamente e direttamente sia sulle cellule somatiche, che su quelle germinali e quindi sul patrimonio ereditario, sollevando enormi questioni etiche e sociali.

Per “genome editing” si intende l’insieme di tecniche che consentono di modificare i genomi direttamente attraverso un copia/incolla molecolare, senza introdurre geni esogeni, della stessa o di altre specie²⁴.

L’ULTIMA FRONTIERA DELL’EDITING GENOMICO: CRISPR-Cas9

CRISPR è l’acronimo di “Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats”. Nasce come un sistema di difesa per i batteri: può essere definita come la biblioteca o l’archivio, la memoria genetica di precedenti infezioni virali, acquisita e posseduta da un batterio, un patrimonio proprio o ereditato dalle sue ascendenze; ogni nuova infezione da parte di un batteriofago arricchisce la biblioteca, inserendo la memoria genetica anche del nuovo aggressore, predisponendo e acquisendo una difesa immunitaria contro di esso ed eventuali, successive infezioni, dunque una immunità istituzionalmente adattativa. Circa il 50% dei batteri conosciuti possiede questo macchinario di difesa; ad esso è collegato un sistema di enzimi, detti Cas (o CRISPR associati), che hanno il compito di accumulare nel genoma batterico copie di quello estraneo, perlopiù virale, sotto forma di RNA complementare e di mobilitarlo, tagliandolo e isolandolo, ogni qual volta sia necessario, in caso di nuova infezione da contrastare; se il confronto fra la sequenza conservata e quella del nuovo virus infettante risulta positivo, quest’ultima sarà distrutta. Nei batteri sono stati individuati 5 diversi sistemi CRISPR, ogni specie ne possiede uno. Il più diffuso e simile a quello riprodotto in laboratorio per l’editing genomico è tipo II.

CRISPR nei batteri funziona così. 1) Prima infezione: un batteriofago inietta il suo genoma nel batterio (DNA o RNA a seconda della specie virale, qui per brevità parliamo solo di DNA). 2) Acquisizione: sequenze di DNA virale sono riconosciute grazie a piccoli motivi adiacenti detti PAM, che il batterio non possiede e dunque percepite come estranee, tagliate e inserite nella regione CRISPR del genoma batterico. 3) Nuova infezione del virus precedente: anch’esso inietta il suo DNA nel batterio. 4) Maturazione e intervento di Cas9: dopo la nuova infezione virale, si attivano la regione CRISPR ed una adiacente: sono prodotti l’enzima Cas9 e un piccolo RNA, trasc, e una serie di RNA complementari per ciascuna sequenza di genoma virale registrata in CRISPR, sotto forma di un lungo filamento di RNA complementare. Cas9 forma un complesso con trasc e con ciascun RNA virale. 5) Riconoscimento: Cas9 riconosce esclusivamente e taglia in modo specifico un DNA estraneo quando il batterio ha una copia di questa sequenza (registrata nell’RNA complementare) nel suo sito CRISPR. Cas9 riconosce la sequenza PAM sul DNA estraneo e, mediante due RNA guida, la sequenza più lunga che lui stesso taglia a una distanza precisa da PAM. 6) Distruzione: una volta distrutto, il DNA virale non può più essere utilizzato per produrre le proteine necessarie alla replicazione del virus²⁵.

CRISPR in laboratorio, un sistema di “editare” il genoma, RNA-programmabile²⁶. Abbiamo imparato a sfruttare quest’arma naturale per allestire forbici molecolari che tagliano nelle cellule il DNA in un target specifico. Contrariamente ai metodi precedenti per modificare il genoma, i quali richiedevano enzimi specifici in ciascuna situazione, il sistema CRISPR-Cas9 utilizza sempre la stessa proteina enzimatica, Cas9, per ogni sequenza molecolare: il solo strumento specifico da costruire ad ogni impiego è un RNA che guida l’enzima Cas9 nel punto del genoma da tagliare; ma gli RNA sono più facili da preparare e maneggiare sia degli enzimi che del DNA stesso. Ecco come si

procede. A) Costruzione di un RNA guida a singolo filamento, ottenuto dalla fusione tra la sequenza di un RNA batterico (trascrRNA) e l' RNA specifico complementare alla sequenza del DNA bersaglio da tagliare. B) Accoppiamento dell' RNA guida con l'enzima Cas9 (strumento CRISPR-Cas9). C) Introduzione nella cellula dello strumento CRISPR-Cas9; l'enzima, mediante l' RNA guida, trova la sequenza del DNA bersaglio. D) Cas9 taglia i due filamenti di DNA in un sito preciso; il DNA può essere riparato per ricombinazione con un DNA omologo sintetizzato e iniettato nella cellula, o modificato (ingegnerizzato) a piacimento, togliendo, aggiungendo o cambiando nucleotidi, in modo da interferire su struttura e funzionalità di geni.

Prima dell'utilizzo di Cas9, per tagliare il DNA in punti specifici si impiegavano enzimi di restrizione o endonucleasi, che andavano preparati ogni volta "su misura", affinché agissero nel sito desiderato: dopo il taglio, la molecola poteva essere riparata, modificata o lasciata senza il frammento eliminato e in questo modo si silenziavano, attivavano o reprimevano geni. Pertanto, occorreva un lavoro lungo e difficoltoso per arrivare specificamente al bersaglio. Cas9 invece è un enzima universale, che agisce in modo specifico grazie alla guida ad RNA cui si lega: il complesso percorre il DNA, si muove come se rimbalzasse su di esso, si ferma ad ogni sequenza (ripetizioni palindromiche) complementare all' RNA e taglia il genoma in quelle corrispondenze. Gli streptococchi (i batteri in cui il sistema CRISPR è stato maggiormente studiato) utilizzano due RNA-guida in coppia; si è pensato, per semplificare il lavoro, in laboratorio, di unire le due molecole in un unico filamento-guida, che ai test preliminari si è dimostrato ugualmente efficiente. Dunque, lo strumento CRISPR funziona legando la proteina Cas9 con due RNA uniti a formare un solo filamento. I primi bersagli delle applicazioni della CRISPR-Cas9 in laboratorio sono stati geni da disattivare, silenziare o modificare, introducendovi sequenze diversificate. Inoltre è possibile effettuare in una stessa cellula più modifiche geniche, accorciando notevolmente i tempi rispetto al passato.

In definitiva CRISPR presenta le seguenti caratteristiche e peculiarità, rispetto alle tecniche di editing genetico precedenti: versatilità; facilità di preparazione e programmazione; precisione: agisce nei punti esatti prescelti del genoma ove effettuare le modifiche; efficienza: la percentuale di cellule in coltura in cui si ottengono mutazioni, che con i metodi ed enzimi precedenti non superava il 10 %, con CRISPR-Cas9 può raggiungere l' 80%; ecologica: non genera OGM "sensu stricto", perché non introduce geni dall'esterno (organismi intra o cis-genici e non transgenici); accuratezza; ampia applicabilità; economicità.

Il numero di pubblicazioni su riviste indicizzate con reports di sperimentazioni impieganti CRISPR in vari campi è passato da 282 nel 2013, a più di 600 nel 2014, 1259 nel 2015, oltre 4000 nel 2016 e circa 9.500 nel 2017.

Ma il progresso tecnico in questo campo è vertiginoso: già si parla di CRISPR di II generazione; si utilizzano altri enzimi, come Cpf11, ottenuto dal batterio *Franciscella novicida*: le caratteristiche di semplicità, economicità e velocità della CRISPR non solo sono conservate, ma persino accentuate e si prospetta un utilizzo a breve su cellule umane²⁷. E' stata anche messa a punto una variante della CRISPR-Cas9 in grado di agire e modificare l' RNA; autore dell'innovazione è F. Zhang, che ha presentato la "CRISPR-C2c2", anch'essa mutuata dai batteri, ove il sistema è impegnato nella difesa da virus a

RNA, come i retrovirus²⁸. E' in progetto di modificare sequenze di RNA codificante e non-codificante, in particolare queste ultime, che spesso agiscono sull'espressione di geni, in modo da regolare tipo e quantità di proteine codificate.

Applicazioni e prospettive⁶. Con il sistema CRISPR-Cas9 si sono già realizzate o sono in fase avanzata di studio diverse sperimentazioni; ne ricordiamo le principali, in medicina, ma non solo. Creazione di piante resistenti a parassiti e patogeni, ad esempio un frumento tenero resistente ai funghi; riproduzione in modelli animali di malattie umane, quali la malattia di Duchenne (mediante la ricognizione delle mutazioni specifiche nel gene della distrofina), la tirosinemia e altre malattie metaboliche; analisi a tappeto del genoma del topo, > 20.000 geni, inducendo mutazioni nell'ambito dell'immunità, della risposta infiammatoria e della produzione di citochine, sia per uno studio dell'immunologia di base che per eseguire raffronti con l'uomo; riduzione della colesterolemia nei topi, interferendo con la sintesi delle proteine di trasporto: questo studio sarà replicato a breve anche in clinica umana; produzione e riprogrammazione in vitro di cellule staminali (staminali indotte), provenienti da individui affetti da anemia falciforme, con catene emoglobiniche normali: è prossima la sperimentazione clinica in questa e in altre malattie genetiche del sangue, come l'emofilia; terapia genica dell' AIDS: induzione di mutazioni nei recettori CCR5 in modo che risultino inadatti all'ancoraggio del virus nelle cellule umane, bloccando quindi l'infezione. Viene riprodotta in tal modo una rara situazione che permette ai portatori di questa mutazione di resistere naturalmente all'infezione da HIV. Il passo successivo sarà quello di creare farmaci o, meglio, vaccini preventivi che inducano una situazione immunologica protettiva in tutti i soggetti trattati, simulante questa rara mutazione vantaggiosa.

Riportiamo anche la prima applicazione in vivo della CRISPR nell'uomo: linfociti prelevati da un paziente con cancro del polmone, sono stati modificati, mediante CRISPR-Cas9, in modo da disattivare il gene che codifica per la proteina PD-1, che normalmente inibisce la risposta T verso cellule tumorali. I linfociti modificati, amplificati in coltura, sono poi stati reinfusi nel paziente, con l'obiettivo di incrementare la risposta immune verso la neoplasia. Preliminarmente il test è stato eseguito soprattutto per saggiare la sicurezza della procedura; presto verrà esteso in altre patologie oncologiche per valutarne anche l'efficacia.

Sono in progettazione programmi per diagnosi e terapie personalizzate, mediante sequenziamento del genoma; si possono così individuare mutazioni geniche che predispongono o correlano con determinate malattie, ma anche rendere una cura più mirata, ad personam, prevedendo la risposta, positiva o meno, ai farmaci. Ricordiamo inoltre le modifiche indotte, mediante CRISPR, nelle zanzare per renderle incapaci di trasmettere la malaria e altre malattie parassitarie: in questo modo si possono generare insetti sterili o non più in grado di veicolare i patogeni, caratteri trasmessi alle generazioni di zanzare successive che, replicandosi in maniera esplosiva, si diffonderebbero nell'ambiente, soppiantando quelle naturali vettrici (*Anopheles population eradication or replacement*). Modifiche etologiche di questa portata non sono consentite, per ora, in molti paesi.

In conclusione, diverse sono le sperimentazioni in progetto o già avviate, in patologia umana, che prevedono l'utilizzo della CRISPR per correggere uno o più geni

simultaneamente; ricordiamo le patologie genetiche, rare o più frequenti, nelle quali si vuole intervenire: fibrosi cistica, distrofia muscolare, dislipidemie congenite, anemia falciforme, HIV (disattivazione o mimetizzazione dei recettori linfocitari), corea di Huntington, amaurosi congenita di Leber, distrofia corneale di Meesmann, tirosinemia tipo I. Interessante anche il progetto per ottenere uova ipoallergeniche da animali editati, ove coltivare vaccini specifici per bambini allergici. Ci chiediamo infine se con questo approccio hanno possibilità di cura anche le cosiddette “patologie epigenetiche”, un settore ancora da esplorare ma ricco di prospettive, che dipendono dall’espressione dei geni e dal grado di attivazione o repressione.

Il “bestiario” di CRISPR. Sequenziando il genoma di numerosi animali, ne apprendiamo le caratteristiche, similitudini e divergenze con quello umano, il che ci consente di “specializzare” diverse specie di animali per lo studio di singole funzioni o patologie, dopo averne “editato” uno o più geni: il topo per il cancro, il furetto per l’influenza, il toporagno per la fisiologia del cervello, maiali, pecore e soprattutto scimmie per le malattie neurodegenerative come il m. di Parkinson, la SLA, la corea di Huntington, l’autismo, la sindrome di Rett. L’editing genetico si propone anche in studi di fattibilità per un ritorno agli xenotrapianti, bypassando le divergenze e incompatibilità immunologiche (eliminando dal DNA di un animale antigeni e sequenze virali, creando specie “immune-friendly-Virus free” e clonandole con organi trapiantabili).

Se da una parte introduciamo tecniche sempre più raffinate e precise per manipolare i genomi, dall’altra aumentano le istanze per tutelare i diritti degli animali e ridurre l’utilizzo in laboratorio; le sperimentazioni con i primati sono sempre più rare e osteggiate. Anche in questo settore si è affermata la cultura delle 3 R: Replacement, Reduction, Refinement.

CRISPR e cellule embrionali: reports (e polemiche) sulle prime sperimentazioni. Sono stati pubblicati i primi tentativi di manipolazione genetica di embrioni umani mediante CRISPR (Huang et al, 2015)²⁹. Si trattava di embrioni giudicati inadatti per una gravidanza a termine e far nascere bambini, in quanto, pur prodotti con la procreazione assistita, erano portatori di errori genetici, un eccesso di cromosomi. Sono stati modificati i geni che controllano la sintesi delle catene emoglobiniche, al fine di correggere i difetti congeniti della stessa emoglobina che sfociano nella talassemia. Questa prima sperimentazione si è risolta in un fallimento, poiché in <5% degli embrioni trattati è stata dimostrata la correzione genica e solo in poche cellule; inoltre, la CRISPR ha provocato una serie di reazioni a catena con la comparsa nella maggioranza degli embrioni di ulteriori modificazioni geniche, né previste né desiderate, pertanto in questo caso si è rivelata meno precisa e affidabile di tecniche di editing genetico convenzionali. Lo stesso gruppo cinese che ha effettuato la sperimentazione conclude che è ancora prematuro, da un punto di vista tecnico e procedurale, l’utilizzo della CRISPR per correggere difetti genetici umani nelle cellule embrionali. Una seconda sperimentazione, ad opera di un altro gruppo cinese³⁰, su embrioni umani ha riguardato l’induzione di una mutazione nel gene che codifica per il recettore CCR5, una delle porte d’entrata di HIV nei linfociti, in modo da replicare una rara situazione naturale, individuata in alcuni soggetti, che rende le cellule umane resistenti al virus, non in grado di ancorarsi al recettore. Esito,

problemi e considerazioni di questa seconda sperimentazione sono stati sostanzialmente simili alla prima.

I lavori hanno sollevato un diluvio di polemiche, apparse in editoriali su *“Nature”* e *“Science”*, le riviste che per prime hanno divulgato la CRISPR; si discute sull’opportunità di utilizzare questa e ogni altra tecnica di editing genetico per manipolare embrioni umani, in assenza di una chiara normativa di regolazione internazionalmente approvata, da un punto di vista etico ma non solo, dato che la problematica coinvolge inevitabilmente tutta la ricerca di base e applicativa in genetica e biologia molecolare, nonché la gestione dei finanziamenti pubblici e privati. Sperimentazioni e pubblicazioni hanno passato l’esame del comitato etico cinese e della rivista *“Protein and Cell”*, ma non quello di *“Science”* e *“Nature”*, che, bloccando i lavori, chiedevano anche di non passare ad applicazioni cliniche e una moratoria di ogni ricerca in campo umano (Academy of Sciences, 2015), estendendo le une e l’altra a tutti i gruppi di studio.

Società Scientifiche e Comitati Etici internazionali chiedono di perfezionare da un punto di vista tecnologico la CRISPR, la cui potenza è tale da promuovere mutazioni in eccesso, indesiderate e oltre l’ambito progettato (almeno, in base a questi dati, in cellule staminali e/o embrionali ad elevate potenzialità differenziative); allo stesso tempo devono essere discussi tutti gli aspetti etici, vecchi e nuovi, relativi ad una eventuale sperimentazione su cellule e tessuti umani, da quelle germinali, agli embrioni, all’individuo maturo, con l’approvazione di una normativa universalmente accettata³¹. Solo allora si dovrebbe riprendere il discorso sull’applicabilità clinica; ma è probabile, anzi certo, che diversi gruppi, nel silenzio dei laboratori, continuino a lavorare e sperimentare su cellule ed embrioni umani. Il punto cruciale in definitiva è nell’eventualità di utilizzare la CRISPR o altre tecniche di editing genetico per mutare le cellule germinali ed embrionali umane, inducendo variazioni trasmissibili: il dibattito coinvolge la metodologia (è sicura? attuabile? quali sono le ricadute e gli effetti collaterali?), i risvolti economici, ma soprattutto il punto di vista etico. In un summit internazionale convocato per discutere al riguardo, si sono avute posizioni contrastanti, alcune estreme, da chi vuole bloccare tutta la ricerca a chi al contrario consentire tutto, pochi scienziati hanno assunto atteggiamenti intermedi più concilianti³².

Il dibattito verte sulle possibili applicazioni in campo umano, la correzione di difetti genetici, ma anche i rischi che si possono correre e dei quali sappiamo ben poco, manipolando embrioni così precoci, di interferire su aspetti peculiari quali quelli cognitivi e mentali; infine le possibili interferenze, volute o indesiderate, sui caratteri fisici che potrebbero preludere alla creazione di individui programmati su misura se non addirittura superuomini. Insomma, vengono inevitabilmente rispolverati temi che già l’eugenetica del secolo passato aveva suscitato. In alcuni casi la tecnica è ancora poco sicura, introduce sì le mutazioni previste ma anche altre indesiderate, talora con un effetto a catena, incontrollate e incontrollabili. E’ prioritario il miglioramento metodologico e la messa in assoluta sicurezza della procedura; superati questi steps, diverrà pressante una nuova normativa a livello internazionale, accompagnata da un serio e obiettivo dibattito etico.

BIOLOGIA E CELLULE SINTETICHE

La biologia sintetica “crea” organismi con un genoma in tutto o in parte artificiale, assemblato in laboratorio, in grado di replicarsi; base fondamentale è un codice genetico minimo, che contenga i geni assolutamente indispensabili per la vita. Nel 2010 C. Venter annuncia di aver generato in laboratorio un micoplasma, Synthia, formato da un genoma totalmente artificiale, ottenuto assemblando geni di altri micoplasmi, impiantato in una cellula naturale anucleata: è stato chiamato *M. micoides Jcv1-syn 1.0*³³.

Una versione modificata di Synthia, 3.0, prodotta nel 2016, funziona con soli 473 geni³⁴: la cosiddetta “cellula minima”; è in grado di dividersi e moltiplicarsi. A differenza delle versioni precedenti, il genoma non è stato ottenuto unendo sequenze naturali o modificate di altri micoplasmi, ma riprogettandone uno nuovo e originale, completamente sintetico, dopo un lungo lavoro di selezione informatica. Altri gruppi hanno preparato anche acidi nucleici con altri nucleotidi: nel 2014 è stato prodotto un batterio con DNA a sei basi, capace di auto replicarsi.

La biologia sintetica implica inevitabili interessi commerciali, la fruizione delle tecnologie e dei brevetti sia nell’ambito del pubblico che del privato, con ricadute economiche (investimenti, utili, guadagni) anch’esse coinvolgenti sfere del pubblico e del privato.

Secondo Venter, *“le possibilità tecniche del genoma sintetico hanno come unico limite la nostra immaginazione”*²¹. L’uomo, macchina naturale a DNA, ha inventato sistemi digitali in grado di leggere il suo e altrui DNA, così da modificarlo o creare nuove macchine sintetiche a DNA. Le questioni etiche sollevate dalla nuova biologia ripercorrono le stesse strade e interrogativi affrontati da Oppenheimer e colleghi all’inizio dell’era nucleare; oggi in più siamo di fronte ad altre situazioni, come i pericoli di un possibile terrorismo biologico e microbiologico.

Culture, arti e folklore hanno spesso delineato manifestazioni di vita sintetica: Golem della tradizione ebraica, homunculus di Paracelso, Frankenstein di M. Shelley, i Robot, i personaggi di Terminator, Blade runner, Avatar. La sinergia fra il mondo digitale, la tecnologia e la biologia potrebbe dischiudere straordinarie possibilità di creare molecole, organismi, persino specie totalmente nuove e di guidare il futuro dell’evoluzione: potremmo avere il dominio sulla natura, come auspicato già da Bacone. E’ un potere enorme, che comporta il dovere, da parte degli “addetti ai lavori”, di spiegarlo in modo che tutti possano comprenderlo, ma impone anche il suo impiego con assoluta responsabilità. Sotto l’incalzare dei mass-media, ci si chiede se la vita sintetica sia qualcosa di mostruoso, addirittura una minaccia e quali potrebbero essere le ripercussioni per l’umanità, la salute e l’ambiente.

Da un punto di vista prettamente metodologico, quando Venter ha “creato” il suo batterio sintetico, ha compreso che sbagliare una sola base su 1,1 milione di basi, può determinare la differenza tra vita e morte della cellula, successo o fallimento dell’esperimento; il percorso per riprodurre la vita sintetica è anche una scuola di precisione e accuratezza procedurali: quando ricreiamo cromosomi e geni, perché siano vitali e funzionanti, non sono praticamente ammissibili errori, se non nell’ordine di uno ogni 10.000 coppie di basi nelle forme microbiche, ancor più ristrette in quelle degli organismi superiori. In sintesi, il procedimento è: codice analogico chimico → codice digitale computerizzato → molecola DNA sintetica e assemblata → trapianto in una cellula del

genoma ottenuto → creazione di una cellula vivente sintetica a copia di una naturale. La sintesi di cellule e tessuti sintetici è eseguita anche mediante stampanti 3D Next-Generation, che costruiscono organi come ossa, cellule staminali e tessuti embrionali da assemblare, proteomi e genomi; strati di cellule sintetiche e viventi, cresciute in coltura, vengono disposti su una matrice strutturale per formare un organo, un tessuto o un vaso. Cellule batteriche, modificate o totalmente sintetiche, sono in preparazione in modo da ottenere, su scala industriale, organismi produttori di biocarburanti, anti-inquinanti, prodotti alimentari, depuratori biologici d'acqua, farmaci e vaccini, nuovi antibiotici; in quest'ultimo caso interessante appare la possibilità, già in fase avanzata di sperimentazione, di creare antibiotici coniugati con proteine formate anche da aminoacidi prodotti ex novo: i batteri, non riconoscendo le nuove molecole in quanto costituite da aminoacidi "alieni", non dovrebbero sviluppare resistenze.

VITA ARTIFICIALE O DIGITALE

E' un termine che riserviamo solo ai sistemi digitali, informatici che tentano di produrre hardware e organismi simulanti la vita biologica, carbonica; sistemi che si evolvono liberamente entro l'ambiente digitale, a richiamo dell'evoluzione per selezione naturale nell'ambiente carbonico che ha generato la vita biologica sulla terra. E' un'evoluzione digitale che "crea" complessità all'interno dell'ambiente digitale stesso, confrontabile ma non assimilabile per dimensioni e ricchezza di manifestazioni genofenotipiche alla vita organica²².

Nella sua visione meccanicistica, C. Venter considera la vita come un insieme di macchine biologiche guidate dal DNA, una sorta di software che dirige migliaia di "proteine robot". Entriamo nell'era della progettazione biologica, mediante un codice digitale computerizzato, ideando nuove forme di vita, sintetizzando chimicamente il DNA e infine avviandolo a produrre e gestire un organismo vero e proprio. All'accusa di "giocare a fare Dio, con mire creative", G. Church ribatte che *"gli scienziati oggi sono più ingegneri e tecnici che divinità; i genetisti non giocano al campionato degli dei"*³⁵. Scienza e filosofia si sono sempre interrogate sui confini tra vita naturale e biologica, vita meccanica e vita artificiale. S. Benner afferma: *"Creare la vita artificiale sfida la nostra teoria per definire la vita stessa. Se la vita altro non è che un sistema chimico autosufficiente capace di evoluzione darwiniana, e se comprendiamo come la chimica possa sostenere l'evoluzione, allora dovremmo essere in grado di sintetizzare un sistema chimico artificiale capace di evoluzione darwiniana. Se ci riusciremo, le teorie alla base del nostro successo si saranno dimostrate efficaci. Al contrario, se non riusciremo ad ottenere una forma di vita artificiale dopo un tentativo di creare un sistema chimico, dovremo concludere che alla nostra teoria della vita manca qualcosa e che la vita, naturale o artificiale, non è solo un sistema chimico autosufficiente"*³⁶.

Una vita artificiale digitalizzata, completa e autonoma, per ora, rimane nei film: Terminator, 2001 Odissea nello spazio, Matrix; vi sono molti limiti rispetto alla vita naturale, nella programmazione e nei risultati effettivi: non c'è distinzione tra genotipo e fenotipo; attualmente possiamo immaginare una sola organizzazione "molecolare", tipo DNA, mentre nelle forme naturali abbiamo anche RNA, proteine, etc; l'energia si consuma presto; evoluzione ed esito della vita artificiale dipendono totalmente dalla pianificazione

del programmatore. Il virologo N. Barricelli ha sintetizzato i limiti di questo percorso: *“Manca qualcosa se vogliamo spiegare la formazione di organi e facoltà così complesse come quelle degli organismi viventi. Non importa quanti cambiamenti apportiamo, numeri e files resteranno sempre tali e da soli non diverranno mai degli organismi viventi! Grazie al codice genetico la cellula è in grado di riprodursi: il vero automa naturale!”*³⁷.

Nel 1950, il grande matematico A. Turing pensava che la vita artificiale potesse scaturire da complesse interazioni logiche all'interno di un computer; era in accordo con le tesi dei riduzionisti: la vita non è più di un complicato insieme di reazioni chimiche, sostenuta da un sistema informatico specifico per ogni soggetto³⁸. In un futuro post-biologico c'è chi tenterà di produrre vita artificiale al di fuori della biologia, coniugando sistemi meccanici e modelli matematici. Creare la vita sarà il primo stadio: il passo decisivo consisterà nel creare organismi in grado di auto mantenersi e autoriprodursi o di evolvere autonomamente in altre forme di vita.

Risultati raggiunti, prospettive e progetti. Riguardano simulazioni di aspetti e funzioni parziali della vita, dall'espressione genica ai percorsi biochimici al funzionamento di singoli organi e apparati. In Europa va avanti il progetto “Uomo fisiologico virtuale”; dagli anni '60 in USA si studia un modello virtuale cardiaco, che riguarda il battito, la contrazione e l'apertura/chiusura dei canali del calcio: da questi dati sono scaturiti i cuori artificiali impiantati e farmaci quali i calcio-antagonisti; la produzione di sangue artificiale; inoltre sono in corso diversi progetti per la creazione di circuiti neuronali e microcircuiti cerebrali.

Ma una cellula elettronica o virtuale non sa fare una cosa essenziale: la replicazione; questa è attualmente la sfida più impegnativa sulla quale stanno lavorando diversi gruppi di ricerca.

CONCLUSIONI

Le recenti tecnologie di editing genetico e la manipolazione di cellule germinali hanno aperto scenari inediti per il futuro, primi passi che impongono riflessioni attente poiché non sappiamo dove ci porteranno e quali potrebbero essere le conseguenze. I mass-media si sono buttati a capofitto sui nuovi eventi, prospettando all'opinione pubblica un panorama di ricerca senza ritorno, una soglia simbolica ormai varcata (*“l'uomo sta ricreando se stesso?”*)³⁹; ciò che in teoria può essere fatto, prima o poi qualcuno lo farà. I genetisti vedono gli ultimi progressi tecnologici e le recenti acquisizioni come tappe logiche e inevitabili di un processo iniziato con Mendel e Darwin, un viaggio lungo 150 anni alla scoperta dell'ereditarietà: abbiamo imparato struttura e funzioni del DNA, a sequenziare l'intero genoma e, conseguentemente, a poterlo modificare.

In passato, timori, catastrofismi e speranze si sono intrecciati anche su altri temi: OGM, fecondazione assistita, terapie geniche; oggi come allora, sentiamo pressante la necessità di arrivare ad una normativa chiara e largamente condivisa, base per ogni ulteriore ricerca e applicazione, soprattutto in campo clinico.

Per C. Venter tutta la ricerca genetica attuale e futura è inevitabile, così come la vita sintetica e artificiale, persino l'ingegneria della linea germinale; *“la nostra specie non si fermerà nel cercare di migliorare tratti valutati come positivi o eliminare il rischio di malattie o rimuovere dalle future generazioni ciò che oggi è percepito come negativo. Il problema,*

*se mai, è di democrazia: chi e come avrà la possibilità di accedere all'editing? La domanda è quando, non se*²². Ecco riaffacciarsi una serie di domande e problemi: un consenso comune e generalizzato sui confini tra normalità, variabilità e disabilità; quando e chi decide se una patologia è così grave da poter giustificare il ricorso all'editing; la mutevolezza delle malattie stesse, che nel tempo passano da una status di "condizione" ad uno di "patologia" (obesità); la democratizzazione della scienza, i cui benefici dovrebbero essere fruiti da tutti, per non contribuire ad accrescere le disuguaglianze sociali. A ben vedere, CRISPR ha solo riaperto un dibattito che riemerge ogni volta che "inventiamo" una nuova tecnologia e tocchiamo temi etici e filosofici oltretutto scientifici: tutto questo non è forse la spia del nostro non saper decidere e legiferare, rimandare e polarizzarci su posizioni che, prima o poi, dovranno incontrarsi e confrontarsi, per il bene nostro ma soprattutto dei nostri figli?

Forse si sta attuando una transizione, un passaggio di specie da "*Homo sapiens*" ad "*Homo tecnologicus*"; la nostra è l'unica specie ad aver imboccato fino in fondo la strada della tecnologia, è come un'espansione dei corpi e delle menti. Già da tempo abbiamo trasformato le nostre capacità di conoscenza e apprendimento, non più basate solo sull'imitazione e le idee di chi ci ha preceduto, ma anche sulla creatività e l'innovazione delle generazioni attuali e la trasmissione delle innovazioni a quelle future. Le nuove biotecnologie ci offrono la possibilità di sognare una medicina, per il futuro, diversa, senz'altro migliore e più efficace; medici e ricercatori stanno "inventando" un modo nuovo di coniugare teoria e pratica clinica, legando e fondendo creatività, immaginazione e scienza. Importante è tuttavia non trascurare mai quella "humanitas" che rimane il principio portante della nostra professione. Non sappiamo bene come sarà il medico di domani e quanta tecnocrazia lo permeerà; questo monito di un grande storico della medicina ci sembra un giusto messaggio soprattutto per le future generazioni di medici: "*Per aiutare a nascere senza pericoli e a morire serenamente, per aiutare i sani e aver cura dei malati cronici, degli anziani, dei disabili, saranno sempre più necessari nuovi curanti, che porteranno la medicina a potenziare o recuperare, accanto alla ragion d'essere tecnologica, la vocazione antropologica che da sempre le appartiene*" (G. Cosmacini)⁴⁰.

BIBLIOGRAFIA

1. DNA. Il grande libro della vita da Mendel alla genomica. Catalogo della mostra omonima, 10 febbraio – 18 giugno 2017. Roma. Milano: Silvana Editoriale Scienze, 2017.
2. Doudna J, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014; 346: 1077-84.
3. Zhang F, Rann FA, Hsu PD, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Prot* 2013; 8: 2281–2308.
4. Church G, Regis E. *Regenesis. How synthetic biology will reinvent nature and ourselves.* New York: Basic Book, 2014.

5. Mojica FJM, Garrett RA. Discovery and seminal developments in the CRISPR field. Berlin: Springer Verlag, 2013.
6. Meldolesi A. E l'uomo creò l'uomo. Torino: Bollati Boringhieri, 2017.
7. Sandel MJ. Contro la perfezione. Milano: Vita e pensiero, 2014.
8. Pievani T. Introduzione alla filosofia della biologia. Bari: Laterza, 2005.
9. Eschilo. Prometeo incatenato. Milano: Feltrinelli, 2015.
10. Muller HJ. Studies in genetics: the selected papers of H. J. Muller. Bloomington: Indiana University Press, 1962.
11. Schrödinger E. Che cos'è la vita? Milano: Adelphi, 1995.
12. Watson J, Crick F. Molecular structure of nucleic acid. Nature 1953; 171: 737-8.
13. Watson J. The double helix. New York: Simon and Schuster, 1968.
14. Crick F, Brenner S, Barnett L, Watts-Tobin RJ. General nature of the genetic code for proteins. Nature 1961; 192: 1227-32.
15. Monod J. Il caso e la necessità. Milano: Mondadori, 2017.
16. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256: 495-7.
17. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol 1975; 94: 441-8.
18. Dawkins R. The selfish gene. Oxford: Oxford University Press, 1976.
19. Mullis KB, Smith M. Nobel Lecture. The Polymerase Chain Reaction. https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html.
20. Gould SJ. The structure of evolutionary theory. Harvard: Belknap, 2002.
21. Venter JC. Il disegno della vita. Milano: Rizzoli, 2014.
22. Venter JC. Life at the speed of light. Lezione tenuta presso il "Trinity College of Dublin", 12 Luglio 2012. edge.org/conversation/what-is-life.
23. Clyde A, Hutchison I. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. Science 2016; 351: 1414-21.
24. Offord C. Advances in genome editing. New York: The Scientist, 2016.
25. Belli F. I vaccini, oggi. Roma: Aracne, 2017.
26. O'Connell MR, Oakes BL, Doudna J, et al. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. Nature 2014; 516: 263-6.
27. Gaudelli NM, Komor AC, Liu D et al. Programmable base-editing of A-T to G-C in genomic DNA without DNA cleavage. Nature 2017; 551: 464-71.
28. Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyed OO, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. Science 2017; 358: 1019-27.
29. Liang P, Xu Y, Huang J, et al. CRISPR-Cas9/mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. Protein Cell 2015; 6: 363-72.
30. Kang X, He W, Fan Y et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. J Ass Reprod Gen 2016; 33: 581-8.
31. Rufo E. Il laboratorio della bioetica. Roma: Ediesse, 2011.
32. Botti C, Rufo F. Bioetica, discipline a confronto. Roma: Ediesse, 2002.
33. Gibson DG, Glass JI, Venter JC, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. Science 2010; 329: 52-6.

34. Hutchison CA, Chuang RY, Noskov VN, et al. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* 2016; 351: aad6253. doi: 10.1126/science.aad6253.
35. Church G. Perspective: Encourage the innovators. *Nature* 2015; 528: S7. doi:10.1038/528S7a.
36. Brenner S, Wopert L. *My life in science*. Austen: Friedberg and Lawrence, 2001.
37. Barricelli NA. Numerical testing of evolution theories. Part I: Theoretical introduction and basic tests. *Acta Biotheoretica* 1962; 16: 69-98.
38. Dyson G. *Turing's cathedral: the origins of the digital universe*. London: Allen Lane, 2012.
39. Cassata F. *Eugenetica senza tabù. Usi e abusi di un concetto*. Torino: Einaudi, 2015.
40. Cosmacini G. *Il tempo della cura. Malati, medici, medicine*. Como: NodoLibri, 2016.

Prof. Francesco Belli, Docente di Immunologia Corso di Laurea in Biotecnologie
Università "La Sapienza", Roma

Per la corrispondenza: f.belli11@virgilio.it