

Giovedì **SCIENZA**

32^a Edizione

la scienza in diretta
settimana per settimana

GIOVEDÌ 23 NOVEMBRE 2017

L'AGRICOLTURA NON SI FA SOLO NEI CAMPI

Vecchi dibattiti e nuove tecnologie genetiche

Michele Morgante

È professore ordinario di genetica all'Università di Udine e Direttore Scientifico dell'Istituto di Genomica Applicata. È stato Presidente della Società Italiana di Genetica Agraria (SIGA) ed è membro dell'Accademia Nazionale dei Lincei e di numerose altre Accademie scientifiche. Nel 2005 ha ricevuto la Medaglia per le Scienze Fisiche e Naturali dell'Accademia Nazionale delle Scienze. Nel 2011 è risultato vincitore di un prestigioso finanziamento dello European Research Council per l'analisi dei pan genomi delle piante.

PER SAPERNE DI PIÙ

Anna Meldolesi, *E l'uomo creò l'uomo. CRISPR e la rivoluzione dell'editing genomico*
Bollati Boringhieri, Torino

WEB

Considerazioni riguardo la tecnica del genome editing per il miglioramento genetico delle colture agrarie, a cura della *Società Italiana di Genetica Agraria e della Società Italiana di Biologia Vegetale*:
il documento è scaricabile dalla pagina della conferenza sul sito di GiovedìScienza.

Prima i geni- liberare il futuro dell'agricoltura, un appello ragionato e documentato: www.primaigeni.it
Un blog molto dinamico e continuamente aggiornato: www.crispr.blog/

L'EDITING GENOMICO

Ritoccare, cesellare, correggere il DNA lettera per lettera. È possibile farlo contemporaneamente in decine di siti prescelti, o in un unico punto, senza lasciare traccia. La nuova tecnica che sta cambiando il volto della biologia è gentile e potente. Maneggevole e a buon mercato come una lama affilata, precisa come un laser. Consente di modificare a piacimento gli organismi viventi prendendo attentamente la mira. Non li bombarda di mutazioni casuali, non si accontenta nemmeno di tagliare e cucire il DNA in modo artigianale, come si faceva una volta. Trasformerà la medicina, l'agricoltura, il mondo come lo conosciamo? Entusiasmo e timori si rincorrono, e questo è il primo libro capace di spiegare la rivoluzione che stiamo vivendo. Benvenuti nell'era di *CRISPR*.

Anna Meldolesi

da *E l'uomo creò l'uomo. CRISPR e la rivoluzione dell'editing genomico*
Boringhieri, Torino 2017

UN'INTELLIGENCE PER LE PROTEINE GUERRIERE. COSÌ FUNZIONA *CRISPR* IN NATURA

L'ultimo numero di *Science* apre uno scorcio inaspettato su *CRISPR*, il sistema immunitario batterico che ha ispirato l'omonima tecnica di modificazione genetica. A firmare il lavoro è il gruppo di Jennifer Doudna, la biochimica di Berkeley che nel 2012 ha gettato le basi per lo sviluppo della rivoluzionaria tecnologia, subito adottata in tutto il mondo per correggere il DNA di piante, animali e cellule umane. Il nuovo contributo del DoudnaLab per ora rappresenta soprattutto un'affascinante tappa del viaggio nella ricerca di base, ma c'è da scommettere che man mano che i ricercatori sistemeranno gli elementi del puzzle, comprendendo nei dettagli come *CRISPR* funziona in natura, la ricerca applicata escogiterà nuovi trucchi per arricchire ulteriormente la cassetta degli attrezzi delle nuove biotecnologie di precisione.

Affacciamoci, dunque, nel tumultuoso mondo microbico. La guerra fra i batteri e i virus che li infettano è una corsa evolutivistica agli armamenti, che si consuma dalla notte dei tempi a suon di mutazioni. I batteri affinano via via le proprie armi di difesa, imparando a identificare il DNA estraneo e a distruggerlo, mentre i virus aggiornano i propri mezzi per andare all'attacco. Perché la strategia militare batterica possa funzionare al meglio, le ronde armate sono precedute da un meticoloso lavoro di intelligence. Insomma, prima che entrino in azione le proteine guerriere (come la celebre Cas9, su cui si basa la piattaforma tecnologica *CRISPR*), serve un team capace di organizzare le informazioni utili a scovare il nemico. Questo complesso si chiama Cas1-Cas2, ed è il protagonista dello studio appena pubblicato su *Science*. Non è impegnato nell'azione diretta, ma scheda i virus "most wanted", ordinandone gli identikit genetici all'interno di un archivio genomico, in modo da poter ritrovare le indicazioni per fare piazza pulita al momento opportuno. Mentre le proteine guerriere si sono diversificate molto nel corso dell'evoluzione, le Cas numero 1 e 2 sono rimaste pressoché identiche in tutti i microrganismi dotati di un sistema *CRISPR*, segno che svolgono un lavoro cruciale. La Cas1 in origine doveva essere un enzima saltellante (trasposasi), capace di far rimbalzare elementi di DNA in punti casuali del genoma, ma poi ha cambiato lavoro, imparando a integrare brevi segmenti in punti specifici.

"Questa addomesticazione sembra un evento così improbabile da essersi verificato una volta sola. È stato il passaggio chiave nello sviluppo dell'immunità basata su *CRISPR*, perché consente al sistema di adattarsi alle nuove minacce, archiviando le sequenze virali", ci ha spiegato Addison Wright, ricercatore fresco di laurea del DoudnaLab e primo firmatario dello studio. Cas1 lavora in tandem con Cas2, legando il DNA che deve archiviare nel punto prestabilito del genoma batterico. Come fa? Per scoprirlo i ricercatori dell'Università di Berkeley hanno cristallizzato l'intero complesso, notando un fatto sorprendente: la proteina non legge le lettere sul DNA per trovare le sequenze giuste, ma si lega solo al DNA che può piegarsi in un certo modo. È un po' come se al posto della vista usasse il tatto, per percepire la forma. "Le sequenze ripetute riconosciute dal complesso hanno un punto cardine particolarmente flessibile che permette loro di flettersi sulla Cas2, che forma una specie di cuneo, mentre la porzione adiacente si srotola parzialmente", dice Wright. Recentemente il gruppo di Harvard diretto da George Church ha usato questo complesso per incorporare le immagini di un breve

filmato in una popolazione batterica. Ma perché il duo Cas1-Cas2 possa diventare uno strumento biotech davvero versatile è necessario capire come riconosce il suo bersaglio naturale nei batteri, imparare a prevedere quali altri siti può riconoscere negli altri tipi di cellule, e poi ingegnerizzarlo affinché riconosca altri bersagli scelti da noi. Comunque, considerato che circa la metà dei batteri e la quasi totalità degli archeobatteri sono dotati di un sistema CRISPR per difendersi dai virus, Doudna, Church e compagni hanno ancora molto lavoro da fare per censire e mettere alla prova tutte le molecole potenzialmente utili. “C’è ancora tanto da scoprire!”, si entusiasma Wright. “Penso che CRISPR continuerà per molto tempo a stupirci”.

LA MATITA AL POSTO DELLE FORBICI. CRISPR CORREGGE IL DNA SENZA TAGLIARE

Non chiamatelo *taglia-incolla*. Il sistema CRISPR si è evoluto, e per correggere le mutazioni ora non ha più bisogno di tagliare. Due lavori, pubblicati rispettivamente su *Nature* e su *Science*, annunciano l’arrivo di due nuove varianti di questa piattaforma tecnologica per l’editing genomico. Si tratta di veri e propri correttori automatici di refusi (“base editor”), che prendono il posto delle forbici molecolari della versione classica di CRISPR. La differenza principale fra le due nuove varianti presentate oggi è che una lavora sul DNA, introducendo cambiamenti duraturi nel genoma, mentre l’altra interviene sui suoi trascritti di RNA, con effetti reversibili. In comune hanno la strategia di fondo: quando identificano una lettera sbagliata ne sistemano delicatamente gli atomi cambiandone l’identità. La sequenza insomma viene corretta senza bisogno di recidere, e senza le imprecisioni che si verificano quando si attiva il macchinario naturale di riparazione cellulare. Il nuovo approccio surclassa in efficienza le procedure alternative e consente interventi ad alta fedeltà con un tasso minimo di errori. La speranza, dunque, è che in futuro questi convertitori di lettere possano essere utilizzati per riparare le mutazioni puntiformi che causano molte gravi malattie umane.

Com’è noto le lettere del DNA sono quattro: l’adenina si accoppia con la timina, mentre la guanina si appaia con la citosina. L’anno scorso David Liu del Broad Institute aveva già illustrato su *Nature* come convertire una coppia G-C in una coppia T-A. Ma per rimediare a molte mutazioni patologiche serve la transizione inversa e la novità di quest’ultimolavoro, firmato dallo stesso ricercatore, è che ora è possibile sostituire tutte e quattro le lettere, sia nei batteri che nelle cellule umane. Se immaginiamo CRISPR come un coltellino svizzero multiuso, Liu e compagni hanno prima disabilitato la funzione “cesoie”, quindi l’hanno accessorizzato con l’equivalente di una matita per correggere i refusi. La matita, fuor di metafora, corrisponde a una funzione enzimatica (deaminasi), in grado di sottrarre gruppi chimici alle lettere del DNA riuscendo a convertire un tipo nell’altro. Per far funzionare la proteina che rappresenta l’ingrediente fondamentale della nuova ricetta (TadA-dCas9), i ricercatori hanno dovuto sottoporla a sette cicli di evoluzione e ingegnerizzazione. Gli sforzi sono stati ripagati, perché alla fine il sistema ha dimostrato di poter correggere bene le mutazioni legate a due malattie genetiche (anemia falciforme ed emocromatosi).

L’altro studio, in uscita su *Science*, è stato eseguito nello stesso istituto, che è nato dalla collaborazione tra Mit e Harvard, ed è firmato da uno dei pionieri di CRISPR: Feng Zhang (al centro della foto, insieme a Jennifer Doudna, Keith Joung e David Liu). La nuova variante ha ricevuto il nome Repair (RNA Editing for Programmable A to I Replacement), un acronimo che ci ricorda come l’adenosina debba essere convertita in una base intermedia (I, ovvero inosina) per poter essere letta come una G dalla cellula. Il lavoro di conversione in questo caso viene eseguito da una proteina della stessa grande famiglia di CRISPR (Cas13), anch’essa con le forbici disattivate. Per dimostrarne il potenziale terapeutico, Zhang e compagni l’hanno usata sull’RNA per correggere in vitro le mutazioni che causano l’anemia di Fanconi e il diabete insipido legato al cromosoma X. Le prestazioni sono già buone, ma secondo i ricercatori esistono dei margini di miglioramento per un upgrade che conservi la specificità e aumenti ancora l’efficienza. La tecnologia CRISPR si ispira a un sistema naturale batterico che è una sorta di miniera inesauribile di biodiversità molecolare, perciò ci si aspetta che il cassetto degli attrezzi CRISPR si arricchirà ulteriormente di varianti ottimizzate per svolgere al meglio i diversi compiti di correzione, inserzione o delezione delle sequenze bersaglio. I “base editor” si occuperanno sempre meglio della prima attività, mentre le varianti che tagliano il DNA continueranno a svolgere sempre meglio le altre due, e chissà quali altri strumenti si aggiungeranno al kit in futuro.

UN BRINDISI AL GUSTO DI ROSA

Purtroppo non è vero quello che ha scritto il *Daily Beast*, la birra aromatizzata alla rosa grazie a CRISPR non esiste ancora. Ma probabilmente verrà prodotta nel prossimo futuro, almeno su scala sperimentale. Un gruppo dell'Università di Lovanio in Belgio, infatti, ha identificato due geni che possono essere usati nella produzione di bevande alcoliche per impreziosirne il bouquet. Si chiamano TOR1 e FAS2, e servono ad aumentare la produzione di feniletil acetato nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*. È bastato introdurli con l'aiuto di CRISPR in ceppi di lievito non particolarmente profumati, per arricchirli di questa sostanza apprezzata per le qualità organolettiche.

L'esperimento, descritto sulla rivista della Società americana di microbiologia mBio, è un assaggio di quello che l'editing potrà fare per il miglioramento genetico dei lieviti usati per la fermentazione. Ampliando la varietà dei bouquet e superando le limitazioni delle tradizionali tecniche di incrocio, che sono ancora lente, costose e imprecise. I ricercatori hanno già stretto un accordo con un birrificio per testare i loro ceppi sperimentali. Il percorso dalle provette ai bicchieri può essere breve per i nuovi ceppi di lievito. Dopo la fermentazione su scala ridotta effettuata in laboratorio (0,5-5 litri) è previsto uno stadio intermedio (100-1.000 litri), che precede la fermentazione su scala industriale (50.000-500.000 litri e oltre). "Se tutto va bene e la birra si conferma buona ogni volta, il processo può richiedere un anno", ha detto a CRISPeR Mania uno degli autori dello studio, Johan Thevelein. Per il via libera regolatorio potrebbero servire un altro paio d'anni, ma il vero problema sarà capire come un prodotto del genere può essere accolto dai consumatori che sembrano sorprendentemente ben disposti nei confronti dell'ananas rosa (almeno a giudicare dalle foto postate sui social network) ma per vent'anni hanno diffidato dei cibi Ogm. I lieviti editati non sono transgenici, perché i geni che sono stati introdotti provengono dalla stessa specie. Nel gergo scientifico questo tipo di organismi è detto cisgenico. "Per la legge europea sono OGM, anche se risultano indistinguibili dai ceppi naturali come pure dai mutanti spontanei o indotti. Questo crea un dilemma per i regolatori, che la Commissione europea non è ancora riuscita a risolvere", spiega il biologo molecolare belga. Chissà se gli amanti della birra sono più aperti all'innovazione biotech degli appassionati di vino. "Temo che l'atteggiamento sia lo stesso. Ma una differenza rilevante è che l'80% del gusto di una birra dipende dal lievito e il resto da altri ingredienti, mentre per il vino l'80% dipende dall'uva e quel che rimane dal lievito e da altri ingredienti", commenta Thevelein.

In attesa di capire come i policy-maker e il mercato accoglieranno le prime applicazioni alimentari di CRISPR, la tecnica continuerà a essere usata per studiare il genoma dei lieviti e per sfruttare queste conoscenze nello sviluppo di ceppi migliorati con tecniche considerate convenzionali. "Possiamo sviluppare ceppi non-CRISPR con la selezione assistita da marcatori, cercando la presenza di mutazioni specifiche che consentono di prevedere se è presente o meno un'accresciuta capacità di produzione per l'aroma alla rosa".

dal blog *CRISPeRMANIA* a cura di *Anna Meldolesi*

www.giovediscienza.it

