

Dossier Medicina

L'ipotesi Impedire all'Hiv di entrare nelle cellule

Chi ricorda il paziente di Berlino? Il giovane americano Timothy Ray Brown, infettato dal virus Hiv dell'Aids negli anni Novanta, proprio mentre studiava in Germania, si era poi ammalato di leucemia e così aveva ricevuto un trapianto di cellule staminali del midollo osseo da donatore. Grazie a questo trapianto è guarito anche dall'infezione da Hiv. Il motivo? Le cellule trapiantate portavano un'anomalia vantaggiosa: non fabbricavano una proteina (il recettore CCR5)

dei linfociti, che rappresenta la porta di ingresso del virus nelle cellule e dà il via all'infezione. Adesso la tecnica Crispr vuole fare proprio questo: distruggere, nel Dna dei pazienti il gene che codifica e produce questo recettore. E magari, in un futuro ipotetico, anche negli embrioni (qualora si arrivasse a utilizzare il Crispr nella linea germinale): si potrebbe "vaccinare" un bambino contro l'Aids ancora prima della nascita.

A.Bz.

Scoperto per caso mentre si studiavano gli yogurt, il sistema è in grado di riconoscere frammenti del genoma che funzionano male e sostituirli. Ma lascia sperare che possa essere utilizzato in futuro anche per combattere patologie gravi sostenute da infezioni virali

Così il metodo **Crispr-Cas9** interviene sui geni difettosi

La sigla

I primi ad accorgersene sono stati i giapponesi nel 1987: studiando un batterio, l'*Escherichia coli*, scoprono le *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats* (ecco la sigla Crispr), sequenze ripetute di genomi di virus che quando infettano il germe finiscono nel suo Dna. Queste sequenze servono ai batteri per "riconoscere" i virus e per difendersi da nuove infezioni

T

utto parte dallo yogurt. Emmanuelle Charpentier, microbiologa francese, ora al Max Planck Institute for Infection Biology di Berlino, stava studiando come rendere i batteri dello yogurt più resistenti ai virus e creare colture di questi microrganismi più efficaci nel processo produttivo. Così tre anni fa si imbatte nel sistema *Crispr-Cas9*.

Lei, però, capisce subito che questa scoperta va oltre le applicazioni nell'industria del latte e può diventare un nuovo metodo di *editing*, cioè di riscrittura del Dna, capace di correggere errori genetici e potenzialmente in grado di curare malattie. Non solo, ma an-

che di modificare certe caratteristiche dell'individuo: l'intelligenza, tanto per fare un esempio estremo.

La ricercatrice pubblica il suo studio sulla rivista *Science* nel 2012, firmandolo con Jennifer Doudna, dell'University of California a Berkeley, che, nel frattempo, perfeziona la tecnica (a questo contribuisce anche Feng Zhang, ingegnere del Massachusetts Institute of Technology di Boston).

Ora le due signore sono in odore di Nobel (hanno già vinto l'Oréal-Unesco Award for Women in Science 2016) e la tecnica è stata scelta come scoperta dell'anno 2015 dalla rivis-

ta *Science*.

Vediamo in che cosa consiste. «Tutto parte dall'idea di sostituire un gene difettoso capace di dare origine a malattie — spiega Paolo Vezzoni direttore dell'Institute of Genetic and Biomedical Research del Cnr all'Istituto Humanitas di Milano —. E questo lo si può fare da tempo con due metodiche: entrambe utilizzano un enzima, chiamato *nucleasi*, per tagliare il Dna. Il problema è riuscire a tagliarlo nel punto giusto (ed è qui che il Crispr funziona meglio delle altre due metodiche) e far arrivare, poi, il gene "normale" nella posizione corretta».

Il principale vantaggio della nuova tecnica risiede nella sua versatilità e nella sua economicità rispetto a quelle che si sono usate fino ad ora allo stesso scopo

Il Crispr è molto più maneggevole ed economico dei metodi esistenti, anche se, certamente anch'esso va ancora perfezionato, soprattutto per quanto riguarda la precisione.

«Il grande salto in avanti — commenta Giuseppe Testa, professore di Biologia molecolare all'Università di Milano e direttore del Laboratorio di Epigenetica delle Cellule staminali all'Istituto di Milano — sta però proprio nella sua semplicità e versatilità».

Per arrivare sul bersaglio il Crispr sfrutta l'*Rna* (acido ribonucleico) come "guida": l'*Rna*, complementare al frammento di Dna (gene) che si vuole eliminare, riconosce quest'ultimo. A questo punto può entrare in azione l'enzima *Cas9* che taglia, come un bisturi di precisione, il Dna "selezionato". Le possibilità, superata questa fase, sono due. La prima: tagliare il pezzo di Dna (da cui può avere origine una malattia), che andrà così distrutto. La seconda: tagliare il gene malato e sostituirlo con una sua versione sana.

È la prima soluzione che rende questo metodo particolarmente interessante e diverso dagli altri.

Ma cominciamo dalla seconda. «Una volta che un gene di malattia viene eliminato — commenta Vezzoni — devo fare arrivare nel Dna il gene sano. E questo si può fare con vettori virali, cioè virus "trasportatori"». «Oppure — continua Testa — posso aggiungere il gene sano (o soltanto alcuni frammenti) nel complesso Crispr in modo da farlo

arrivare al posto giusto». Tutto questo può essere utile, per esempio, per curare malattie monogeniche (dove è alterato un singolo gene) intervenendo sulle cellule somatiche del malato stesso.

Ma ritorniamo alla prima possibilità. E prendiamo come esempio due virus: l'Hiv (quello dell'Aids) e l'Hcv (quello dell'epatite C).

Quando questi virus infettano cellule umane, parte del loro Rna va a finire nel Dna di queste ultime. Nel primo caso in certi globuli bianchi del sistema immunitario (con indebolimento di quest'ultimo, via



L'azione
Un frammento di Dna viene riconosciuto da un altro acido nucleico, l'*Rna*, che innesca nel «posto giusto» un enzima capace di eliminarlo

via fino all'Aids), nel secondo nelle cellule del fegato (con conseguenze come epatite cronica, cirrosi o epatocarcinoma).

Che cosa fa il Crispr? Può andare a distruggere il materiale genetico dei due virus nel Dna umano: una nuova straordinaria opportunità terapeutica che prescinde dai farmaci.

Adriana Bazzi
abazzi@corriere.it

© RIPRODUZIONE RISERVATA

Piante e animali La nuova frontiera

Nelle piantagioni degli Stati Uniti è arrivata, l'anno scorso, una nuova varietà di colza (dai cui semi si ricava olio).

La pianta è stata geneticamente manipolata con la metodica Crispr, che l'ha resa resistente agli erbicidi, ma tecnicamente non sarebbe un Ogm, un organismo geneticamente modificato.

Ecco perché. Per Ogm si identifica, infatti, un organismo (animale o vegetale) in cui sia stato inserito un gene estraneo che non gli appartiene. Nel caso della colza, la Crispr ha fatto altro: si è limitata a modificare alcuni nucleotidi (lettere dell'alfabeto del Dna

della pianta), senza introdurre alcun nuovo gene.

È un esempio di *mutagenesi* (riscrittura parziale del Dna) che porrà non pochi problemi all'Europa, dove la legislazione che regola gli Ogm li interpreta come organismi portatori di un gene che, in natura, non esiste in quell'organismo.

La vecchia ingegneria genetica è ormai obsoleta, e la nuova metodica Crispr appare davvero rivoluzionaria.

Non solo perché pone nuovi problemi di regolamentazione, ma anche perché apre un ventaglio di applicazioni pratiche (nel regno animale - uomo compreso - e vegetale) che vanno ben oltre le promesse di

Finanziamenti In campo anche Bill Gates e Google Venture

L'unico limite all'applicazione della metodica Crispr è la fantasia. Lo dicono gli scienziati. E ci scommettono le company. Bill Gates e Google Venture, nell'agosto scorso, hanno finanziato con 120 milioni di dollari una start up specializzata nell'uso di Crispr (la Editas). Quest'ultima vuole provare a trattare tumori del sangue, difetti ereditari della retina che portano a cecità e anemia mediterranea (talassemia). E anche le Big pharma ci sono. Il Wall Street Journal

ha dato notizia, nel dicembre scorso, che la tedesca Bayer ha sottoscritto un accordo con la Crispr Therapeutics per trovare nuove terapie per l'emofilia (una malattia della coagulazione del sangue), le malattie cardiache dei bambini e la cecità dovuta a una degenerazione della macula (la zona centrale della retina dell'occhio). E se si arrivasse alla modifica delle cellule germinali, le correzioni si trasmetterebbero anche alla prole

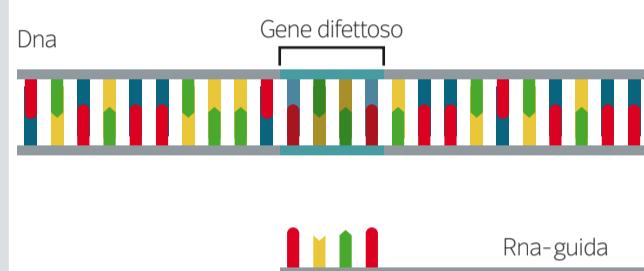
A.Bz.

Come funziona

- Il sistema Crispr-Cas9 è una specie di forbice universale, capace di tagliare il Dna delle cellule, umane e non, in punti precisi.
- L'obiettivo è quello di eliminare geni difettosi (il gene è un frammento di Dna) oppure di tagliarli e sostituirli con geni sani.
- Il Crispr è un frammento di Rna che funziona da guida: viene costruito apposta in modo che sia complementare al pezzo di Dna che si vuole andare a colpire. Agganciato al Crispr c'è un enzima, chiamato Cas9: è lui che taglia il Dna.
- La rottura del Dna provoca, in genere, mutazioni che inattivano il gene, ma, se si devono curare malattie genetiche, è anche possibile introdurre nuove sequenze

LA SEQUENZA

- 1 L'Rna-guida intercetta il gene difettoso grazie alla complementarità con il Dna



- 2 L'enzima Cas9 taglia entrambi i filamenti della doppia elica del Dna



- 3 **PRIMA POSSIBILITÀ:**
Il gene difettoso viene inattivato



- SECONDA POSSIBILITÀ:**
Il gene difettoso viene sostituito con un gene sano



Fonte: Addgene

Corriere della Sera

La discussione

Fino all'aprile dell'anno scorso Junjiu Huang, biologo alla Sun Yat-sen University di Guangzhou (la vecchia Canton, nel sud della Cina) era sconosciuto alla comunità scientifica internazionale. Poi pubblica una ricerca sulla rivista online *Protein and cell* (perché altre riviste più importanti l'avevano rifiutato) e diventa una specie di star internazionale: la rivista *Nature* lo ha inserito, come editore dell'*embrione*, fra i dieci ricercatori che hanno contato di più nel 2015.

Con il suo esperimento, il primo al mondo, ha infatti modificato negli embrioni, un gene della beta talassemia (anemia ereditaria) con la tecnica Crispr (e ha anche dimostrato la comparsa di mutazioni inaspettate nelle cellule che sollevano qualche dubbio sulla precisione del metodo).

Tutto ineccepibile dal punto di vista etico perché gli embrioni erano "tetraploidi" (cioè con un numero di cromosomi doppio del normale) e non avrebbero mai potuto svilupparsi. Ma il campanello d'allarme è suonato e gli scienziati hanno cominciato a chiedere una moratoria su una tecnica che può modificare la linea germinale (embrioni, ovuli e spermatozoi) e consentire la trasmissione alla prole di particolari caratteristiche genetiche.

Così è stato convocato, nel dicembre scorso, a Washington un *Dna summit*, organizzato dalla National Academy of Sciences degli Stati Uniti, dall'Institute of Medicine, dalla Chinese Academy of Science (non a caso) e dalla Royal Society of London, che ha visto la partecipazione di 500 scienziati, compresi esperti di etica.

Il risultato? Una sorta di moratoria (un invito, non un'imposizione, ad arrestare esperimenti come quello cinese), non priva però di alcune ambiguità. Tutti sono d'accordo nel ritenere "irresponsabile" andare avanti con manipolazioni

Ma gli scienziati invocano prudenza

che riguardano la linea germinale fino a quando non ci sarà la certezza che non comportino rischi e il consenso della società.

«Tuttavia — ha detto David Baltimore del California Institute of Technology (premio Nobel nel 1975 con Renato Dulbecco) che ha presieduto la riunione — è indispensabile rivedere nel tempo questa posizione alla luce anche degli avanzamenti scientifici. La porta rimane aperta».

Secondo Paolo Vezzoni, del Cnr all'Humanitas di Milano, questa moratoria è stata chiamata più dagli scienziati che dagli eticisti, perché temono che i cittadini (americani soprattutto, in Italia finora non c'è segno di dibattito) di fronte ai possibili sviluppi della tecnica (è l'ombra lunga dell'eugenetica), possano chiedere un blocco su gli esperimenti tout court (che invece vanno continuati per le potenzialità di cura che hanno).

«Più che di moratorie, c'è bisogno di una *road map* — precisa Giuseppe Testa, del-

In alcuni embrioni malati di talassemia il metodo Crispr ha modificato i geni malati, ma ha prodotto anche mutazioni inaspettate. Questo apre interrogativi sulla tecnica, soprattutto perché può intervenire sulle cellule germinali

l'Università di Milano, Ieo —. È quello che ha fatto l'Hinxton Group (un'associazione internazionale di studiosi di varia estrazione di cui fa parte Testa) nei mesi scorsi, indicando i problemi da affrontare e da discutere, con tutti gli attori. Perché occorre una simmetria: i temi scientifici devono andare di pari passo con la discussione politica».

Scienza ed etica a parte, poi arrivano gli interessi commerciali. «Bandire il *gene-editing* non ha senso — ha detto George Church, genetista all'Harvard Medical School a Boston su *Nature* — perché favorirebbe pratiche nascoste e aprirebbe la strada al mercato nero e a un turismo medico incontrollabile». «Mezzo mondo sta lavorando in questo campo — aggiunge Carlo Alberto Redi dell'Università di Pavia e dell'Accademia dei Lincei —. Il primo passo è renderla più precisa, ma è una vera e propria rivoluzione che sta portando brevetti e soldi».

A.Bz.

© RIPRODUZIONE RISERVATA



Per saperne di più

Lo speciale di Science (in inglese) www.sciencemag.org/site/extra/crispr/?intcmp=HP-COLLECTION-PROMO-crispr

cura di malattie nell'uomo.

Ecco alcuni esempi.

Il primo riguarda i trapianti. Una ricerca, condotta alla Harvard University di Boston, ha dimostrato che si può riaprire la strada agli xenotrapianti, cioè alla possibilità di utilizzare organi di animali (maiali innanzitutto) nell'essere umano.

Finora, il limite per un loro utilizzo è rappresentato dal fatto che questi animali possono essere infettati da retrovirus (Perv) che si installano nel Dna delle cellule.

I ricercatori hanno dimostrato che la tecnica Crispr è in grado di distruggere, nei maiali, almeno una sessantina di aree del genoma dove si sono insediati questi virus dannosi.

Ancora sui maiali. È possibile, sempre con Crispr, renderli immuni nei confronti di un virus letale che provoca una febbre emorragica e per il quale non esiste né vaccino né cura.

Il problema è particolarmente grave nell'Africa Sub-Sahariana (ma anche nell'Est Europa).

Sarebbe un grande aiuto in campo veterinario, con enormi vantaggi soprattutto per le popolazioni povere.

Altro esempio: grazie al Crispr sta cambiando l'approccio alla lotta alla malaria.

Un'idea è quella di rendere la zanzara *Anopheles* sterile, in modo che non si riproduca e non trasmetta il parassita (Plasmodio) responsabile dell'infezione.

Ci hanno lavorato i ricercatori dell'Imperial College di Londra che hanno pubblicato i

«Ogm-Non Ogm»

Una variante di colza è stata modificata senza inserire geni che prima non possedeva

risultati sulla rivista scientifica *Nature Biotechnology*, in collaborazione anche con l'Università di Perugia.

Altra possibilità è quella di renderla immune dal parassita (cioè non aggredibile dal Plasmodio, che poi veicola l'infezione). Nel novembre scorso ricercatori dell'Università di California a San Diego, con una ricerca pubblicata sulla rivista *Pnas*, hanno inserito nelle zanzare un gene di resistenza che può addirittura essere trasmesso alla prole.

Un vantaggio, ma con un dubbio: il problema della liberazione di organismi modificati nell'ambiente.

Tutti questi studi non sono da poco perché aprono la possibilità di combattere altre malattie infettive, trasmesse da vettori, come la febbre gialla o la Dengue.

A.Bz.

© RIPRODUZIONE RISERVATA