

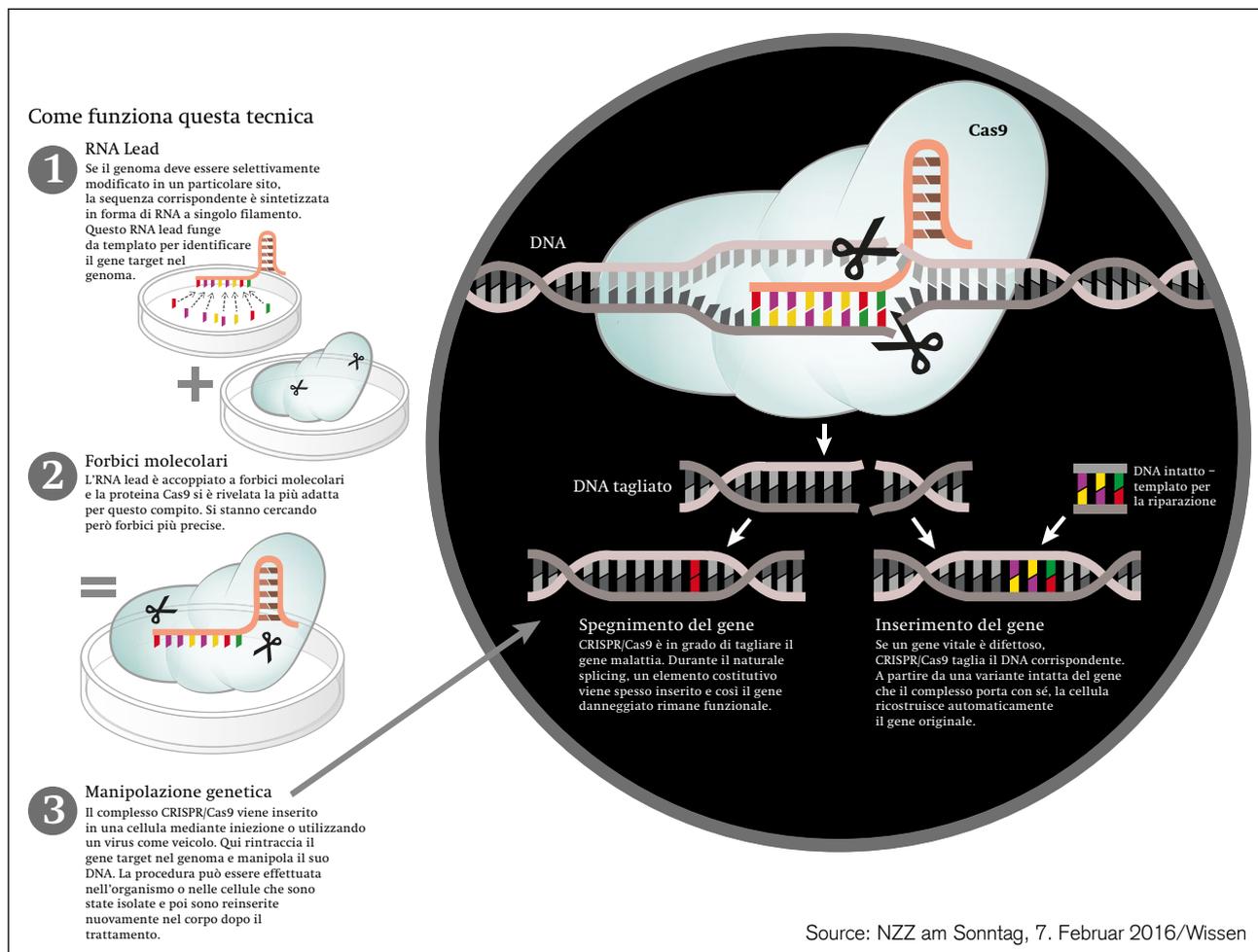
## La tecnologia genetica in una nuova dimensione

Con il sistema CRISPR/Cas, è possibile spegnere o rimpiazzare qualsiasi gene in qualsiasi organismo vivente.

Una nuova metodologia sta conquistando i laboratori di tutto il mondo. Utilizzando la tecnologia CRISPR/Cas, è possibile modificare il genoma di ogni creatura vivente più rapidamente, più economicamente e con una precisione maggiore rispetto agli altri metodi precedenti. Ricercatori e giornalisti sono molto eccitati: si parla di un «salto di qualità», della «più grande scoperta biotech del secolo» e gli sviluppatori del metodo, Jennifer Doudna, Emmanuelle Charpentier e Feng Zhang, puntano già al premio Nobel. I componenti del nuovo tool molecolare sono presenti in natura. CRISPR/Cas è stato scoperto nel genoma dei batteri quasi 30 anni fa, ma solo di recente si è capito che i batteri lo usano per

proteggersi dai virus. Il sistema immunitario dei batteri consiste di due componenti: un bisturi cellulare che può tagliare il DNA (Cas) e un corto segmento di RNA che guida il bisturi al sito che deve essere tagliato.

Ma questi strumenti non funzionano solo nei batteri. In laboratorio, il bisturi è in grado di tagliare anche isolati di DNA e le informazioni genetiche nelle cellule di piante, animali ed esseri umani. A seconda della programmazione, poi con CRISPR/Cas è possibile tagliare o distruggere un gene oppure, nel caso di una mutazione difettosa, sostituire il gene incorporando una sequenza di basi corretta. Il metodo



funziona, in linea di principio, come la funzione cerca-sostituisci di un computer. Il ricercatore decide ciò che deve essere cercato e sostituito utilizzando un RNA lead, che può essere prodotto in laboratorio, complementare ad ogni locus del genoma.

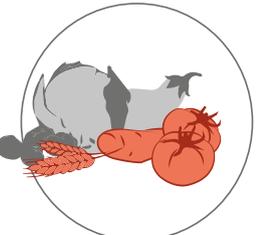
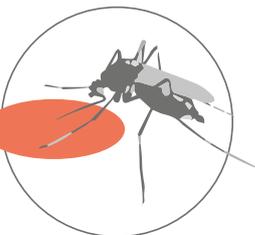
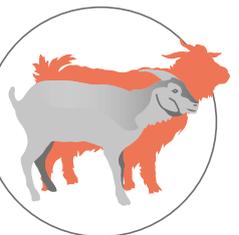
La tecnica è ancora nelle sue fasi iniziali, ma porterà a cambiamenti sia per gli esseri umani che per l'ambiente. Due anni fa, gli scienziati cinesi rimossero tutte le tre copie di un gene del grano e crearono una varietà di grano resistente alla muffa. E ricercatori giapponesi hanno già usato con successo la tecnica per poter prolungare la vita dei pomodori.

Dirk Becker della Biozentrum Klein Flottbek di Amburgo attribuisce grande importanza al sistema CRISPR/Cas: «Il grande potenziale di questo metodo sta nella capacità di spegnere completamente un gene. Con gli altri metodi utilizzati in passato, lo spegnimento, invece, non era completo». Un esempio della sua applicazione è stato visto nelle piante di patata che contengono un particolare tipo di amido. «In questo caso, CRISPR/Cas viene utilizzato per spegnere un gene della via di sintesi dell'amido», spiega Becker. Come risultato, in queste patate l'amido non consiste in amilosio e amilopectina, come normalmente avviene, ma solo di amilopectina. I produttori di carta e adesivi sono interessati a questo sviluppo perché hanno bisogno, per i loro processi di produzione, di amido senza amilosio. In Europa, la questione se le piante modificate con il sistema CRISPR/Cas debbano essere considerate piante geneticamente modificate è ancora una faccenda fortemente dibattuta. Negli Stati Uniti si è deciso che non lo sono: se il metodo viene utilizzato solo per disattivare la funzione di un gene, allora

CRISPR/Cas è semplicemente un altro metodo di coltivazione classica della pianta. Questo punto di vista è condiviso anche da Dirk Becker: «solo se si aggiunge un transgene la pianta deve sottostare alla legislazione sulla tecnologia genetica».

E' già diventato difficile immaginare la ricerca biomedica di base in colture cellulari o modelli animali senza CRISPR/Cas. «Quello che mi piace di più di CRISPR è che si può disattivare qualsiasi gene in qualsiasi linea di cellule di cancro e cercare il tallone d'Achille dei tumori», dice Eric Lander, direttore del Broad Institute di Cambridge in Massachusetts, e una delle figure di spicco del Progetto Genoma Umano. È anche possibile spegnere diversi geni contemporaneamente e quindi permettere una migliore comprensione delle malattie genetiche complesse come diabete, morbo di Alzheimer, autismo o cancro.

CRISPR/Cas non è utilizzabile solo in ricerca, ma anche per il trattamento di diverse malattie. C'è un'ampia varietà di idee per l'applicazione di questa «chirurgia genetica», un esempio è il trattamento di certe infezioni virali. Alcuni virus, come il virus dell'epatite B o l'HIV, incorporano le loro informazioni genetiche nel genoma delle cellule ospiti infettate. Possono rimanere latenti nel corpo per tutta la vita con il rischio che il virus possa «tornare in vita» e replicarsi ancora attivamente, nonostante il trattamento con i farmaci. I ricercatori della University College of Medicine a Taipei (Taiwan) hanno provato a curare l'infezione da virus dell'epatite B nei topi utilizzando CRISPR/Cas. Anche se le «forbici genetiche» hanno rimosso alcuni pezzi del DNA virale, non è stato (ancora) possibile interrompere

<p><b>Utilizzo nel mondo degli animali e delle piante</b></p>	 <p><b>Ottimizzazione del raccolto</b> Grano resistente all'oidio, pomodori che maturano più lentamente e più a lungo oppure soia più nutritiva: CRISPR/Cas9 ha già permesso la produzione di colture ottimizzate.</p>	 <p><b>Gene drive nelle zanzare</b> Zanzare in grado di trasportare il parassita della malaria possono essere geneticamente modificate in modo da avere una scarsa prole e che si estinguono gradualmente. L'utilizzo del gene drive, una speciale applicazione di CRISPR/Cas9, permette una più rapida diffusione di questo tratto nella popolazione.</p>	 <p><b>Cani personalizzati</b> I beagles sono comuni organismi modello in ricerca. Utilizzando CRISPR/Cas9, alcuni ricercatori cinesi sono stati in grado di produrre due esemplari robusti. È ipotizzabile anche lavorare con i tratti che i proprietari vogliono osservare nei loro cani.</p>	 <p><b>Capre più produttive</b> I ricercatori cinesi hanno modificato il genoma delle capre Kashmir in modo da ottenere animali più robusti e con un pelo più lungo - consentendo così un rendimento maggiore. Altri ricercatori stanno lavorando su mucche senza corni.</p>
<p>Source: NZZ am Sonntag, 7. Februar 2016/Wissen</p>				

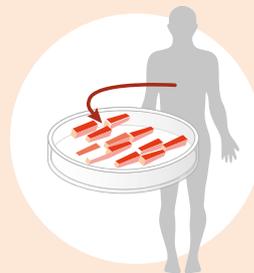
completamente l'infezione. Prima che CRISPR/Cas possa essere utilizzata a fini terapeutici non basta che sia efficace, anche una serie di altri ostacoli devono essere superati. Per esempio, come si fa a fare in modo che le «forbici genetiche» arrivino in quella parte del corpo in cui si suppone debbano lavorare? E, questa tecnica è davvero così precisa? Il genoma è davvero tagliato solo nel sito previsto o potrebbe anche essere tagliato in un sito sconosciuto a caso – con conseguenze incalcolabili? Secondo gli studi sulla precisione del sistema CRISPR/Cas, il metodo varia tra non off-target e 150 off-target nel genoma. Ma se un taglio è effettuato dove non deve essere fatto, per esempio in un sito del gene che regola la divisione cellulare, questo potrebbe innescare una proliferazione cellulare incontrollata ed in altre parole cancro.

La «chirurgia genetica» è molto più affidabile quando utilizzata al di fuori del corpo: «se si trattano le cellule in laboratorio, è possibile reinserire nel corpo solo quelle cellule in cui la riparazione o lo spegnimento di un gene sono effettivamente avvenuti», dice Gerald Schwank dell'Institute of Molecular Health Sciences presso il Federal Institute of Technology (ETH) di Zurigo. Il team di Schwank ha isolato le cellule staminali dal tessuto intestinale di pazienti con fibrosi cistica. «Con l'aiuto di CRISPR/Cas siamo riusciti a riparare il gene difettoso in queste cellule, ed il canale per il flusso di ioni cloruro precedentemente difettoso ora funziona di nuovo», spiega Schwank.

Perché questa procedura abbia dei benefici per i pazienti, le cellule riparate dovrebbero essere reinserite nel corpo del paziente e stabilizzarsi nell'intestino. Ma ancora una volta, non è noto come questo possa essere realizzato. Negli esperimenti con i topi, solo una piccola percentuale delle cellule modificate si stabilizza nell'intestino. L'organo più ricettivo per l'integrazione delle cellule riparate sembra essere il fegato; «un difetto nel ciclo dell'urea, che causa una malattia metabolica del fegato, potrebbe diventare la prima malattia ad essere curata utilizzando il complesso CRISPR/Cas», dice Gerald Schwank. La tecnica offre enormi promesse per rendere la terapia genica parte della pratica clinica di routine in un prossimo futuro.

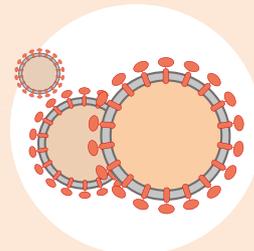
I tentativi di correggere i difetti genetici utilizzando CRISPR/Cas anche in cellule germinali o in embrioni hanno fatto molta notizia. Nei topi, questo è già successo con i geni le cui mutazioni causano cataratta e disturbi muscolari degenerativi. Nell'aprile dello scorso anno, dei ricercatori cinesi hanno scatenato un certo eccitamento quando hanno cercato di riparare il gene responsabile della talassemia, una malattia del sangue, in 86 oociti umani fecondati. I ricercatori hanno usato le cellule uovo (triploidi) derivanti dalla fecondazione in vitro e vitali. Ma la maggior parte delle cellule non riesce ad

### Il futuro nell'uomo



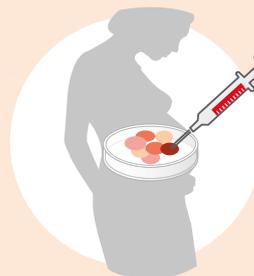
#### Ricerca nel cancro

Il cancro è uno dei più gravi flagelli dell'umanità. CRISPR/Cas9 potrebbe aiutare a migliorare la comprensione dei meccanismi di sviluppo del cancro. I ricercatori spengono determinati geni nelle cellule tumorali e ne studiano il ruolo nello sviluppo del tumore.



#### Terapia genica per HIV

Alcune persone hanno mutazioni genetiche che impediscono al virus di insediarsi nelle proprie cellule. Se questi tratti potessero essere inseriti in cellule staminali di pazienti HIV-positivi mediante CRISPR/Cas9, allora sarebbe possibile ipotizzare una cura per questi pazienti.



#### Terapia germinale

Patologie genetiche, come la malattia incurabile di Huntington, potrebbero avere insorgenza germinale. Il gene difettivo causativo della patologia, quindi, potrebbe essere riparato a livello germinale in cui si ha la formazione di oociti e spermatozoi. Questo approccio però è fortemente dibattuto.



#### Progettare un bambino

Così come è possibile eliminare i tratti dannosi dal genoma, sarebbe possibile anche inserire quelli vantaggiosi. Ma questa idea è malvista dalla scienza: nessun ricercatore serio vuole creare bambini progettati con gli occhi blu o i capelli biondi.

Source: «Nature» (Bd. 522, S. 20 und Bd. 528, S. 51); «New Scientist» (Nr. 3050, S. 32); «Cell» (Bd. 164, S. 18)

integrare stabilmente nel proprio genoma il gene intatto al posto di quello difettoso. Inoltre, il bisturi molecolare taglia il DNA in siti indesiderati più spesso del previsto. Le conseguenze di questi difetti sono incalcolabili, e il metodo è ancora troppo rischioso. «I ricercatori hanno fatto un buon lavoro perché sono stati in grado di dimostrare che CRISP/Cas non era ancora pronto per tale uso», afferma Dieter Egli, che effettua studi su cellule staminali presso la Columbia University di New York. Per Klaus Ammann, è chiaro che l'editing genetico sarà un giorno usato anche sugli esseri umani. Il professore emerito di botanica ed ecologia presso l'Università di Basilea ha redatto una monografia su più di 1000 pubblicazioni riguardanti CRISPR/Cas.

«La mia mente si fa prendere dall'euforia troppo spesso e in maniera troppo acritica» – afferma Ammann. Come con ogni sviluppo scientifico, è necessario prestare molta attenzione e pesare le evidenze.

Sarebbe ideale se potessimo comprendere i complicati meccanismi del corpo umano senza stressanti esperimenti sugli animali. Sfortunatamente oggi non è ancora possibile. Ma il dilemma rimarrà per lungo tempo: la ricerca di base senza esperimenti sugli animali vorrebbe dire abbandonare ogni progresso medico. Mice Times si pone l'obiettivo di spiegare il perché e per questo motivo racconta storie di successi medici che sono stati possibili solo grazie alla sperimentazione animale.

#### INFORMAZIONI EDITORIALI

Editori:



Basel Declaration Society, [www.basel-declaration.org](http://www.basel-declaration.org)

**Forschung für Leben**

[www.forschung-leben.ch](http://www.forschung-leben.ch) | [www.recherche-vie.ch](http://www.recherche-vie.ch)

Autore: Dr. Ulrike Gebhardt

Editorial staff: Astrid Kugler, direttore amministrativo