

LE DUE FACCE DI CRISPR-CAS: TRA RICERCA E BIOTECNOCRAZIA

Di Daniela Conti

www.complessita.it

Di questi tempi si fa un gran parlare di una nuova tecnica per modificare il DNA. Ha un nome un po' astruso: CRISPR-Cas (CRISPR è una sigla¹; si legge *crispar*) e viene presentata come la "rivoluzione" dell'"editing genomico", che consiste nella modificazione della sequenza di un gene, fino alla singola base.

CRISPR-Cas è uno strumento che permette di intervenire sul DNA con una precisione molto maggiore rispetto alle tecniche di ingegneria genetica precedenti. Una precisione "molto maggiore", ma non ancora sufficiente, a detta degli scienziati, impegnati in continui sforzi per migliorarla. E tuttavia, fin dal suo apparire questo nuovo strumento ha dato il la a un'ondata di commenti acriticamente entusiastici. Su tutti i media si sentono magnificare le sue proprietà: precisione, sicurezza, perfetto controllo e, non ultimi, velocità e bassi costi. Si dice: ecco finalmente lo strumento per modificare il DNA esattamente come noi vogliamo, con grande precisione, tempi brevi e costi ridotti. E spesso si aggiunge: "Non come succedeva con la transgenesi usata per produrre gli OGM. Qui non si inserisce in modo *impreciso* e *a caso* un segmento di DNA *estraneo*, ma si lavora con una precisa e controllata *cisgenesi*" (cioè, senza l'aggiunta di DNA estraneo). Detto per inciso, è incredibile la noncuranza con cui si ammette finalmente che la transgenesi usata per produrre gli OGM è "imprecisa e imprevedibile". Finora tutti coloro che dicevano queste stesse cose erano bollati di oscurantismo! Tornando al battage pubblicitario su CRISPR-Cas, è vero tutto quello che si afferma? E soprattutto, è vera *cisgenesi*? (Con il corollario di *sicurezza* che se ne fa discendere necessariamente.)

Che cos'è CRISPR-Cas? In breve, è un sistema utilizzato dai batteri per difendersi dall'attacco dei loro virus. Quando il DNA di un virus entra in un batterio, le difese della cellula batterica si attivano e tagliano il DNA intruso in pezzetti. Questi pezzetti non vengono eliminati, ma sono inseriti nel DNA del batterio dentro la sequenza CRISPR, dove formano una specie di "memoria" pronta per l'uso la prossima volta che il DNA di un virus uguale, o simile, invaderà il batterio. Senza entrare in troppi particolari, ogni pezzetto del primo

invasore virale conservato nella “memoria” CRISPR del batterio ha la capacità di riconoscere un segmento uguale a se stesso nel DNA di un nuovo virus invasore. Il pezzetto conservato in CRISPR produce allora una “guida” che trasporta sul DNA invasore la proteina batterica Cas, un enzima che taglia il DNA virale a livello di una sequenza corrispondente alla “guida”. Il sistema CRISPR-Cas non funziona solo per i batteri e i loro virus, ma è capace di tagliare qualsiasi DNA che contenga sequenze simili alla “guida”. E’ proprio la capacità d’individuare una data sequenza in un DNA e di tagliarla che fa del sistema CRISPR-Cas uno strumento rivoluzionario.

Ed è uno strumento davvero prezioso, quando lo si utilizza nell’ambiente isolato di un laboratorio e rispettando tutte le dovute norme di sicurezza. Le cose cambiano se dal modificare un organismo a scopo di ricerca si passa alle applicazioni mediche o commerciali, destinate a uscire dal chiuso dei laboratori. Vediamo meglio. Partiamo dalla questione ‘precisione’. Fin dalla sua scoperta, avvenuta nel 2012, decine di lavori hanno messo in evidenza che il sistema CRISPR-Cas non si limita ad agire sul gene-bersaglio voluto dal ricercatore, ma taglia anche in molti altri punti del DNA, chiamati off-target cioè fuori bersaglio. Per questa ragione si sta cercando da 5 anni di modificare la proteina Cas9 o di usare altri tipi di Cas, nel tentativo di limitare nel DNA i tagli off-target. A giugno di quest’anno è uscito sul portale della rivista *Le scienze* l’articolo “Mutazioni indesiderate indotte da CRISPR”², in cui si riportano i risultati del lavoro di tre importanti università americane e pubblicato sulla prestigiosa rivista *Nature Methods*³. Questi ricercatori hanno confermato che il sistema CRISPR-Cas non agisce solo sul gene-bersaglio, e anzi hanno trovato che il sistema agisce in migliaia di altri punti off-target, punti che nemmeno i più sofisticati degli attuali programmi per computer sono in grado di prevedere. Quest’articolo ha scatenato un’ondata di critiche e polemiche – come sempre, quando appaiono risultati negativi per le “magnifiche sorti” immediate di qualche applicazione o prodotto di punta. E come sempre si è detto che stimati ed esperti ricercatori hanno tuttavia “sbagliato la ricerca” (ad altri è andata peggio: sono stati accusati di avere fatto “junk science” - scienza spazzatura - o di avere falsificato i dati). Oggi sono molte le équipes di ricerca impegnate a usare CRISPR-Cas per trovare la terapia genica di malattie (in teoria, sostituire un gene difettoso con uno normale), un obiettivo

che esercita sempre un notevole 'appeal' sul pubblico. Ma, per realizzare questi obiettivi, occorre un livello di precisione e sicurezza ancora ben lontano dall'essere raggiunto.

Promesse di future terapie geniche a parte, in quali campi le nuove tecniche di modificazione genetica trovano oggi le loro principali applicazioni? Di recente ha assunto un ruolo sempre più importante la cosiddetta "biologia sintetica", e all'orizzonte si profila l'uso di "gene drive" per il controllo – o meglio l'eliminazione – di intere popolazioni, l'applicazione in assoluto più controversa.

La biologia sintetica consiste nella modificazione di lieviti e batteri (microbi unicellulari) in modo da far loro produrre un composto del tutto estraneo, ma di alto valore commerciale. Per esempio, il lievito da panificazione è stato modificato per produrre due dei numerosi composti che causano il sapore dolce della stevia. Per ottenere questi composti è stata inserita nel DNA del lievito un'intera via metabolica che porta a quei prodotti finali. Per comporre questa via, sono stati "montati" nel DNA del lievito geni che provengono da tante specie diverse, tra cui un batterio oceanico, il mais, la stevia e altre piante ancora, come afferma la richiesta di brevetto per questo lievito ingegnerizzato⁴. Nel brevetto si dice chiaramente che il lievito è stato modificato inserendo un costrutto *transgenico*, eppure negli USA questi zuccheri sono considerati "non OGM" e commercializzati con la dicitura "prodotto naturale", perché risultano da un "naturale processo" di fermentazione. Poco importa che il lievito che opera quella fermentazione sia assolutamente "innaturale" o, per usare le parole del brevetto, qualcosa che "non esiste in natura". Oltre ad avere importanti risvolti commerciali (i "prodotti naturali" vendono bene), questa scelta delle autorità americane sottrae i prodotti della biologia sintetica alla regolamentazione, peraltro poco restrittiva, a cui negli USA sono soggetti gli OGM. I prodotti della biologia sintetica sono soprattutto integratori, ingredienti per cibi e bevande, oli usati nell'industria alimentare e cosmetica, farmaci e biocombustibili. E così, senza alcuna cautela, si procede a un'immissione massiccia nella catena alimentare e nell'ambiente di composti su cui si hanno ben poche certezze, tranne che portano grandi profitti alle industrie coinvolte.

Un'altra possibile applicazione di CRISPR-Cas sta facendo molto discutere il mondo scientifico e ne sta mettendo in luce, ancora una volta, le profonde divisioni. Si tratta del "gene drive", un tipo di costrutto che immesso in una popolazione naturale può modificare i meccanismi della trasmissione ereditaria dei geni. Inserendo con un costrutto "gene drive" geni nocivi o addirittura letali in organismi che si riproducono per via sessuale, ad ogni nuova generazione quei geni sarebbero trasmessi a più del normale 50% dei figli. Così nel giro di alcune generazioni l'intera popolazione bersaglio potrebbe scomparire. Oggi si propone di ricorrere a questo metodo per le popolazioni degli insetti vettori di malattie, come le zanzare che trasmettono il virus della dengue e il virus zika o il parassita della malaria, oppure per eliminare le piante infestanti come è negli USA l'amaranto, o ancora per "conservare la biodiversità", eliminando specie aliene anche di mammiferi. Queste soluzioni drastiche spesso non sarebbero però risolutive. Per esempio, parassiti e virus non sparirebbero, ma potrebbero benissimo adattarsi a nuovi vettori. E tuttavia la reale possibilità del ricorso ai "gene drive" ha indotto l'Accademia Nazionale delle Scienze americana ad affrontare il problema in un documento⁵ che esamina tutti gli aspetti della questione, anche quelli più controversi. Tra questi ultimi vi sono le preoccupazioni sollevate da tutti gli ecologi del mondo, circa l'assoluta imprevedibilità di quello che può accadere alterando gli equilibri fra le diverse specie di un ecosistema. In natura non esistono "vuoti"; se, ad esempio, in una località geografica si elimina una certa specie di zanzare, quel vuoto sarà senz'altro riempito da una o più altre specie, con effetti a cascata del tutto imprevedibili sulle catene alimentari, sui rapporti preda-predatore, ecc.. Ciò che si può prevedere per certo è il generale squilibrio dell'intero ecosistema nel giro di breve tempo. Inoltre, poiché una volta immessi in natura i "gene drive" non possono essere 'richiamati', che accadrebbe se il "costrutto" si diffondesse al di là della zona geografica iniziale, o a una specie diversa dalla specie bersaglio (altra cosa probabile, e prevedibile)? Prendiamo, ad esempio, il caso dell'amaranto: negli USA è la principale infestante dei campi di mais del sud, ma nel confinante Messico, e in tutta l'America Latina, è una coltura agricola importante. Il caso dell'amaranto è interessante anche per un altro motivo: chiarisce bene quanto sia rischioso dare il via libera a una tecnologia distruttiva che oltretutto è nelle mani di pochi. Perché, infatti, l'amaranto è considerato negli USA una dannosa infestante? Perché ha sviluppato

una naturale resistenza al glifosato, l'erbicida più usato al mondo e dichiarato probabile cancerogeno dallo IARC, l'organismo dell'OMS preposto alla classificazione delle sostanze che provocano tumori. Ma anziché pensare a eliminare il glifosato, si pensa - oltre a fare guerra allo IARC - di eliminare l'amaranto tramite un pericoloso "gene drive". Ozioso chiedersi a chi andrebbero i profitti di tutta l'operazione, e chi invece ne dovrebbe sopportare i danni. Ultimo, ma non certo per importanza, è l'aspetto di conservazione della biodiversità. Immettere in natura geni letali che non potremo controllare è contro ogni logica di vera conservazione della biodiversità. E, a quanto affermano grandi scienziati come Jane Goodall e Fritjof Capra, vorrebbe dire violare una soglia che come abitanti di questo pianeta non ci è lecito superare, primo per ragioni etiche poi, più banalmente, per semplice autoconservazione.

Il Dipartimento dell'Agricoltura americano ha dichiarato "non OGM" gli organismi che si ottengono con CRISPR-Cas, sottraendoli così a ogni specifica regolamentazione, assumendo che siano ottenuti mediante tecniche di cisgenesi date a priori per sicure. Diventa allora fondamentale capire innanzitutto se il metodo CRISPR-Cas è vera cisgenesi, e perciò sicuro a priori, come vogliono i suoi sostenitori. In realtà siamo lontanissimi dalla cisgenesi. Come si è detto, il sistema CRISPR-Cas è presente in natura nei batteri, quindi per inserirlo e farlo funzionare dentro un altro tipo di cellula, ad esempio di mammifero, occorre "montare" il sistema su complicati vettori, che hanno il compito di "invadere" la cellula ospite e inserire nel suo DNA il loro "cargo", composto dal sistema CRISPR-Cas, più gli altri elementi genetici necessari a farlo funzionare nella nuova cellula, più i nuovi geni da sostituire. Questi vettori sono perciò veri mosaici di elementi genetici della più varia origine. La capacità di penetrare nelle cellule ospiti deriva dal fatto che i vettori sono virus modificati. Poiché in genere si tratta di lentivirus, come l'HIV, il loro utilizzo in laboratorio richiede speciali precauzioni e misure di sicurezza (molto istruttiva è la lettura delle linee guida per la sicurezza di chi lavora con questi vettori messe a punto dai NIH, i National Institutes of Health americani⁶). Per ovviare ai possibili rischi di una ricombinazione che porterebbe alla ricostituzione di virus infettivi per l'uomo (rischi che, come i NIH ricordano, non arrivano mai a essere zero), il cargo viene distribuito su 2-4 vettori, che poi sono inseriti nelle cellule bersaglio. Fin qui

l'intervento umano, da qui in avanti inizia l'interazione vettori-cellula, in cui i margini di imprevedibilità sono molto alti. Ci saranno mutazioni indesiderate? Da quanto ne sappiamo finora, sì. Quali effetti avranno quelle mutazioni sull'organismo ospite? E chi può dirlo, se non siamo in grado di prevedere quali mutazioni si verificheranno? E soprattutto, chi può dirlo, se non c'è una legislazione che impone di condurre apposite indagini per rilevare tali effetti?

Questi vettori, e il cargo che trasportano, tutto sono tranne che elementi di "cisgenesi": il sistema CRISPR-Cas, abbiamo visto, è di origine batterica; il vettore è di origine virale; per agire, il cargo deve contenere sequenze (promotori) che possono derivare dai genomi più diversi, dall'umano al virale; per la selezione occorrono marcatori come il gene per una proteina fluorescente di medusa, o geni batterici per la resistenza ad antibiotici, ecc... Perciò siamo molto lontani da una vera cisgenesi. Piuttosto è più corretto parlare di modificazione di un DNA mediata da una transgenesi.

Vent'anni fa si decise, adottando il principio tutto arbitrario e politico, per niente scientifico, della "sostanziale equivalenza", che gli OGM erano "equivalenti" agli organismi naturali da cui erano derivati. Ciò liberò le aziende dall'obbligo di dimostrare l'innocuità degli OGM sul lungo periodo e la non nocività della loro assunzione cronica attraverso gli alimenti. Allo stesso modo oggi, con la supposta "cisgenesi" del sistema CRISPR-Cas, si sottraggono le aziende all'obbligo di indagare a fondo sui possibili rischi ed effetti nocivi dei loro prodotti, prima e dopo l'immissione sul mercato. L'Europa si è presa altri due anni di tempo per decidere se seguire gli USA sulla strada della non regolamentazione, e sta resistendo - per ora grazie soprattutto alla Ministra tedesca dell'ambiente - alle forti pressioni per dare via libera a questi nuovi organismi pretesi "non OGM", senza troppe "pastoie burocratiche" all'innovazione produttiva. Anche in America i movimenti di consumatori e di produttori biologici si oppongono a questa *deregulation*, e sarà importante tenere alta l'attenzione perché l'Europa resti ferma nella sua posizione. Nonostante le pesanti lezioni che si dovrebbero trarre dagli OGM già in uso, ci si continua a muovere sul terreno delicatissimo della modifica dei viventi sotto la spinta del "profitto first", ignorando i richiami alla cautela che pure vengono da molti ambienti scientifici, non ultima dalla stessa scopritrice del sistema CRISPR-Cas, Jennifer Doudna.

Nella sua avanzata, insofferente a regole e limiti, verso la generale ingegnerizzazione dei viventi, la biotecnocrazia oggi imperante, motore di un'industria miliardaria, trascura accuratamente di tenere conto di quanto emerge sempre più chiaro dalle ricerche scientifiche: che il DNA è eterodiretto, cioè è regolato dalle influenze ambientali (tutte, dagli inquinanti alle emozioni); che la vita di ogni singolo organismo dipende dall'equilibrio tra le complesse interazioni entro l'intera rete dei suoi geni; che nessun sistema genetico è mai perfettamente isolato. "Tutto scorre" nel mondo vivente, e proprio grazie a queste reti di interscambi gli esseri mantengono e amplificano la capacità di adattarsi e di evolvere, cioè coevolvono. Ma nelle loro ricostruzioni da "meccano" dei "circuiti metabolici", gli ingegneri genetici ignorano tutto ciò che sta intorno al DNA, la fondamentale dimensione tempo e il continuo mutare degli organismi nel corso delle reciproche interazioni. Credono ancora! nell'onnipotenza della doppia elica e nella fissità, tutta prevedibile, della "macchina" modificata. Cioè gli ingegneri biotecnocrati vivono nell'illusione del controllo e cercano di alimentarla in un pubblico desideroso di certezze. Ma l'unica certezza scientifica che abbiamo è che la vita è un flusso continuo di cambiamento, che non potremo MAI controllare né prevedere. A meno di distruggerla.

¹ CRISPR sta per Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeatsm cioè brevi ripetizioni palindrome raggruppate e disperse a intervalli regolari; Cas sta per CRISPR associated protein, cioè proteina associata a CRISPR.

² [lescienze.it/news/2017/05/31/news/crispr_cambiamenti_geni_non_voluti-3547264/?ref=nl-Le-Scienze_02-06-2017](https://www.lescienze.it/news/2017/05/31/news/crispr_cambiamenti_geni_non_voluti-3547264/?ref=nl-Le-Scienze_02-06-2017)

³ https://www.nature.com/articles/nmeth.4293.epdf?referrer_access_token=Cfxhc0a2COjNa8Xpnic2pNRgN0AjWeI9jnR3ZoTvOP0DzLRgl6eMC7Z4GfptD5jAg8gQ6kVnLujh1CUSk4TZpwXwM1LPY9AsYtM45YVxBQGb-K30beKzuJQyJz9gCXFyCBOcaT3XCIBXRRhue-fTnZZAa3vZ898Xmwz1Hle4ZGJi4sNJo_zVL3R-YUK1L4izFgc753DsCOQIaq3K_yP2yf3N34ONHMtaFcBFLPDvhwaAeXIUw0VM8A_DLHvR5VYIOoWxgMAoZ9PKAwefDzAE0-jMWMLsSbWIX9CUzyp80%3D&tracking_referrer=www.lescienze.it

⁴ **4 Fermentation methods for producing steviol glycosides with multi-phase feeding**
www.google.com/patents/WO2016196368A1?cl=en

⁵ National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2016. *Gene Drives on the Horizon: Advancing Science, Navigating Uncertainty, and Aligning Research with Public Values*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://www.nap.edu/read/23405/chapter/3>

⁶ "Guidance on Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors" <http://osp.od.nih.gov/office-biotechnology-activities/biosafety-guidance-institutional-biosafety-committees/guidance-biosafety-considerations-research-lentiviral-vectors-0>
http://osp.od.nih.gov/sites/default/files/resources/Lenti_Containment_Guidance.pdf