

Le due facce di Crispr-Cas: tra ricerca e biotecnocrazia

di Daniela Conti

Di questi tempi si fa un gran parlare di un nuovo strumento per modificare il DNA. Ha un nome un po' astruso: CRISPR-Cas (CRISPR è una sigla¹; si legge *crispar*) e viene presentato come la "rivoluzione" dell'"editing genetico", cioè la modificazione della sequenza di un gene, fino alla singola base. Ovunque se ne sentono magnificare le grandi proprietà: precisione, sicurezza, perfetto controllo e, non ultimi, velocità e bassi costi. Si dice: ecco finalmente lo strumento che ci permette di modificare il DNA esattamente come noi vogliamo, con grande precisione, tempi brevi e costi ridotti. E spesso aggiungono: "Non come succedeva con la transgenesi usata per produrre gli OGM - (o organismi transgenici, appunto) - 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 aggiungere 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", dopo avere per anni bollato di oscurantismo tutti coloro che dicevano quelle stesse cose. Vedremo fra poco se tutto quello che oggi si afferma nel battage pubblicitario di CRISPR-Cas corrisponde al vero. Per ora torniamo al messaggio trasmesso al pubblico dei "non addetti": questo nuovo strumento è proprio quello che ci vuole per migliorare la natura o per rimediare con precisione e sicurezza ai suoi errori. Come vedremo, la (solo supposta) cisgenesi - e la sicurezza che se ne fa discendere necessariamente - è uno dei punti centrali della discussione, e non uno dei meno importanti.

Allora, 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, un pezzetto del primo DNA virale, ora conservato nella "memoria" CRISPR del batterio, ha la capacità di riconoscere un segmento uguale a se stesso nel DNA di un nuovo virus invasore. Questo pezzetto diventa una "guida", che trasporta sulla sequenza del DNA invasore la proteina Cas, un enzima del batterio capace di tagliare il DNA virale. In questo modo il DNA del secondo virus viene riconosciuto e tagliato dal sistema CRISPR-Cas. Si è trovato che l'azione di questo sistema non si limita ai batteri e ai loro virus, ma è capace di tagliare qualsiasi DNA che abbia brevi sequenze uguali alla "guida". La precisione nell'individuare una data sequenza in un DNA e nel tagliarla è ciò che rende il sistema CRISPR-Cas lo strumento di una nuova rivoluzione tecnologica. C'è chi lo esalta al punto di sostenere, come afferma l'enfatico titolo di un libro uscito di recente, che darebbe il potere all'uomo di "creare l'uomo"². In realtà CRISPR-Cas è oggi uno strumento prezioso quando si vuole mettere "knock out" un certo gene, per poi vedere

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 Anna Meldolesi, "E l'uomo creò l'uomo. CRISPR e la rivoluzione dell'editing genomico", Ed. Bollati-Boringhieri, 2017.

quali effetti ne derivano e capire così la funzione normale del gene messo fuori uso. Vale a dire, è uno strumento prezioso quando lo si utilizza nell'ambiente isolato di un laboratorio e rispettando tutte le dovute norme di sicurezza, come afferma anche la sua scopritrice Jennifer Doudna.

Il panorama cambia se l'intento con cui si usa il sistema CRISPR-Cas è quello di modificare un organismo con l'editing genetico, ovvero quando si passa dalla ricerca alle applicazioni mediche o produttive. Molte équipes di ricerca oggi infatti sono 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. Vediamo meglio.

Partiamo dalla questione 'precisione'. E' appena uscito sul portale della rivista *Le scienze* l'articolo "Mutazioni indesiderate indotte da CRISPR"³, in cui si riportano i risultati del lavoro di tre importanti università americane e pubblicato sulla prestigiosa rivista *Nature Methods*⁴. Questi ricercatori hanno confermato un dato già ben noto, e cioè che il sistema CRISPR-Cas non si limita ad agire sul gene-bersaglio voluto dal ricercatore, ma agisce anche in migliaia di altri punti del DNA, chiamati off-target cioè fuori bersaglio, punti che nemmeno i più sofisticati degli attuali programmi per computer riescono a prevedere. Migliaia di mutazioni indesiderate sono un esito decisamente sfavorevole, soprattutto quando l'intento è la terapia genica. La ricerca per una reale precisione del sistema CRISPR-Cas è oggi molto attiva, ma finora siamo molto lontani dallo sbandierato potere di modificare il DNA a nostro piacimento e con esiti assolutamente certi e prevedibili.

Promesse di future terapie geniche a parte, quali sono le principali applicazioni delle modificazioni genetiche oggi sulla scena? Nel presente, sta assumendo 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 (microrganismi unicellulari) in modo da far loro produrre un composto del tutto estraneo, ritenuto di alto valore commerciale. Questi microrganismi sono fatti crescere in grandi recipienti per le fermentazioni industriali; infine, attraverso lunghe e complicate procedure, dal brodo di coltura si filtrano i composti desiderati, oggi prodotti di punta per le industrie che vendono alimenti e bevande, farmaci, cosmetici, biocarburanti e molto altro ancora. Per esempio, il lievito da panificazione (*Saccharomyces cerevisiae*) è stato modificato per produrre due dei numerosi composti che danno alla stevia il suo tipico sapore dolce. Per ottenere questi composti, si introduce nel DNA del lievito un'intera, assolutamente nuova, via enzimatica che porta a quei prodotti finali. La decina e passa di reazioni chimiche che formano questa via sono catalizzate da enzimi che provengono tutti da

³ [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)

⁴ https://www.nature.com/articles/nmeth.4293.epdf?referrer_access_token=Cfxhc0a2COjNa8Xpnic2pNRgN0jAjWeI9jnR3ZoTv0P0DzLRgl6eMC7Z4GfptD5jAg8gQ6kVnLujh1CUSk4TZpwXwM1LPY9AsYtM45YVxBQGb-K30beKzuJQyJz9gCXFyCBOcaT3XCIBXRRhue-_fTnZZAa3vZ898Xmwz1Hle4ZGJi4sNJo_zVL3R-YUk1L4izFgc753DsCOQIaq3K_yP2yf3N34ONHMtaFcBFLPDvhwAeXIUw0VM8A_DLHvR5VYIOoWxgMAoZ9PKAwefDzAE0-jMWMLsSbWIX9CUzyp80%3D&tracking_referrer=www.lescienze.it

specie diverse, tra cui un batterio oceanico, il mais, la stevia e altre piante ancora, come chiarisce il testo della richiesta di brevetto per i due zuccheri della stevia da lievito ingegnerizzato⁵. Nel testo del brevetto si dice chiaramente che il lievito è stato modificato inserendo un costrutto *transgenico*, eppure negli USA questi zuccheri sono commercializzati con la dicitura “prodotto naturale”, perché risultano da un “naturale processo” di fermentazione. Poco importa che il lievito che effettua la fermentazione sia assolutamente “innaturale” o, per usare le stesse 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 comunque soggetti gli OGM. Poche le notizie su questi microrganismi “non naturali” reperibili nel web: si trovano solo lavori che riguardano i loro prodotti: la struttura chimica, la produttività e le proprietà dolcificanti; nessuno studio sul metabolismo generale di questi nuovi organismi né sui possibili effetti dei loro prodotti su chi li mangia o li usa, né sull’ambiente nel caso malaugurato di “fuga” di questi microrganismi transgenici dai sistemi di sicurezza previsti dai protocolli industriali.

Un’altra possibile applicazione di CRISPR-Cas sta facendo molto discutere il mondo scientifico e sta mettendone 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”, ad esempio in isole invase da topi venuti da fuori sopprimerne le popolazioni, perché mettono a repentaglio la biodiversità autoctona. In tutti questi casi, si tratterebbe di una soluzione drastica, ma non risolutiva. Per esempio, non farebbe scomparire parassiti e virus, i quali 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 documento⁶ 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

⁵ **Fermentation methods for producing steviol glycosides with multi-phase feeding**
www.google.com/patents/WO2016196368A1?cl=en

⁶ 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>

drive” non possono essere ‘richiamati’, che accadrebbe se il costrutto si diffondesse al di là della zona geografica iniziale (altra cosa prevedibile e molto probabile)? Prendiamo, ad esempio, il caso dell’amaranto: negli USA è diventato 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 liberare una tecnologia potenzialmente distruttiva e però 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 dall’organismo dell’OMS preposto allo studio dei tumori. Anziché pensare a eliminare il glifosato, si pensa di costruire un gene drive per eliminare l’amaranto. 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, si viola una soglia che come abitanti di questo pianeta non ci è lecito superare, primo per ragioni etiche poi, più banalmente, per semplice autoconservazione.

Come abbiamo visto, tutti i nuovi prodotti della modificazione genetica negli USA possono essere definiti “prodotti naturali” e sono immessi sul mercato senza una particolare regolamentazione. Tenendo fede a questa impostazione, il Dipartimento dell’Agricoltura americano ha dichiarato “non OGM” gli organismi che si ottengono con CRISPR-Cas e li ha così sottratti a ogni specifica regolamentazione. Alla luce di questa assenza di norme, diventa fondamentale capire se il metodo CRISPR-Cas per modificare il DNA è vera cisgenesi, e con ciò stesso sicuro per definizione, come affermano i legislatori americani.

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 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. Questi vettori sono veri mosaici di elementi genetici della più varia origine. La capacità dei vettori di penetrare nelle cellule deriva fondamentalmente dalla loro natura di 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 americani⁷). 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 (e a volte organismo), in cui i margini di imprevedibilità sono molto alti.

⁷ “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

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 neppure in grado di prevedere quali mutazioni si verificheranno (vedi articolo citato da *Le scienze*)? E soprattutto, chi può dirlo, se non c'è una legislazione che prevede 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 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 con la supposta "cisgenesi" del sistema CRISPR-Cas oggi 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, ma soprattutto prima. L'Europa si è presa altri due anni di tempo per decidere se seguire gli USA su questa 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 "pastroie 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.

L'imprevedibilità di quello che effettivamente andrà a succedere quando si inserisce CRISPR-Cas in un organismo nell'intento di modificarlo geneticamente, da un lato mette a nudo la mancanza di controllo derivante dalla nostra fondamentale ignoranza dei processi che regolano l'equilibrio dei viventi; dall'altro denuncia l'immutata "ideologia" meccanicistica con cui si interviene sul DNA. Si continua ad agire sulla sequenza di specifici geni per "migliorare" (secondo quali criteri, definiti da chi? Domande retoriche) l'assetto genetico di un organismo, incuranti della complessità delle relazioni che regolano la RETE dei geni, e incuranti dell'epigenetica, cioè del fatto oggi assodato che l'ambiente - tutto l'ambiente, dal cibo, agli inquinamenti, alle emozioni - influenza il modo di funzionare del DNA. Tutta la visione della biologia sta cambiando, ma in generale i biotecnologi non se ne curano affatto. Avviene il contrario, ad esempio, fra gli psicologi che alla luce dell'epigenetica stanno rivedendo tutta l'impostazione scientifica della loro disciplina e del loro modo di fare ricerca. Questo ci dice molto del mondo in cui viviamo, e di quanto l'attuale "biotecnocrazia" con il suo modo di operare sia inscindibile dall'industria miliardaria di cui è il pilastro.

(17 giugno 2017)