

# CHIRURGIA GENOMICA

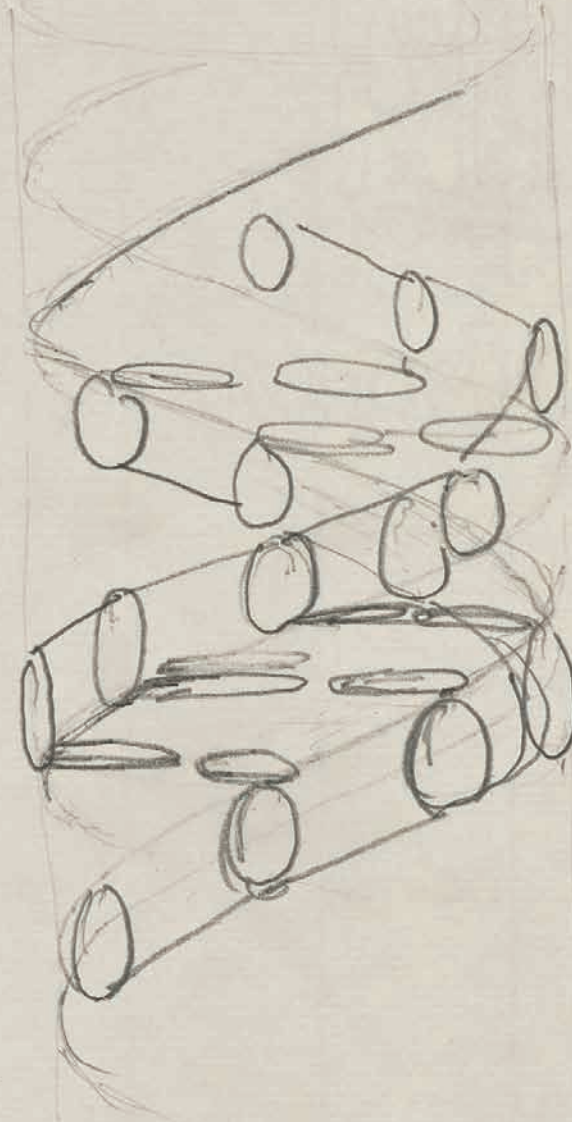
Nuovi e semplici sistemi per la riscrittura dei geni umani potrebbero diventare gli strumenti con cui i ricercatori riusciranno a capire e curare alcune malattie genetiche fatali.

**Susan Young**

**N**ell'ultimo decennio, con la crescita della tecnologia per il sequenziamento del DNA e l'abbattimento dei costi, la nostra comprensione del genoma umano ha fatto passi da gigante. Tuttavia, gli scienziati hanno ancora serie difficoltà a modificare i geni direttamente all'interno di una cellula vivente. Si prenda, per esempio, il caso dell'anemia falciforme. Una malattia debilitante e spesso mortale, causata dalla mutazione in una sola dei tre miliardi di paia di basi del DNA del paziente. Anche se questo errore genetico è semplice e bene conosciuto, i ricercatori medici non riescono a correggerlo e a bloccarne gli effetti devastanti.

Oggi, la speranza ha preso la forma di nuovi strumenti d'ingegneria genomica, in particolare di uno chiamato CRISPR. Questa tecnologia potrebbe permettere ai ricercatori di effettuare interventi di microchirurgia sui geni, modificando semplicemente e con grande accuratezza una sequenza di DNA in un punto preciso di un cromosoma. Insieme a una tecnica di nome TALEN, inventata diversi anni fa, e a un sistema ancora precedente basato su molecole che funzionano da bisturi, le cosiddette nucleasi a dito di zinco, CRISPR potrebbe estendere il campo di applicazione delle terapie geniche, aggredendo malattie genetiche più semplici come l'anemia falciforme e aprendo la strada a cure per malattie più complesse che coinvolgono una molteplicità di geni. La maggiore parte delle terapie geniche tradizionali si limitano a inserire del nuovo materiale genetico in un punto qualunque della cellula, aggiungendo solo un gene. Invece CRISPR e le nuove tecniche forniscono agli scienziati un sistema sicuro per cancellare e modificare particolari tratti di DNA, anche cambiando una singola coppia di basi. Ciò significa che si può riscrivere il genoma a piacimento.

Probabilmente mancano ancora diversi anni prima che i risultati della ricerca possano venire trasferiti sul versante terapeutico umano, ma un crescente numero di ricercatori accademici ha già registrato qualche successo preliminare negli esperimenti per la cura dell'anemia falciforme, dell'HIV e della fibrosi cistica (si veda la tabella a pag. 56). Uno di loro è Gang Bao, ricercatore di bioin-



Il disegno di Francis Crick, del 1953, mostra come lo scienziato immaginasse la molecola del DNA.

*Immagine: per gentile concessione di Wellcome Library, Londra*

gegneria al Georgia Institute of Technology, che ha utilizzato CRISPR per correggere la mutazione delle cellule affette da anemia falciforme in cellule umane fatte crescere in coltura. Bao e il suo gruppo hanno cominciato la ricerca nel 2008 con le proteine sintetiche, le nucleasi a dita di zinco. Successivamente Bao ha adottato TALEN e infine si è avvalso anche di CRISPR. La sua ricerca è indirizzata a più malattie, ma Bao sostiene che ha un senso preciso iniziare dall'anemia falciforme: «Se si vuole intervenire modificando il genoma, è meglio partire da una malattia relativamente semplice, causata da una singola mutazione in un singolo gene, che coinvolge un'unica tipologia cellulare».

Bao ha un'idea precisa di come muoversi. Oggi i medici possono curare una modesta percentuale di pazienti con anemia falciforme andando alla ricerca di un donatore umano il cui midollo osseo sia compatibile dal punto di vista immunologico. I chirurghi rimpiazzano alcune cellule del midollo osseo del paziente con quelle del donatore. Ma questi donatori devono essere del tutto compatibili con il paziente e, anche in tale caso, il rigetto da parte del sistema immunitario – un problema che può portare alla morte – rimane un rischio serio. Il sistema di Bao potrebbe evitare di incorrere in questo problema. Dopo avere prelevato i precursori dei globuli rossi, le cosiddette cellule staminali emopoietiche, dal midollo osseo di un paziente con anemia falciforme, gli scienziati utilizzano CRISPR per correggere il gene difettoso. Poi le cellule staminali del gene modificato vengono “restituite” al paziente, affinché producano globuli rossi sani per rimpiazzare le cellule malate. «Anche se riusciamo a sostituirne il 50 per cento, il paziente si sentirà molto meglio. Se arriviamo al 70 per cento, possiamo dire che la terapia ha avuto successo», sostiene Bao.

Malgrado l'editing genomico con CRISPR risalga a poco più di un anno fa, sta già rivoluzionando la ricerca genetica. In particolare, offre agli scienziati la possibilità di operare rapidamente e contemporaneamente una serie di cambiamenti genetici sulla cellula. Molte malattie umane, tra cui quelle cardiache, il diabete e alcuni disturbi neurologici coinvolgono numerose varianti sia nei geni normali, sia in quelli difettosi. Venire a capo di questa complessità facendo affidamento su modelli animali è sempre stato un processo lungo e tedioso. «Per venire a capo di alcuni problemi in ambito biologico, dob-

## In poco più di un anno, CRISPR ha posto le basi per una rifondazione della ricerca genetica.

biamo fare chiarezza su come si sviluppi l'interazione tra geni e per raggiungere questo risultato si devono introdurre mutazioni in più geni allo stesso tempo», afferma Rudolf Jaenisch, un biologo del Whitehead Institute di Cambridge, in Massachusetts. Ma, continua Jaenisch, se ci si affida agli strumenti tradizionali, la creazione di un topo con una singola mutazione può richiedere anche più di un anno. Se uno scienziato vuole sperimentare più mutazioni in un animale, i cambiamenti genetici devono essere fatti in modo sequenziale e i tempi si possono allungare fino a diversi anni. Al contrario, Jaenisch e i suoi colleghi, tra cui il ricercatore del MIT Feng Zhang (che faceva parte della lista 2013 dei 35 innovatori compilata dalla edizione americana della nostra rivista), ha riferito che la scorsa primavera CRISPR ha permesso al suo gruppo di creare una varietà di topi con più mutazioni in sole tre settimane.

La facilità con cui permette di intervenire su qualsiasi gene, ha reso CRISPR la tecnica ideale per condurre esperimenti su grandi numeri di geni. A dicembre, il gruppo di Zhang e del ricercatore del MIT Eric Lander hanno creato librerie di CRISPR, ognuna di cui fa riferimento a un gene umano. Queste vaste raccolte, che rendono conto di quasi tutti i geni umani, sono state rese disponibili agli altri ricercatori.

### GPS per il genoma

L'industria biotecnologica è nata nel 1973, quando Herbert Boyer e Stanley Cohen dimostrarono che il DNA legato a un plasmide può venire replicato in un batterio, creando il primo organismo geneticamente modificato. Dopo pochi anni, Boyer è diventato uno dei fondatori di Genentech; l'azienda ha cominciato a lavorare con l'E.Coli modificato con un gene umano per produrre insulina per diabetici. Nel 1974, Jaenisch, allora al Salk Institute for Biological Studies a San

## Le opzioni di editing

	1 <b>Nucleasi a dita di zinco</b>	2 <b>TALEN</b>	3 <b>CRISPR</b>
<b>Che cosa è</b>	Una proteina con un enzima che funziona da bisturi e un'area programmabile che si lega al DNA, in grado di adattarsi a una varietà di geni.	Anche in questo caso una proteina con un enzima che funziona da bisturi del DNA e un'area per legarsi al DNA che può essere adattata al riconoscimento di diversi geni, ma di più semplice impiego.	Una proteina “forbice” che taglia il DNA guidata da una molecola di RNA in grado di riconoscere il gene prescelto.
<b>Pro e contro</b>	È stato il primo strumento programmabile di editing genomico, ma si affida a proteine difficili da modificare per raggiungere i nuovi obiettivi genetici. Il bisturi può incidere anche zone al di fuori delle aree previste, con seri rischi.	Anche se più a basso costo e più semplici da utilizzare delle nucleasi a dita di zinco, le proteine TALEN presentano difficoltà in fase di produzione e di riconoscimento dell'obiettivo cellulare. I loro tagli al di fuori dei bersagli cellulari previsti rappresentano un grave problema.	Questa tecnica è semplice da utilizzare e funziona per esperimenti con più geni allo stesso tempo, garantendo alte prestazioni. Come le altre tecniche, si possono effettuare incisioni al di fuori delle aree previste.

Diego, creò il primo topo transgenico utilizzando dei virus per intervenire sul genoma dell'animale con un tratto di DNA di un'altra specie. In questi e altri esempi degli esordi dell'ingegneria genetica, tuttavia, i ricercatori si sono limitati a tecniche "casuali" di inserimento del DNA esterno nella cellula. In realtà si affidavano quasi esclusivamente alla buona sorte.

Ci sono voluti più di due decenni perché i biologi molecolari fossero in grado di agire su specifici geni dei genomi animali. Dana Carroll dell'University of Utah si rese conto che le nucleasi a dita di zinco, proteine sintetiche scoperte dai colleghi della Johns Hopkins University nel 1996, si potevano sfruttare come strumento per raggiungere un obiettivo genetico. Una estremità della proteina è in grado di riconoscere una particolare sequenza di DNA, l'altra estremità può incidere il DNA. Quando una cellula ripara naturalmente queste lesioni, può ricucire il suo genoma copiando il DNA fornito dall'esterno. La tecnologia permette agli scienziati di fare cambiamenti in qualsiasi punto del cromosoma, ma non è di facile impiego. Ogni modificazione richiede al ricercatore di produrre una nuova proteina, specifica per la sequenza individuata; un lavoro complesso e di lunga durata che non sempre raggiunge i risultati desiderati.

TALEN (*Transcription Activator Like Effector Nucleases*), un altro significativo passo in avanti nell'editing genetico, ha fatto la sua comparsa nel 2010. Anche in TALEN sono presenti proteine che cercano e ritagliano una determinata sequenza di DNA, ma adattare a nuovi obiettivi genetici è un compito molto più semplice. Anche se rappresentano un progresso decisivo rispetto alle nucleasi a dita di zinco, TALEN rimangono proteine "ingombranti", che molte volte non riescono a raggiungere il loro bersaglio cellulare.

CRISPR ha cambiato tutto. La tecnica permette di rimpiazzare le proteine del DNA prescelte come obiettivo con una breve sequenza di RNA che è ospitata in particolari geni. A differenza delle proteine complesse, l'RNA - che ha quasi la stessa struttura semplice del DNA - può venire prodotto facilmente in laboratorio; un tecnico è in grado di sintetizzare rapidamente la sequenza di circa 20 lettere che il metodo prevede. Il sistema permette ai ricercatori medici di modificare senza particolari problemi un genoma rimpiazzando, eliminando o aggiungendo DNA.

La sigla CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) descrive una caratteristica del genoma dei batteri, vale a dire la presenza di basi ripetute, intervallate da brevi segmenti di DNA chiamati spaziatori. Gli scienziati avevano già osservato questi anomali segmenti di DNA negli anni Ottanta, ma per almeno due decenni non hanno capito che facevano parte di un sistema difensivo dei batteri. Quando un virus attacca, i batteri possono incorporare sequenze del DNA virale nel loro materiale genetico, serrandole tra i cosiddetti spaziatori. La volta successiva che il batterio incontra il virus, utilizza il DNA all'interno di questi segmenti per produrre RNA che riconosce la sequenza virale corrispondente. A quel punto, una proteina legata a uno di questi RNA frammenta il DNA virale.

Nel 2012, Emmanuelle Charpentier, un microbiologo clinico esperto di patogenesi all'Helmholtz Centre for Infection Research, e Jennifer Doudna, consulente dell'University of California, a Berkeley, hanno dimostrato la possibilità di utilizzare un singolo RNA insieme a un "bisturi" proteico, l'enzima Cas9, per frammentare qualsiasi sequenza di DNA su cui lavorare in provetta. Non è ancora chiaro se il metodo funzioni anche sulle cellule animali, ma nel gennaio 2013 si è verificato un evento importante. Zhang e George Church, un genetista dell'Harvard Medical School, hanno riferito separatamente che il binomio CRISPR/Cas9 si può utilizzare per l'editing genetico nelle cellule animali, incluse quelle umane.

Oggi, un ricercatore che vuole produrre un nuovo gene sintetizza la proteina Cas9 e un frammento di RNA che si accoppia con la sequenza della area prefissata. L'RNA guida l'enzima al DNA che il ricercatore vuole modificare. Siccome lo stesso bisturi genetico si può impiegare indipendentemente dal bersaglio prescelto, i ricercatori possono portare avanti esperimenti in cui sostituiscono contemporaneamente diversi geni in un organismo con Cas9 e più guide RNA.

### Misteri complessi

Zhang, membro del Broad Institute e del Mc Govern Brain Institute, è interessato alle componenti genetiche delle malattie mentali. Per provare a comprendere queste situazioni complesse, Zhang, che lavora al MIT, ha contribuito allo sviluppo di strumenti d'intervento su

## Il cammino verso una terapia

	<b>Anemia falciforme</b>	<b>HIV</b>	<b>Fibrosi cistica</b>
<b>Strategia</b>	Correggere la mutazione dell'anemia falciforme nelle cellule staminali prelevate da un paziente e poi reiniettarle nello stesso paziente; in alternativa, riattivare un gene soppressore dell'emoglobina fetale nello stesso tipo di cellula.	Prevenire la diffusione dell'HIV a nuove cellule immunitarie nei pazienti, alterando i geni che il virus sfrutta per entrare nelle cellule dei precursori delle cellule del sistema immunitario; in alternativa, distruggere l'HIV inattivo che risiede nel genoma umano, modificando i geni virali critici.	Correggere le mutazioni della fibrosi cistica nei genomi delle cellule epiteliali delle vie respiratorie e di altre cellule contagiate.
<b>Status attuale</b>	La strategia di correzione ha esiti positivi nelle cellule umane in una piastra di Petri; nucleasi a dita di zinco, TALEN e CRISPR sono state tutte adottate con successo. La strategia di riattivazione con la nucleasi a dita di zinco è stata dimostrata nelle cellule umane e nei topi.	La strategia di prevenzione basata sulle nucleasi a dita di zinco è in fase di sperimentazione umana; versioni di TALEN e CRISPR sono state applicate a cellule coltivate in laboratorio. La strategia per eliminare il virus latente ha ottenuto buoni risultati con le cellule, sia con le nucleasi a dita di zinco sia con CRISPR.	Le nucleasi a dita di zinco e TALEN sono in grado di "riparare" il gene della fibrosi cistica in colture di cellule epiteliali delle vie respiratorie; CRISPR può correggere il gene in colture di cellule staminali intestinali umane, raggruppate come organi.

## Riscrivendo i geni comuni, l'uomo sarà in grado di combattere efficacemente le malattie infettive.

neuroni e su più geni allo stesso tempo, tra cui TALEN e l'optogenetica, una tecnica che prevede il controllo dell'attività neuronale con la luce laser. Nel 2011, appena saputo di CRISPR, Zhang ha utilizzato la tecnica per lo studio delle cellule umane. Ora lo scienziato è impegnato a svelare i segreti genetici che si celano dietro malattie devastanti e scarsamente comprese come la schizofrenia e l'autismo.

CRISPR permette a Zhang di analizzare sistematicamente alcune varianti del DNA collegate alle malattie. I progressi realizzati nell'ultimo decennio nell'identificazione di geni comuni in persone affette da queste malattie non hanno ancora consentito di spiegare come questi geni siano collegati alla sintomatologia. «Quello che si apprende dalla divisione in sequenze è solo un dato osservativo», sostiene Zhang. Per capire se un gene sospetto è l'artefice della malattia, è necessario introdurre la mutazione specifica nelle cellule sane o nell'organismo e vedere cosa non funziona. Se la cellula o l'organismo modificati presentano caratteristiche che replicano la malattia umana, si è ottenuta la conferma del coinvolgimento del gene.

Zhang è in grado di ricreare, sia nei topi da laboratorio sia nelle cellule umane in coltura, le varianti genetiche riscontrate in persone affette da schizofrenia e autismo. «Si può inserire una mutazione umana nel gene corrispondente di un animale da laboratorio e osservare se l'animale si isola o manifesta un deficit d'apprendimento», dice Zhang. Poi, aggiunge, si studiano le differenze nel comportamento e nella fisiologia dei neuroni coltivati in laboratorio a partire da cellule staminali che sono stati modificate con la stessa mutazione: «Con le mutazioni dei singoli geni, si potrà iniziare a comprendere aspetti delle funzioni biologiche che sono coinvolte nell'autismo».

Zhang sta anche utilizzando CRISPR per sperimentare più cambiamenti genetici allo stesso tempo. Questa tecnica è particolarmente importante per malattie complesse quali l'autismo e la schizofrenia, che in genere non sono causate dal cambiamento di un singolo DNA, come nel caso dell'anemia falciforme. Pazienti diversi sono interessati da differenti gruppi di mutazioni. Venire a capo di questo puzzle di immensa complessità richiederà studi sistematici e su larga scala sui comportamenti di più geni e sul loro modo di interagire. CRISPR permette di portare avanti queste ricerche, afferma Zhang, e sarà uno strumento importante per la scoperta di terapie valide per una serie di malattie: «La nostra comprensione dei meccanismi delle malattie progredirà e questa conoscenza sarà decisiva per lo sviluppo di nuovi farmaci».

### Lo screening degli embrioni

Alla fine dello scorso anno, Doudna, Zhang, Church e due altri pionieri dell'editing genomico hanno fondato una start-up per sviluppare terapie originali per le malattie genetiche dell'uomo. A novembre la Editas Medicine ha annunciato di avere raccolto 43 milioni di dollari di finanziamenti e di avere intenzione di utilizzare le tecnologie di editing genomico per combattere una lunga lista di malattie.

Il futuro di Editas dovrebbe beneficiare della rinascita dell'interesse nei confronti della terapia genica grazie ai continui miglioramenti tecnologici, tra cui meccanismi più sicuri per raggiungere gli obiettivi terapeutici. «Le prospettive della terapia genica sono cambiate», sostiene Church. Non ci sono ancora terapie geniche approvate negli Stati Uniti, anche se si stanno portando avanti alcune sperimentazioni sull'uomo. Ma, secondo Church, le terapie che Editas proporrà saranno fondamentalmente differenti dagli approcci passati, che utilizzano un virus per inserire un gene nelle cellule.

«Introdurre una modifica o eliminare dei tratti è oltre la portata di buona parte di questi metodi virali», spiega Church. L'eliminazione di un tratto di DNA, più che l'aggiunta di un gene, potrebbe rappresentare l'elemento decisivo per la cura di una malattia. Si prenda in considerazione, per esempio, la corea di Huntington. La malattia genetica neurodegenerativa deriva dall'accumulo di una proteina tossica nei neuroni. L'aggiunta di una copia sana del gene alla cellula non impedirebbe alla proteina di svolgere la sua attività nefasta. L'unica soluzione è la riscrittura della originale versione disfunzionale. Con i nuovi strumenti di editing genetico, dice Church, la riscrittura del DNA "difettoso" diventa possibile: «Non ci si limita ad aggiungere qualcosa che è mancante. Se si comincia a pensare che i normali geni non sono necessariamente le versioni ideali, allora il campo di intervento si allarga a dismisura». Si apre la possibilità per gli scienziati di riscrivere le versioni genetiche in modo che l'uomo possa combattere più efficacemente le malattie infettive. Si potrebbe anche pensare di modificare le componenti molecolari coinvolte nell'invecchiamento.

Church prevede inoltre che, se l'editing genomico sarà utilizzato per curare le malattie dell'infanzia, alcuni scienziati saranno tentati di sfruttare la tecnologia per modificare gli embrioni durante la fecondazione in vitro. I ricercatori hanno già mostrato che l'editing genomico permette di riscrivere le sequenze di DNA in embrioni di topi e ratti e, lo scorso gennaio, alcuni studiosi cinesi hanno riferito di avere creato scimmie geneticamente modificate con CRISPR. Con simili strumenti a disposizione, il genoma di una persona può venire "corretto" prima della nascita o addirittura, se i cambiamenti vengono introdotti sulle cellule dell'ovulo o su quelle legate alla produzione di sperma dei futuri genitori, ancora prima del momento del concepimento.

Queste possibilità sollevano questioni di ordine etico. Se i ricercatori dimostrano di essere in grado d'intervenire sulle malattie con l'editing genomico, inevitabilmente alcuni genitori chiederanno di modificare il genoma degli embrioni sani. «Se si potesse prevenire il ritardo mentale con la terapia genica, ammesso che sia un'operazione accettabile, allora si aprirebbe un campo sconfinato di interventi sul fronte delle capacità intellettive», spiega Church.

Queste tematiche sono destinate a diventare sempre più accese con la diffusione di CRISPR. A oggi, la tecnologia è ancora in fase di evoluzione. L'obiettivo di ricercatori come Bao, Church e Zhang è di trovare terapie per malattie ora incurabili, ma buona parte del loro impegno è rivolto al perfezionamento delle tecnologie a disposizione. Tuttavia, anche se solo agli inizi, CRISPR ha già cambiato le prospettive future dell'ingegneria genomica. ■

*Susan Young è redattrice di biomedicina di MIT Technology Review USA.*