

DAVIDE ZANNONI

Il genoma batterico utilizzato come una 'biblioteca autoreplicante'

In

Natura Società Letteratura, Atti del XXII Congresso
dell'ADI - Associazione degli Italianisti (Bologna, 13-15 settembre 2018),
a cura di A. Campana e F. Giunta,
Roma, Adi editore, 2020
Isbn: 9788890790560

Come citare:

<https://www.italianisti.it/pubblicazioni/atti-di-congresso/natura-societa-letteratura>
[data consultazione: gg/mm/aaaa]

DAVIDE ZANNONI

Il genoma batterico utilizzato come una 'biblioteca autoreplicante'

Il DNA (acido desossiribonucleico) contiene e trasmette tutte le informazioni necessarie per la costruzione di un organismo vivente ed è un eccellente 'materiale' per l'archiviazione di dati biologici. Recenti studi di microbiologia molecolare hanno inoltre dimostrato che nel DNA possono essere archiviate e memorizzate anche informazioni diverse da quelle biologiche. Infatti, un modo del tutto insolito di archiviare informazioni deriva dalla capacità del genoma batterico di inserire al proprio interno piccoli frammenti di DNA sintetizzati in vitro e somministrati ai batteri in crescita secondo una scansione temporale definita. Tutto nasce dall'osservazione che gli enzimi Cas e il sistema immunitario dei batteri - CRISPR-Cas - sono in grado di memorizzare nella cellula l'ingresso di DNA esogeno, ad esempio DNA virale, e acquisire la cosiddetta 'immunità adattativa' (una sorta di sistema immunitario primordiale). La relazione qui presentata ha uno scopo duplice: illustrare a grandi linee il meccanismo funzionale del sistema CRISPR-Cas e il recente utilizzo di questa tecnica per archiviare nei genomi di una popolazione batterica i valori di pixel che concorrono a formare immagini statiche e/o dinamiche. I dati pubblicati da Shipman et al. (2017, Nature 547, 345-349) dimostrano che il sistema CRISPR-Cas del batterio intestinale Escherichia coli, può trasmettere alle generazioni successive un numero consistente d'immagini inglobate nel genoma. Ne deriva che il batterio funge da contenitore biologico d'informazioni ovvero da 'biblioteca autoreplicante'.

Premessa

Cultura umanistica e scientifica non sono insieme disgiunti, e la loro intersezione è senza dubbio auspicabile. Tuttavia le due culture parlano spesso linguaggi diversi ed è difficile sostenere il contrario. Si può raccontare la scienza, ed è lo scopo di questa relazione, ma non bisogna confondere il racconto con la scienza. D'altro canto, per raccontare la scienza al vasto pubblico dei non scienziati è necessario usare un linguaggio preso a prestito dalla cultura umanistica. Pertanto, se il linguaggio - con tutte le sue ambiguità - non può essere confuso o sostituito al metodo scientifico, è pur vero che la metafora scientifica si nutre di linguaggi e paradigmi propri degli umanisti. Quest'ultima constatazione è alla base del mio intervento che intende sollecitare una platea di umanisti a 'ripensare' il significato proprio di DNA (acido desossiribonucleico), comunemente inteso come cifra di 'memoria' biologica degli organismi viventi. Infatti, le nuove tecniche di biologia molecolare ci dimostrano che il DNA non è solo memoria biologica ma anche un eccellente archivio di eventi e funzioni non biologiche. Per meglio definire quest'ultimo concetto userò alcuni termini che sono strumenti tipici nella ricerca umanistica - *biblioteca, archivio, collezione, deposito* - ma comunemente usati nella ricerca biologica. In questo senso, appartengo alla schiera di quelli che sostengono la tesi della 'compensazione di scienza e letteratura' con numerosi esempi di scienziati che hanno utilizzato immagini e linguaggi evocativi per sostenere i propri ragionamenti (A. Battistini - *Nuovi Licei: l'avventura della conoscenza*- 2010). Tuttavia, il caso specifico che ho preso in esame ha una peculiarità che non può essere trascurata: l'immagine evocativa, già presente nel titolo, di una biblioteca che si duplica perpetrando se stessa e quindi tutto ciò che in essa è contenuto, è ambivalente poiché va oltre la metafora letteraria essendo anche verità scientifica.

Introduzione allo stato dell'arte

Il termine CRISPR (in inglese: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) è traducibile in italiano come: *brevi ripetizioni palindrome raggruppate e separate a intervalli regolari*. L'acronimo è diventato sinonimo di *editing genetico* ovvero l'insieme di tecnologie molecolari che consentono di 'modificare il genoma'. Ho scelto volutamente il verbo 'modificare', invece di 'manipolare', per l'accezione negativa attribuita a quest'ultimo termine. La tecnica CRISPR permette ai ricercatori di modificare il

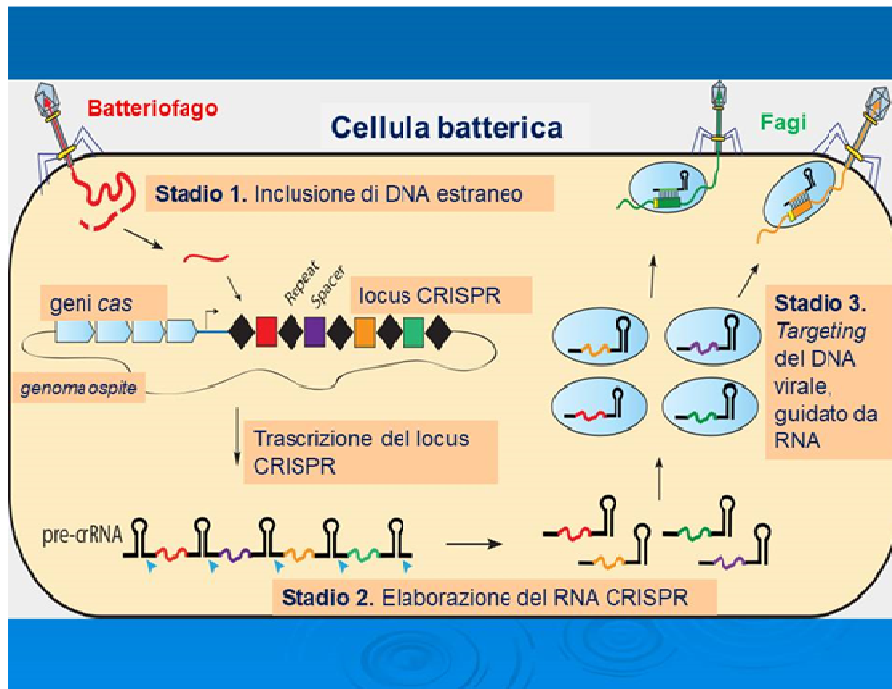
DNA genomico direttamente *in vivo* ed è facilmente intuibile, anche se al momento non valutabile, quale sia l'impatto di una simile procedura nella cura delle malattie genetiche. Rimando il lettore al § 6. per commenti in proposito.

I dati sperimentali che hanno portato alla definizione della tecnologia CRISPR risalgono al 1993 quando le 'regioni o loci del DNA' definite CRISPR furono per la prima volta identificate e descritte dal microbiologo spagnolo F. Mojica (*Molecular Microbiology*, 1993, 9:613-621) nei batteri isolati dalle saline di Alicante (Spagna). Tuttavia, solo nel 2007 il gruppo di Barrangou et al. (*Science* 315:1709-1712) fu in grado di dimostrare che le regioni CRISPR rappresentano la 'versione batterica' del sistema immunitario presente negli organismi superiori. In parole povere, le sequenze CRISPR sono la copia di altre sequenze di origine virale (frammenti di DNA derivanti da virus detti batteriofagi) che in passato hanno attaccato il batterio. Queste 'brevi ripetizioni palindrome' rappresentano quindi 'la memoria' del batterio e vengono sfruttate dal batterio stesso per riconoscere e distruggere il materiale genetico proveniente da virus simili a quelli che hanno originato le CRISPR: costituiscono dunque una forma di 'immunità acquisita' dei batteri.

Le sequenze CRISPR sono parte integrante di un sistema più complesso chiamato CRISPR/Cas, anch'esso coinvolto nell'immunità acquisita dei batteri. Nel 2014, le ricercatrici J. Doudna ed E. Charpentier (*Science* 346,1258096) hanno 'costruito' una versione semplificata di questo sistema (denominata: CRISPR/Cas9) al fine di ottenere uno strumento di *editing genetico* preciso e potente da utilizzare *in vitro*. Grazie al sistema CRISPR/Cas9 è stato quindi possibile modificare permanentemente i geni di molteplici organismi. Un solo esempio al riguardo: il 30.08.2018 è stato pubblicato uno studio sulla rivista *Science* (10.1126/science.aau1549) nel quale la tecnologia CRISPR/Cas9 è usata per la cura di cuccioli di cane di un mese di età, affetti da distrofia muscolare Duchenne, una malattia genetica causata dalla mutazione del gene preposto alla sintesi della proteina *distrofina*. Dopo sei settimane dal trattamento, alcuni tessuti muscolari dei cuccioli avevano recuperato percentuali prossime al 90% della distrofina presente in cuccioli sani.

1. Qualche dettaglio in più sull'azione del sistema CRISPR-Cas come difesa contro i fagi

La specificità del sistema CRISPR-Cas è data dalla sequenza degli spaziatori (*spacer* in Figura) e dalla capacità di un batterio di acquisirne altri inserendo nuove sequenze spaziatrici nel locus CRISPR (vedi Figura). Può sembrare strano ma il meccanismo con cui avviene tale acquisizione è a tutt'oggi l'aspetto meno caratterizzato del sistema CRISPR-Cas, anche se è stato ampiamente dimostrato sperimentalmente. Sta di fatto che in seguito all'ingresso di DNA estraneo al batterio (tipicamente il DNA di fagi o frammenti di DNA - *plasmidi* - contenenti informazioni derivanti da altri batteri) un breve frammento di quel genoma estraneo - chiamato *proto-spaziatore* - può aggiungersi ai loci CRISPR diventando a sua volta un nuovo spaziatore - *spacer* - tra due sequenze ripetute. Per portare a termine questo processo sono necessarie specifiche proteine, Cas (geni *cas* in Figura), e il nuovo spaziatore verrà a trovarsi nella posizione maggiormente prossimale rispetto al *promotore* (vedi Glossario e Stadio 1. in Figura). Domanda: quale sarà il destino delle informazioni acquisite dalla cellula batterica nella regione CRISPR?



La figura, ispirata e modificata da: G. Dehò - E. Galli (2018), illustra l'organizzazione di un locus CRISPR/Cas e i principali passaggi che definiscono la risposta della cellula batterica all'ingresso di DNA estraneo (in rosso) introdotto da un batteriofago. Maggiori dettagli sono riportati nel testo.

La regione CRISPR è trascritta e funge da stampo per la sintesi di una lunga molecola di RNA (complementare quindi alla sequenza di DNA della CRISPR) chiamata pre-crRNA che viene immediatamente 'tagliata' a livello delle sequenze ripetute con l'intervento di proteine Cas. Questo taglio genera dei frammenti detti cr-RNA o CRISPR-RNA (Stadio 2. in Figura) costituiti da uno spaziatore (indicato in Figura con colori diversi) fiancheggiato da sequenze ripetute (in colore nero e a forma di asola in Figura). Lo spaziatore diventa quindi una sorta di guida per le proteine Cas al fine di riconoscere l'elemento genetico estraneo (DNA virale e/o plasmidico) e 'distruggerlo' tramite taglio/lisi da parte della Cas (Stadio 3. in Figura). In sintesi, CRISPR-Cas rappresenta un meccanismo di resistenza batterico per contrastare l'ingresso di elementi genetici mobili come fagi o plasmidi. L'aspetto interessante è che questa resistenza è ereditabile dalla cellula batterica e quindi trasmissibile alle generazioni successive.

2. Come opera il sistema CRISPR/Cas9 in vitro?

Come detto in precedenza, il complesso CRISPR/Cas9 opera secondo meccanismi naturali, caratterizzati negli anni '90 da Francisco Mojica, con i quali i batteri si difendono dall'infezione di virus (rappresentato in Figura). L'enzima che è il fulcro del processo di *editing genomico* è chiamato Cas9 e funziona da *endonucleasi*, cioè come una proteina in grado di introdurre dei tagli in zone ben definite della doppia elica del DNA. Infatti, poiché Cas9 può legare brevi sequenze di RNA che a loro volta sono capaci di appaiarsi/legarsi con il DNA da tagliare, il meccanismo di taglio non è casuale ma è indirizzato verso posizioni specifiche. In laboratorio, la sequenza di RNA da associare a Cas9, chiamata 'guida' o sgRNA (in inglese: *single guide RNA*), è scelta in modo tale da guidare l'enzima nel punto esatto dove operare l'*editing genomico*. In pratica, Cas9 può essere diretta verso una qualunque sequenza del DNA purché essa contenga alcune basi che servono da ancoraggio all'enzima (la sequenza è chiamata PAM ovvero *Protospacer Adjacent Motif*). Pertanto, se l'obiettivo

del taglio è l'introduzione o la sostituzione mirata di uno specifico frammento di DNA, si forniscono alle cellule nuovi frammenti di DNA (sintetizzati *in vitro*) usando i quali e sfruttando un sistema di auto-riparazione del DNA chiamato 'ricombinazione omologa', la cellula provvederà ad auto-riparare la rottura inserendo il DNA esogeno, completando così l'operazione di *editing* genomico. In questo modo, è possibile correggere mutazioni patologiche nel DNA o introdurre varianti geniche note per essere importanti nella prevenzione di alcune malattie.

3. Quali sono i vantaggi di CRISPR/Cas9 rispetto alle altre tecnologie utilizzate nell'*editing* genomico?

Come illustrato nei paragrafi precedenti, i sistemi di *editing* genomico ci consentono di introdurre sequenze genetiche specifiche e, diversamente dalle tecnologie già esistenti e applicate fino ad oggi, non comportano necessariamente l'introduzione di sequenze di DNA in nuove posizioni nel genoma; in pratica, si agisce direttamente sul gene già presente riparandolo, se affetto da mutazione, o determinandone la variazione sfruttando i meccanismi di auto-riparazione del DNA. Dal punto di vista strettamente tecnico, quindi, i sistemi di *editing* vanno oltre le tecnologie attuali legate agli OGM (Organismi Geneticamente Modificati).

In sintesi, tutti i sistemi di *editing* genomico più recenti sfruttano il medesimo meccanismo: guidare un enzima verso il taglio del DNA in un sito specifico del genoma, ed eventualmente fornire alla cellula la sequenza donatrice per riparare il danno e indurre la correzione della sequenza. Tuttavia, il sistema CRISPR/Cas9 è molto più facile da applicare perché, partendo dalla conoscenza della sequenza da tagliare, richiede la sintesi *in vitro* del solo RNA guida per l'enzima Cas9. Pertanto la sola incognita del sistema si riduce alla costruzione *in vitro* di un piccolo frammento di RNA mentre gli altri sistemi in uso richiedono la costruzione *ad hoc* di numerose proteine (ingegneria proteica), senza contare che l'efficienza di *editing* è largamente inferiore (vedi: R Cathomen T and Joung JK, 2008; Boch J, 2011).

Infine, il sistema CRISPR/Cas9 è estremamente flessibile. È stato dimostrato, ad esempio, come la capacità di Cas9 di trovare il suo bersaglio attraverso l'RNA guida possa essere abbinata alla capacità di alcuni enzimi di sostituire una singola base nucleotidica con un'altra ed in tal modo sia possibile correggere efficacemente il difetto all'origine di quelle malattie genetiche causate dalla mutazione di una singola base. In questo caso, l'utilizzo di varianti di Cas9 (Cas modificate *in vitro*) abbinate a un secondo enzima Cas detto 'correttore', diminuisce drasticamente il rischio di introdurre errori di correzione non voluti e teoricamente possibili in seguito ad appaiamenti di sequenza scorretti.

4. Quali benefici derivano dall'utilizzo di CRISPR/Cas9 nella cura delle malattie genetiche?

Il sistema CRISPR è già da oggi largamente usato ai fini dello studio e della cura delle malattie genetiche. Infatti, grazie all'uso in laboratorio di CRISPR/Cas9 e dell'*editing* genomico, si possono creare delle linee cellulari che simulano alcune patologie al fine di identificare nuove terapie in modo più rapido, accurato e su larga scala. Pensando agli aspetti clinici, CRISPR/Cas9 è certamente la via migliore per effettuare terapia genica nella cura di una malattia agendo direttamente sulle sequenze di DNA da riparare. Al riguardo è importante rimarcare che la cura di alcune sindromi umane *via* terapia genica è una procedura già approvata dall'Istituto Superiore di Sanità. È il caso ad esempio della malattia dei *bambini bolla* costretti a vivere in un ambiente assolutamente sterile a causa del loro sistema immunitario compromesso da un deficit nella produzione dell'enzima *adenosina deaminasi* (ADA-SCID). Pertanto, approcci di correzione di mutazioni genetiche che sono

la causa di gravi patologie non sono nuovi, in particolare se utilizzati per correggere difetti genici in cellule somatiche, quelle cioè che non sono preposte alla riproduzione. In linea di principio, il sistema CRISPR/Cas9 è l'approccio più avanzato di terapia genica, in quanto permette di modificare il genoma di una cellula 'curando' la sequenza di DNA 'malata' ma senza inserire altre alterazioni o sequenze estranee. Quest'ultimo aspetto rappresenta il limite degli approcci di terapia genica diversi da CRISPR/Cas9. Infatti, questi si basano sull'introduzione casuale di DNA estraneo nel genoma con il rischio di compromettere funzioni non volute. Approcci di terapia genica tramite CRISPR/Cas9 hanno invece il potenziale di cambiare il DNA in modo selettivo e preciso, realizzando così una vera e propria chirurgia molecolare, anche a livello di cellule germinali o embrionali.

5. Utilizzo di CRISPR/Cas9 in applicazioni non cliniche

Pensando ad ambiti diversi dalla medicina, dobbiamo rimarcare come il *genome editing* prometta di avere un enorme impatto sul miglioramento genetico degli organismi vegetali. Infatti, la possibilità di indurre variazioni nel DNA analoghe a quelle spontanee consente il passaggio da una mutagenesi chimica o fisica (da radiazione) a una mutagenesi biologica, arrivando a un miglioramento genetico molto più efficiente, rapido e preciso. In aggiunta, oltre a evitare mutazioni indesiderate, l'*editing* può consentirci di preservare intatta la varietà di partenza non dovendo ricorrere all'antica tecnica degli 'incroci' tra specie/cultivar vegetali. Quest'ultimo aspetto è di particolare importanza per l'agricoltura italiana che è caratterizzata da un patrimonio di varietà e specie vegetali di grande valore commerciale.

Tuttavia, l'applicazione maggiormente sorprendente e forse inattesa ma che giustifica questa relazione al XXII Congresso Nazionale dell'Associazione degli Italianisti (ADI), è l'uso dell'*editing genomico* al fine di inserire immagini nel DNA (*genome imaging*) che porterà a una rivoluzione nel metodo di archiviazione delle immagini (*image storing*) e trasmissione nel tempo delle informazioni grafiche.

5.1. Codificazione di un film nel DNA batterico: la cellula utilizzata come biblioteca autoreplicante

Il gruppo di ricerca di Shipman *et al.* (2017) ha recentemente descritto un approccio sperimentale per la creazione di sistemi di 'registrazione cellulare' in grado di codificare una serie di eventi come ad esempio immagini. Combinando i principi di archiviazione delle informazioni nel DNA con i sistemi di acquisizione del DNA in cellule viventi, è stato creato un sistema CRISPR che fa proprie, archivia e perpetua le informazioni date alla cellula in una scansione temporale. È importante rilevare che i presupposti per un simile risultato erano già evidenti nel 2016 quando lo stesso gruppo di scienziati (Shipman *et al.*, 2016) aveva costruito il primo 'registratore molecolare' basato sul sistema CRISPR. Il registratore molecolare consentiva alle cellule di acquisire dei dati codificati da frammenti di DNA, generando una 'memoria' archiviata nel genoma del batterio.

Nel loro recente articolo (2017), Shipman e collaboratori hanno affinato la tecnica CRISPR/Cas allo scopo di aumentare la capacità e il tipo d'informazione archiviata dal batterio. Invece di utilizzare sequenze arbitrarie, hanno trasferito nelle cellule batteriche delle informazioni reali, come ad esempio un'immagine digitalizzata di una mano (Figura 1 in: Shipman *et al.* 2017) che ricorda alcuni dei primi dipinti disegnati sulle pareti delle caverne preistoriche.

[Nota: È evidente il significato simbolico di avere scelto questa immagine per un esperimento che è inteso dagli Autori come precursore della tecnologia CRISPR/Cas applicata alla archiviazione di immagini nel genoma di un batterio].

Non contenti di questo straordinario risultato, gli Autori hanno digitalizzato e convertito in brevi sequenze genomiche, un insieme di cinque fotogrammi presi dalla serie *Human and Animal Locomotion* di Eadweard Muybridge (1878), quella di un cavallo al galoppo (Figura 3 in: Shipman *et al.* 2017). Infatti, mentre un'immagine statica rappresenta un insieme di dati vincolati e definiti, le immagini in movimento offrono l'opportunità di ottenere dei genomi batterici che abbiano archiviato informazioni variabili nel tempo ovvero inserite nel genoma secondo una cadenza temporale.

Come riportato nell'*Introduzione* a questa breve relazione, le CRISPR sono formate da sequenze ripetute, in genere lunghe da 20 a 50 bp (paia di basi nucleotidiche), separate da sequenze di spaziatori di lunghezza simile (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005) che corrispondono a frammenti di DNA estraneo. Nel meccanismo batterico di difesa virale (vedi § 1.) le proteine Cas agiscono come un insieme di 'integrasi' (vedi Glossario) al fine di acquisire frammenti di DNA da virus invasori e memorizzarli nei loci CRISPR (Barrangou *et al.*, 2007; Nunez *et al.*, 2014; Amitai and Sorek, 2016; Sternberg *et al.*, 2016). Durante il processo d'integrazione, gli oligonucleotidi del DNA estraneo sono incorporati in punti specifici del locus CRISPR ospite sotto forma di nuovi distanziatori (*spacer*) all'estremità prossimale, dove fungono da memoria molecolare dell'infezione precedente (Barrangou *et al.*, 2007; Deveau *et al.*, 2008; Datsenko *et al.*, 2012; Swarts *et al.*, 2012; Yosef *et al.*, 2012).

Nel 2016, Shipman e collaboratori hanno fornito la prova che il batterio può includere sequenze sintetiche di DNA (frammenti sintetizzati *in vitro*) nel locus CRISPR se tali sequenze sono fornite sotto forma di oligonucleotidi. È interessante inoltre notare che l'integrazione di nuovi oligonucleotidi nel locus CRISPR non è casuale perché era stato osservato in precedenza che i frammenti di DNA esogeno o virale erano acquisiti dal batterio rispettando la cadenza temporale degli eventi. Gli Autori hanno pertanto ipotizzato che l'ordinamento temporale d'integrazione potesse costituire la base di un dispositivo di registrazione molecolare. Se pertanto i frammenti sintetici del DNA fossero integrati nel locus CRISPR proprio come gli elementi virali, allora il sequenziamento dei loci CRISPR di una coltura batterica fornirebbe una fedele registrazione degli oligonucleotidi forniti alle cellule con una ben definita scansione spaziale e temporale. Questo è esattamente ciò che Shipman e collaboratori hanno verificato e dimostrato tramite una strategia sperimentale basata sulla trasformazione, sotto forma di sequenze oligonucleotidiche sintetiche, delle informazioni digitali contenute in ciascun pixel di un'immagine o di un fotogramma utilizzando il sistema CRISPR-Cas del batterio intestinale *Escherichia coli*.

Poiché lo scopo della relazione odierna non mira a entrare nel dettaglio meccanicistico di come Shipman e collaboratori abbiano operato, è sufficiente accennare che i valori di pixel associati ai frammenti di DNA sintetizzati *in vitro* sono stati codificati utilizzando due diverse strategie: a) un sistema definito come 'rigido' col quale i pixel equivalenti a 4 colori diversi sono stati attribuiti ciascuno ad una base oligonucleotidica diversa, e b) un sistema più 'flessibile' e più simile a quanto già avviene nei sistemi biologici, basato su di un codice a 'codoni' (vedi Glossario). I dati hanno poi dimostrato che il sistema rigido non funzionava nel modo sperato poiché generava alcune sequenze

non compatibili con il sistema CRISPR. Inoltre, Shipman e collaboratori hanno scoperto che non tutte le sequenze oligonucleotidiche avevano la stessa efficacia nel trasferire al genoma batterico i dati in esse contenute. Pertanto gli Autori hanno abbandonato il sistema rigido e sono passati al sistema flessibile basato su 21 colori e dove ogni colore poteva essere codificato da tre diversi codici nucleotidici. Con tale approccio hanno verificato che mentre lo schema di codice rigido è da considerarsi più dinamico poiché un pixel si associa a una sola base oligonucleotidica, lo schema di codice flessibile, dove un pixel si associa a un 'codone' cioè a una tripletta di oligonucleotidi, è maggiormente adatto a ottenere immagini colorate. Il risultato finale è che Shipman e collaboratori hanno ottenuto la dimostrazione sperimentale che le proteine Cas1 e Cas2 sono le uniche proteine Cas necessarie per l'acquisizione di nuovi spaziatori nel locus CRISPR ospite e che il "lavoro di archiviazione" è svolto dai batteri in modo cronologico generando dei distanziatori per fotogrammi consecutivi nei loci CRISPR dei genomi batterici. Infine, dopo aver raccolto le cellule, isolato e purificato *in vitro* il materiale genetico, i loci CRISPR della popolazione batterica sono stati sequenziati in modo da ricostruire tutti i fotogrammi del film. Incredibilmente, l'ordine in cui i fotogrammi sono stati acquisiti dal genoma di *E. coli* è stato mantenuto nelle generazioni (una cellula di *E. coli* si duplica in condizioni ottimali di laboratorio ogni 30-40 minuti) con una accuratezza del 90%. Il breve film che deriva dalla decodificazione del genoma batterico è visibile sul sito web:

<https://www.theguardian.com/science/2017/jul/12/scientists-pioneer-a-new-revolution-in-biology-by-embedding-film-on-dna>.

5.2. Osservazioni e prospettive

Per i microbiologi molecolari la parte maggiormente interessante della ricerca di cui vi ho brevemente parlato, non riguarda la codificazione delle immagini. Infatti, per quanto il risultato sia straordinario e possa colpire l'immaginario collettivo, l'interesse dei ricercatori ricade principalmente su come l'approccio CRISPR/Cas9 sia stato utilizzato da Shipman e collaboratori per integrare il DNA esogeno nel genoma di *E. coli* secondo una cadenza temporale ben definita. Un simile approccio sperimentale potrebbe non solo aprire nuove possibilità di registrazione, archiviazione e propagazione dei dati, ma potrebbe anche essere ulteriormente associato a un dispositivo di memoria cellulare. Le proprietà di Cas1 e Cas2, utilizzate come strumento di registrazione molecolare, potrebbero quindi consentire l'archiviazione temporale nel genoma degli eventi o esperienze molecolari che le strutture cellulari stanno avendo o abbiano avuto durante la loro crescita e sviluppo o durante l'esposizione a stress chimico-fisici o ad agenti patogeni: una specie di album di famiglia che raccolga tutti i momenti belli e brutti della vita di una cellula!

6. Che atteggiamento dobbiamo avere nei confronti dell'editing genomico?

Come detto, le tecniche di *editing* genomico permettono applicazioni che per semplicità, precisione e rapidità procedurale erano del tutto impensabili fino a qualche anno fa. Tuttavia, il numero di modificazioni non desiderate associate a un approccio di *gene editing* con il sistema CRISPR/Cas9 non è ancora prossimo allo zero. Questo significa che il sistema non può essere applicato a scopo terapeutico alla linea germinale degli esseri umani ovvero alle cellule destinate alla riproduzione. Nelle piante coltivate invece la frequenza di modificazioni indesiderate è molto più bassa ed è comunque largamente inferiore rispetto i sistemi convenzionali di mutagenesi usati in questi anni nel miglioramento genetico dei vegetali.

Tornando all'*editing* genetico in medicina, è difficile trovare obiezioni alla sua applicazione per la cura di malattie pericolose per la vita e altrimenti inguaribili ma è altrettanto lecito chiedersi dove sia la linea di confine tra malattie pericolose e quelle solo parzialmente invalidanti. È pertanto imperativo che scienziati, medici, legislatori ed esperti di bioetica definiscano al più presto le regole entro le quali la tecnologia CRISPR/Cas9 debba o possa essere utilizzata. La percezione generale è che anche la CRISPR/Cas9, come per tutte le tecnologie nate prima di questa, sia destinata a restare. Non bisogna pertanto averne paura ma conoscerla a fondo per capirne le potenzialità e i limiti, al fine di regolarne l'uso.

Desidero chiudere questo mio intervento citando un breve passo tratto da "L'Umanesimo Necessario" - Prolusione dell'AA 2017/18, Macerata 18.04.2018 - di Ivano Dionigi: «... mentre il sapere tecnologico corre speditamente e celebra i suoi trionfi incurante di ogni telos e dia-logos quello umanistico appare in affanno. Ma questo sonno della ragione rischia di costarci caro ...».

Referenze

- Amitai, G., and Sorek, R. (2016) CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 67–76. doi:10.1038/nrmicro.2015.14.
- Battistini, A. (2010) Nuovi Licei: l'avventura della conoscenza. http://www.indire.it/lucabas/lkmmv_file/licei2010///NLBologna.
- Amoasii, L., Hildyard J.D.W., Hui Li, Sanchez-Ortiz, E., Mireault, A. and Olson, E.N. (2018) Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 362 (6410), 86-91.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., et al. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712. doi:10.1126/science.1138140.
- Boch J (2011) TALEs of genome targeting. *Nature Biotechnology* 29 (2), 135–6. doi:10.1038/nbt.1767.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., and Ehrlich, S. D. (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151, 2551–2561. doi:10.1099/mic.0.28048-0.
- R Cathomen T, Joung JK (2008) Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. *Mol. Ther.* 16 (7): 1200–7. doi:10.1038/mt.2008.114.
- Datsenko, K. A., Pougach, K., Tikhonov, A., Wanner, B. L., Severinov, K., and Semenova, E. (2012) Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nat. Commun.* 3, 945. doi:10.1038/ncomms1937.
- Dehò, G. e Galli, E. (curatori di) *Biologia dei Microrganismi*, Milano, Casa Editrice Ambrosiana, 2018, 448-449.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonte, J., Fremaux, C., Boyaval, P., et al. (2008) Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 190, 1390–1400. doi:10.1128/JB.01412-07.
- Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096. doi:10.1126/science.1258096.
- Mojica, F. J. M., Juez, G., and Rodriguez-Valera, F. (1993) Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol. Microbiol.* 9, 613–621. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x.
- Nunez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V., Davies, C. W., and Doudna, J. A. (2014) Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 528–534. doi:10.1038/nsmb.2820.

Shipman, S. L., Nivala, J., Macklis, J. D., and Church, G. M. (2016) Molecular recordings by directed CRISPR spacer acquisition. *Science* 353, aaf1175. doi:10.1126/science.aaf1175.

Shipman, S. L., Nivala, J., Macklis, J. D., and Church, G. M. (2017) CRISPR-Cas encoding of a digital movie into the genomes of a population of living bacteria. *Nature* 547, 345–349. doi:10.1038/nature23017.

Sternberg, S. H., Richter, H., Charpentier, E., and Qimron, U. (2016) Adaptation in CRISPR-Cas systems. *Mol. Cell* 61, 797–808. doi:10.1016/j.molcel.2016.01.030.

Swarts, D. C., Mosterd, C., Van Passel, M. W., and Brouns, S. J. (2012) CRISPR interference directs strand specific spacer acquisition. *PLoS ONE* 7:e35888. doi:10.1371/journal.pone.0035888

Yosef, I., Goren, M. G., and Qimron, U. (2012) Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 40, 5569–5576. doi:10.1093/nar/gks216.

Glossario

Codone (in inglese *codon*): sequenza specifica di 3 nucleotidi (tripletta) lungo l'RNA messaggero (mRNA) che codifica l'informazione per l'inserimento di uno specifico aminoacido durante la sintesi di una proteina o per la terminazione della stessa (definito *codone di stop*); **DNA**: acido desossiribonucleico o deossiribonucleico (in sigla DNA, dall'inglese *Deoxyribo-Nucleic Acid*) è un polimero organico costituito da monomeri chiamati nucleotidi; il DNA contiene le informazioni genetiche necessarie alla biosintesi di RNA e proteine; **Fagi**: virus che utilizzano i batteri come ospiti (batterio-fagi) ossia come 'fabbriche' per la propria replicazione; **Genoma**: l'insieme dei geni di una cellula e/o di un organismo; **Integrasi**: enzima responsabile dell'inserimento nel genoma dell'ospite di DNA esogeno; **Nucleasi**: enzima che 'taglia' gli acidi nucleici; **Nucleotidi**: sono unità ripetitive degli acidi nucleici (DNA e RNA) costituite da componenti di natura chimica diversa: una base azotata, uno zucchero a cinque atomi di carbonio e un gruppo fosfato; **Oligonucleotidi**: sono brevi (oligo) sequenze di nucleotidi (RNA o DNA), tipicamente con 20 o meno paia di basi; **Plasmide**: filamento lineare o circolare di DNA codificante per funzioni che conferiscono al batterio proprietà speciali come ad esempio la resistenza agli antibiotici o ai metalli; il plasmide è un 'elemento mobile' cioè trasferibile tra specie batteriche influenzando la variabilità genetica complessiva; **Promotore**: è una regione di DNA costituita da specifiche sequenze dette 'consenso', alla quale si lega l'enzima RNA polimerasi per iniziare – *promuovere* - la trascrizione di un gene o di più geni; **Ricombinazione omologa**: scambio di informazione genetica fra sequenze di DNA tra loro omologhe cioè simili; **RNA**: acido ribonucleico (in sigla RNA dall'inglese *Ribo-Nucleic Acid*), è un polimero organico implicato nei meccanismi di codificazione, decodificazione, regolazione ed espressione del DNA; **Terapia genica**: insieme di procedure per curare una malattia attraverso la modificazione genetica delle cellule dei pazienti.

Ringraziamenti

Ringrazio i colleghi e amici, Gian Mario Anselmi e Gino Ruoizzi, per l'opportunità che mi hanno dato di illustrare a una platea poco avvezza ad argomenti biologici, concetti e metodi di microbiologia molecolare che suonano ostici anche a orecchie maggiormente educate a una terminologia scientifica. Per me è stata una prova ardua ma per certi versi divertente e soprattutto istruttiva, che mi auguro di avere superato. Ringrazio inoltre G.M. Anselmi e M. Recanatini per la lettura critica del manoscritto e gli utili suggerimenti.