

# L'ingegneria genetica

RENZO E. SCOSSIROLI

Il particolare campo di interesse nello studio della ereditarietà che è stato chiamato «ingegneria genetica», ha sviluppi recentissimi ed ha già portato molte discussioni soprattutto di natura deontologica che vede a confronto la libertà di ricerca ed i rischi che possono derivare per l'uomo e per tutti gli organismi viventi da sviluppi prevedibili e possibili e da un uso dei risultati della ricerca non sempre in accordo con il miglioramento delle condizioni di vita.

Le possibilità applicative delle tecniche dell'ingegneria genetica, così chiamata poiché ripete le modalità di trasformazione ed assemblaggio di materiali che nel caso specifico coinvolgono le molecole fondamentali della vita responsabili della trasmissione del messaggio ereditato da generazione a generazione, riguardano infatti modificazioni certamente utili come la costruzione di microorganismi in grado di sostituirsi agli organismi superiori nella produzione di sostanze di utilità medica, come ormoni specifici, e la possibilità di trasformare la produttività di piante rendendola indipendente dalla somministrazione di fertilizzanti, ma coinvolgono anche i rischi della costruzione casuale o voluta di nuovi microorganismi patogeni, con effetti deleteri e gravissimi per l'uomo e per tutti gli organismi viventi.

D'altra parte le ricerche che si possono inquadrare nel campo della ingegneria genetica sono importanti anche perché ci permettono di acquisire nuove importanti informazioni per una completa comprensione delle modalità con le quali si realizza in tutti gli organismi il messaggio ereditario.

La comprensione dei meccanismi della ereditarietà ha sempre rappresentato un intenso stimolo conoscitivo per l'uomo fin dal momento in cui ha voluto dedicarsi alla osservazione del mondo vivente ed alla interpretazione dei vari fenomeni che sono associati con la vita.

Già Ippocrate (V sec. a.C.) aveva proposto una teoria ereditaria basata sulla concentrazione nella prole di elementi rappresentativi portati dai genitori, mentre Aristotele (IV sec. a.C.) era del parere che i genitori partecipavano a momenti diversi in quanto il padre forniva il vero e proprio «progetto» della costituzione e dell'aspetto della progenie che veniva recepito ed organizzato dal «sangue» materno, amorfo ma attivo nella realizzazione del progetto.

Queste ipotesi, soprattutto quella aristotelica, erano state recepite anche dalla cultura romana e Lucrezio Caro (1° sec., a.C.) ne sintetizza i principi nella sua enciclopedia *De rerum naturae*:

«La prole talvolta può nascere simile all'avo o può riprodurre perfino sembianze di qualche proavo, perché i genitori conservano spesso, misti nel corpo, i germi d'antichi parenti, trasmessi dai padri nei figli fin dall'origine:

Venere mette per questo alla luce aspetti

[diversi

e i volti ripete e le voci e le chiome che furon già dei nostri maggiori; e nulla proviene da un seme preciso più del volto e del corpo.

La femmina nasce dal seme del padre,

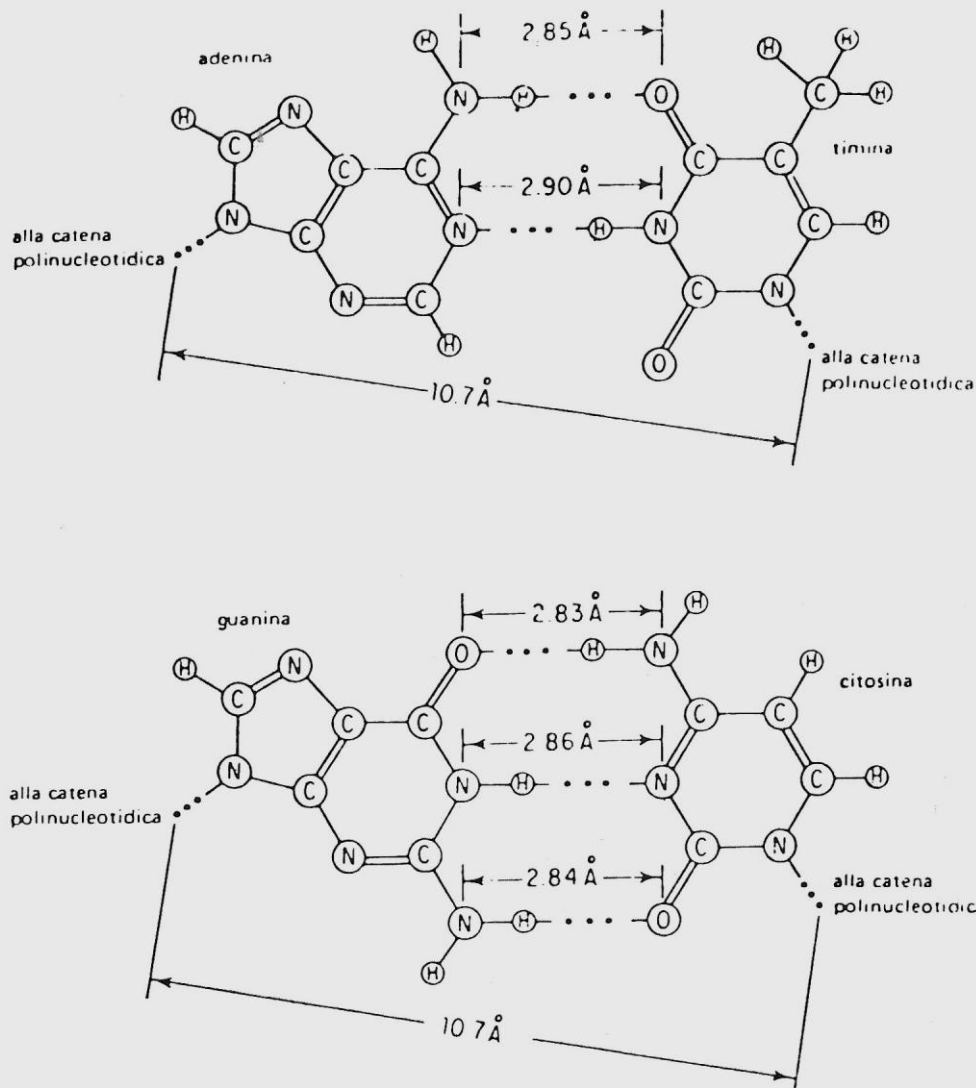


Fig. 1 - Le basi puriniche e pirimidiniche che compongono le molecole del DNA a doppia elica si appaiano obbligatoriamente mediante 2 legami idrogeno (adenina e timina) o 3 legami idrogeno (guanina e citosina).

come il maschio da quello materno. Il parto è sempre prodotto da duplice germe: soltanto che ogni creatura somiglia di più a quello del quale possiede più germi, come puoi facilmente vedere, sia che si tratti di prole maschile, sia femminile».

Queste ipotesi sono abbastanza vicine alla formulazione attuale, anche se rappresentano il risultato della semplice osservazione e della interpretazione filosofica che dalle osservazioni si poteva derivare.

Purtroppo l'oblio nel quale cadde tutta la cultura romana nei secoli bui non risparmiò anche questi aspetti della conoscenza; nel

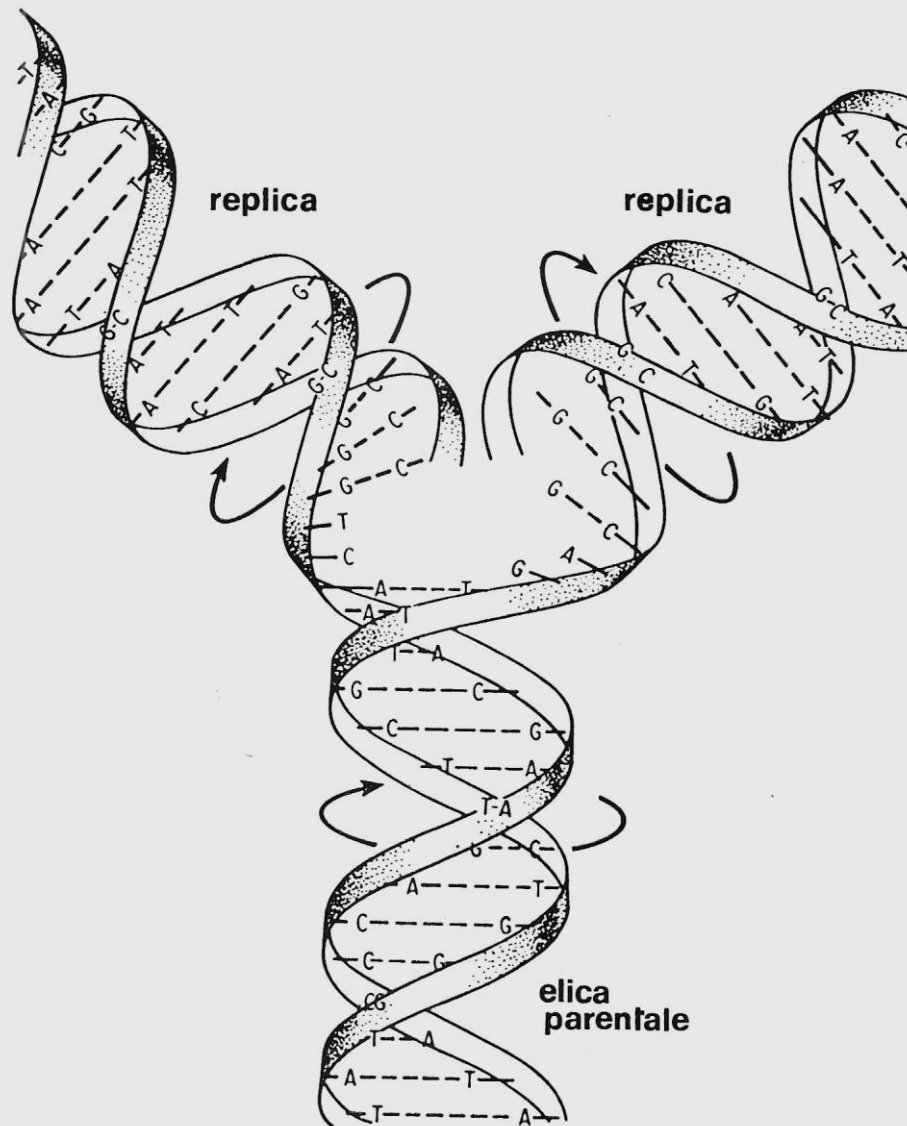


Fig. 3 - La molecola a doppia elica del DNA nel corso della duplicazione. Alla apertura della doppia elica ad una terminazione fa seguito l'assemblaggio di due doppie eliche costituite ambedue da un filamento parentale ed un filamento nuovo che si forma per richiamo delle basi complementari sulle basi del filamento parentale.

18° secolo vengono sostituiti con l'ipotesi del preformismo (*l'humunculus* è già presente nello spermazoto), o dell'epigenesi o della pangenesi di Darwin (gemme per ogni organo presenti nel sangue) e dell'ipotesi Lamarckiana della ereditarietà dei caratteri acquisiti, tutte ipotesi che appaiono come elaborazioni assai più incomplete e lontane dal vero di quelle che vennero formulate dalla cultura filosofica greca e romana.

La teoria di Mendel nel 1865 rompe questo panorama fatto solo di ipotesi e non di fatti, introducendo una impostazione galile-



iana anche nelle ricerche sulla ereditarietà dei caratteri, e raggiungendo una descrizione-modello dei meccanismi attraverso i quali il determinante ereditario di un carattere viene trasmesso dai genitori alla prole. L'ipotesi mendeliana era comunque troppo «sperimentale» per le caratteristiche esclusivamente speculativo-filosofiche della conoscenza imperanti in quel tempo e non venne neppure presa in considerazione dagli studiosi. Ma accumulate nel frattempo con il miglioramento del microscopio ottico le conoscenze sulla struttura sempre più fine degli organismi viventi, l'ipotesi mendeliana venne riscoperta nel 1900 ed aprì il vero corso della Genetica moderna.

Furono anni di ricerca convulsa, quelli del primo '900, ma portatori di conoscenze e risultati tuttora validi sui meccanismi ereditari e sulla natura dei veicoli fisici del messaggio genetico. Era però necessario un nuovo accumulo di informazioni nel campo della chimica e della fisiologia della cellula per poter chiarire nei dettagli la natura fisica e chimica del vettore della informazione genetica e delle modalità con cui si realizza la trasmissione del messaggio ereditario dalla riconosciuta struttura di base, l'acido desossiribonucleico o DNA contenuta nel nucleo della cellula, fino alle proteine-enzimi che rappresentano i catalizzatori di tutta la sequenza di passi metabolici attraverso i quali si realizza la manifestazione fenotipica di un carattere, sia questo rappresentato da un aspetto visibile nella struttura o organizzazione di un individuo, sia che riguardi un aspetto funzionale attraverso il quale si realizza la vita e l'attività dello stesso individuo.

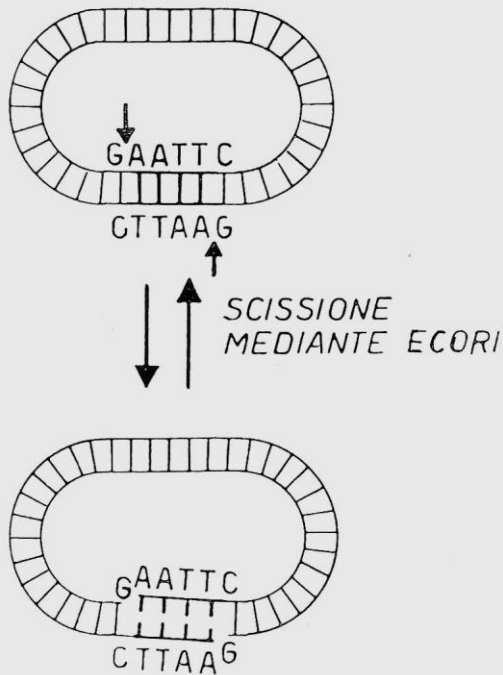
È infatti solo da una ventina di anni o poco più che è stata chiarita la struttura molecolare dell'acido desossiribonucleico e che sono state descritte le modalità della sua duplicazione nel corso della riproduzione cellulare e della produzione dei gameti che sempre rappresentano, almeno negli organismi superiori Eucarioti, il ponte che unisce la generazione presente a quella precedente e a quella successiva.

Gli anni di quest'ultimo quarto di secolo sono stati veramente entusiasmanti per aver portato di anno in anno nuove conoscenze sulla costituzione del codice attraverso il

quale in tutti gli organismi viventi si realizza il messaggio genetico e sulle modalità di funzionamento di questo messaggio iscritto nell'acido desossiribonucleico all'interno del nucleo. Sono state infatti identificate come elementi base del codice tutte le sequenze di triplette di nucleotidi che costituiscono la molecola del DNA che vengono trascritte su un messaggero il quale esce dal nucleo cellulare e che nel citoplasma cellulare traduce il messaggio, assemblando in modo preciso ed elettivo sequenze di aminoacidi per formare il polipeptide, l'elemento base delle proteine enzimi catalizzatrici degli aspetti metabolici attraverso i quali si realizza la funzionalità e la struttura di un organismo vivente.

Questo susseguirsi di eventi ben precisi tutti indipendenti rappresenta il concetto base della vita e dell'organismo vivente che, pur nella sua complessità, si ripete di generazione in generazione assicurando la continuità delle caratteristiche di un dato organismo ed assicurando peraltro, attraverso errori nella duplicazione del DNA accettati e successivamente ripetuti, la variabilità attraverso la quale può aver luogo l'adattamento degli organismi a condizioni ambientali ed a esigenze che variano nel tempo e quindi l'evoluzione.

La molecola del DNA è costituita da una doppia elica di nucleotidi che si associano attraverso legami idrogeno, che sono specifici per le quattro basi che caratterizzano i nucleotidi. I legami idrogeno sono 2 per la Timina e l'Adenina e 3 per la Citosina e la Guanina, per cui nella costituzione della doppia elica è obbligatoria l'associazione tra i nucleotidi con Adenina e Timina e con Guanina e Citosina. Queste coppie di basi si succedono senza ordine apparente lungo la doppia molecola e rappresentano, organizzate in triplette, il codice genetico che alla duplicazione del DNA viene esattamente ripetuto grazie alle differenze tra i legami idrogeno delle due coppie di basi. È questa proprietà che assicura la costanza del messaggio genetico di generazione in generazione, e sono gli eventuali errori di sostituzione di una base con un'altra nella duplicazione, eventi rari ma possibili, che attraverso una variazione di una tripletta nel codice, portano ad una sostituzione di un aminoacido ad un altro nel prodotto genico finale, la proteina-enzima, il



Rappresentazione schematica di un plasmide (in alto) costituito da un anello di DNA a doppio filamento. L'enzima endonucleasi EcoRI è in grado di aprire l'anello come viene mostrato in basso. (da Polsinelli, 1977).

quale assume una nuova funzione e determina la base della variabilità dell'organismo necessaria per una evoluzione.

La sequenza di molte triplette, alle quali corrisponde una sequenza compiuta di aminoacidi nel polipeptide della proteina-enzima, costituisce il gene, cioè la base ereditaria per un singolo carattere morfologico o funzionale, per cui a tutti i caratteri di un organismo corrispondono altrettanti geni, tutti organizzati come sequenze di triplette di nucleotidi sulla molecola del DNA.

Ed è per questa ragione che, man mano che la struttura dell'organismo vivente si complica, con l'aumento delle funzioni aumenta il numero di geni responsabili delle funzioni stesse ed aumenta il numero di nucleotidi che, sempre organizzati in triplette, costituiscono la molecola del DNA propria dello organismo.

Il batteriofago T4, parassita del batterio *Escherichia coli*, ospite naturale del nostro

intestino ove assolve importanti funzioni come la sintesi di vitamine essenziali che noi non siamo in grado di produrre, possiede un DNA costituito da 200.000 nucleotidi, il batterio *E. coli* ne possiede 3.200.000 circa, la drosofila, il famoso moscerino che tanto ha contribuito allo sviluppo della Genetica, ne possiede 80.000.000, il DNA del topo è costituito da 5 miliardi circa di nucleotidi, il mais ne possiede 7 miliardi.

L'analisi a livello molecolare della struttura del DNA ha portato per alcuni geni a riconoscere il linguaggio-codice e le modalità attraverso le quali avviene il riconoscimento della sequenza dei nucleotidi all'interno delle triplette e della sequenza delle triplette che costituiscono il gene.

Questa ricerca a livello molecolare delle modalità di funzionamento e del significato del messaggio ereditario ha portato alla problematica relativa alla possibilità di asportare specifici geni da un dato genotipo e di inserirli in genotipi di organismi affini o addirittura molto lontani come organizzazione.

Queste problematiche sono state suggerite anche dai risultati di esperimenti riguardanti fusioni cellulari di organismi funzionalmente molto diversi, ad esempio cellule di organismi animali con cellule di organismi vegetali. Nel corso del 1977 E. Cocking e collaboratori erano riusciti ad ottenere in vitro la fusione di globuli rossi di pollo con cellule di lievito e nel 1978 è stata segnalata la fusione, sempre in vitro, di cellule umane Hela di un ceppo particolare derivato da un tumore della lingua, con cellule di carota o con protoplasti di tabacco. Si tratta quindi della sintesi di cellule ibride che contengono cromosomi, e quindi materiale genetico, di animali e di piante. Queste cellule offrono la prospettiva di fornire informazioni sulla funzionalità della informazione genetica in Regni biologici diversi e contribuire quindi alla comprensione dei meccanismi di controllo dell'attività genica nei diversi organismi. Per ora, comunque, al di là dell'interesse di aver ottenuto un assemblaggio di cellule diverse, l'utilità di questi ibridi animale-pianta resta ancora tutta da dimostrare. Così è risultato limitato l'interesse della costruzione delle cellule ibride uomo-scimmia e uomo e topo, ottenute con l'impiego di tecnologie particolari, tra le quali è molto importante la pre-



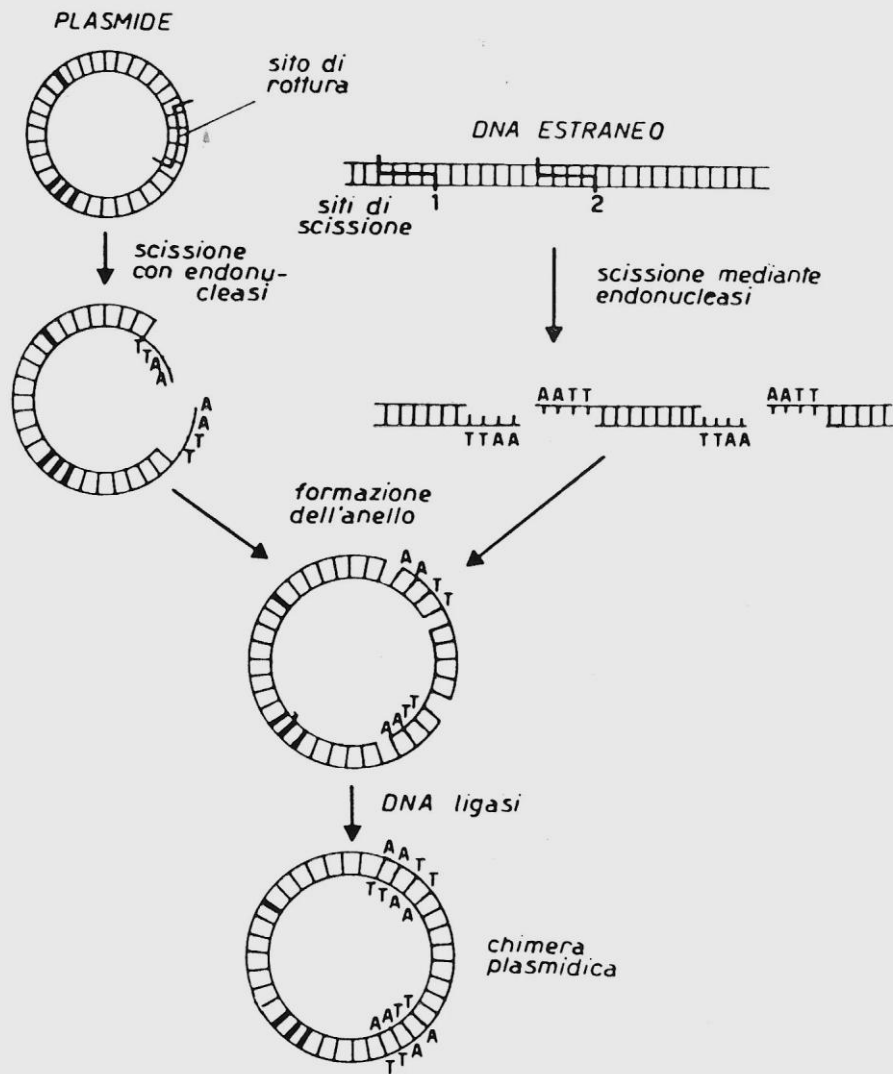


Fig. 4 - L'apertura dell'anello del plasmide può essere utilizzata per introdurre un frammento di DNA estraneo escisso pure da endonucleasi EcoRI. L'anello viene successivamente saldato mediante un altro enzima, la DNA ligasi, e viene così costituito un nuovo plasmide a chimera che contiene, oltre al materiale genetico originario, anche il DNA estraneo.

(da Polsinelli, 1977).

senza del virus Sendai, perché nel corso della moltiplicazione di queste cellule ibride interviene graduale eliminazione selettiva dei cromosomi di una o dell'altra specie, senza che sia possibile comprendere il meccanismo operatore.

Queste operazioni rientrano comunque nel campo della ingegneria cellulare, che comprende anche gli esperimenti di dissociazione delle cellule di embrioni precoci di topo allo stadio di otto cellule prelevati dall'utero di topine geneticamente diverse, riassemble in vitro e reimpiantate nell'utero di topine in condizioni di ricevere il nuovo embrione, il quale si sviluppa regolarmente in topino

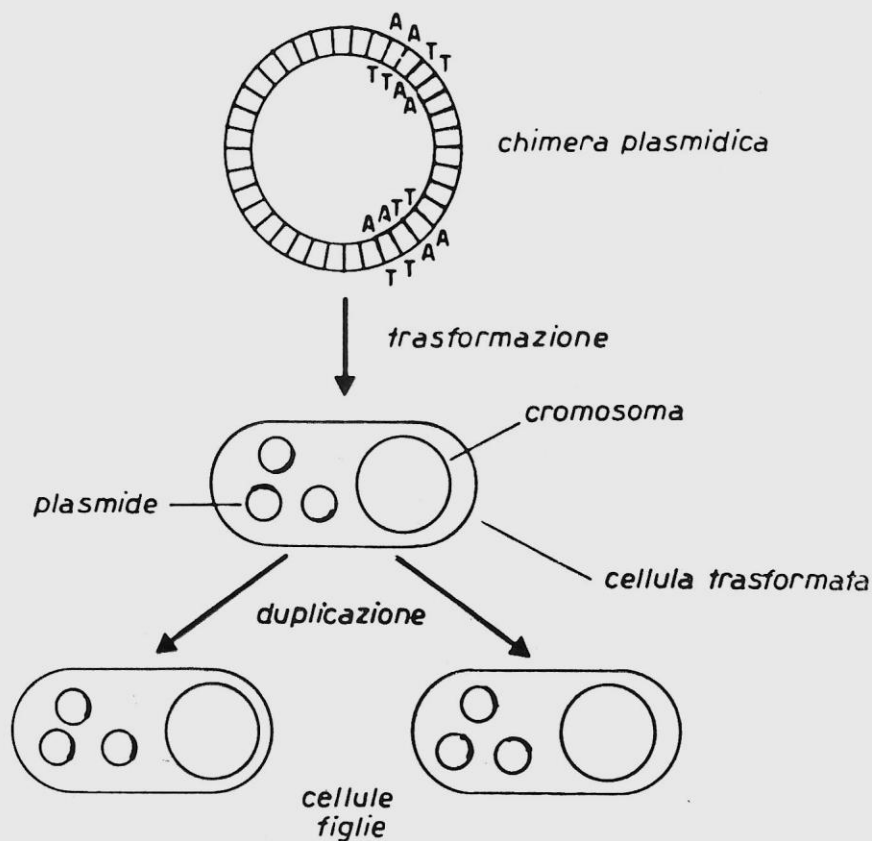


Fig. 5 - Il plasmide a chimera può venire introdotto in una cellula batterica che viene così trasformata in quanto è in grado di svolgere le proprie funzioni e quelle che derivano dalla informazione genetica del plasmide ospitato; questa combinazione è permanente in quanto il plasmidio si riproduce contemporaneamente al batterio quando avviene duplicazione batterica. (da Polsinelli, 1977).

adulto con le caratteristiche proprie dei tipi genetici dei topi utilizzati in questa operazione di riassetto. Da questi esperimenti sono state ottenute comunque informazioni sul numero di cellule embrionali, un massimo di tre, che sono responsabili del fenotipo del topino neonato.

Un lavoro più fine riguarda invece la vera e propria ingegneria genetica che coinvolge il trasferimento non più dell'intero genoma, ma di segmenti di acido nucleico DNA da un organismo ad un'altro.

Questo trasferimento può essere compiuto da batterio a batterio, o da organismi appartenenti ad una organizzazione superiore ad un altro appartenente ad una organizzazione inferiore, ad esempio da una cellula fungina ad un batterio o da una cellula di mammifero ad un batterio, o viceversa. Poiché si tratta di trasferimenti di sequenze di nucleotidi queste possono riguardare un gene o più geni in funzione delle modalità operative.

Queste operazioni di trasferimento utilizzano i cosiddetti *plasmidi*, rappresentati da molecole circolari di DNA in grado di auto-duplicarsi presenti nel citoplasma cellulare, ove svolgono importanti funzioni metaboliche indipendentemente dalla attività della cellula che li contiene. Questi plasmidi non sono integrati nel genoma della cellula ospitante, e superano la casualità della loro distribuzione alla moltiplicazione della cellula od organismo che li contiene, attraverso una du-

plicazione coordinata con quella della cellula.

Le cause della presenza spontanea di questi plasmidi nei batteri e nelle cellule di organismi superiori non è nota, ma si può far risalire alle stesse cause responsabili della costruzione artificiale dei plasmidi e della loro introduzione nelle cellule riceventi. In *Pseudomonas*, batteri che fanno parte della normale flora batterica del terreno, i plasmidi si dimostrano elementi importanti per l'attività del batterio perché contribuiscono alla versatilità dell'ospitante fornendo enzimi importanti per l'ossidazione di sostanze organiche insolite. Ad esempio, i plasmidi *TOL* determinano una sequenza di enzimi inducibili che ossidano il toluene e lo xilene, composti inquinanti insoliti per il terreno, che vengono trasformati fino a composti che vengono metabolizzati con la partecipazione di altri enzimi prodotti da altri plasmidi. I geni di questi plasmidi possono venire trasferiti da *Pseudomonas* a *E. coli* con la mediazione dei plasmidi *RP 4-tol*, e ciò porta le prove dalla possibilità di trasferimento anche in natura di geni utili da organismo a organismo.

Oltre al fatto che possono essere trasferiti da un organismo ad un altro, i plasmidi offrono la possibilità di subire trasformazioni mediante l'impiego di enzimi adatti (endonucleasi da restrizione) i quali inducono l'apertura della molecola circolare del plasmidio e permettono l'inserzione di segmenti di DNA estraneo proveniente anche da organismi superiori, mentre un altro enzima, la DNA ligasi, permette la ricostruzione della molecola circolare la quale riacquista la capacità di autoduplicazione e la funzionalità del plasmide originario.

Il plasmidio trasformato può venire reintrodotta in batteri, ad esempio *E. coli*, o nelle cellule di altri organismi ove è in grado di autoduplicarsi e di svolgere, oltre alle funzioni che già svolgeva nell'organismo di origine, anche quelle relative al messaggio genetico contenuto nel segmento di DNA estraneo inserito nella sua struttura circolare.

Importanti successi, anche se ancora limitati nel numero, sono stati ottenuti utilizzando lo strumento «plasmidio» per indurre nel batterio *E. coli* la capacità di sintetizzare composti estranei al suo normale metabo-

lismo, ma molto importanti per precise applicazioni terapeutiche per l'uomo.

È noto che *E. coli* può essere coltivato in grande quantità in sistemi controllati, per cui questo batterio può diventare particolarmente utile quale «macchina» in grado di compiere la sintesi di questi utili prodotti. I primi risultati sono stati ottenuti con l'introduzione nel batterio *E. coli* di plasmidi modificati che inducono la produzione della somatostatina, un piccolo ed importante ormone costituito da una breve catena di soli 14 aminoacidi che controlla in vivo la sintesi di altri ormoni (ormone della crescita, insulina, glucagone), e di una albumina molto simile alla albumina dell'uovo del pollo. Ricerche in atto cercano di superare le ultime difficoltà per indurre, sempre in *E. coli*, la produzione dell'insulina, dopo che Gilbert è riuscito ad ottenere la proinsulina, il precursore immediato della insulina attiva, con l'inserzione della informazione genetica per la sintesi della proinsulina di ratto in un plasmide che già codifica l'enzima batterico penicillinasi e l'introduzione del plasmide modificato in un ceppo adatto di *E. coli*.

Una recente informazione di stampa, non ancora confermata da un rapporto scientifico, ha annunciato che questa operazione sarebbe perfettamente riuscita anche per il gene che determina la sintesi di insulina umana, aprendo così la via alla possibilità di ottenere insulina umana da batteri coltivabili industrialmente in adatti fermentatori.

Allo stesso modo è stato possibile asportare dal batterio azoto fissatore *Klebsiella pneumoniae* la regione del cromosoma che contiene i geni *nif* responsabili della sintesi della nitrogenasi, l'enzima che controlla la fissazione dell'azoto atmosferico, e trasferirla mediante il plasmidio P a *E. coli*, un batterio che non ha mai realizzato la fissazione dell'azoto atmosferico, e ad *Azotobacter*.

La stessa operazione potrebbe venire effettuata per la creazione di nuovi tipi di piante non leguminose con la capacità di compiere la azotofissazione. Si sa comunque che in questo caso sarà necessario superare altre barriere fisiologiche e biochimiche connesse con le condizioni ambientali in cui si realizza l'attività dei geni *nif*. Infatti nel batterio *Klebsiella* i geni *nif* sono attivi solo in condizioni di anaerobiosi. Anche i simbionti azo-



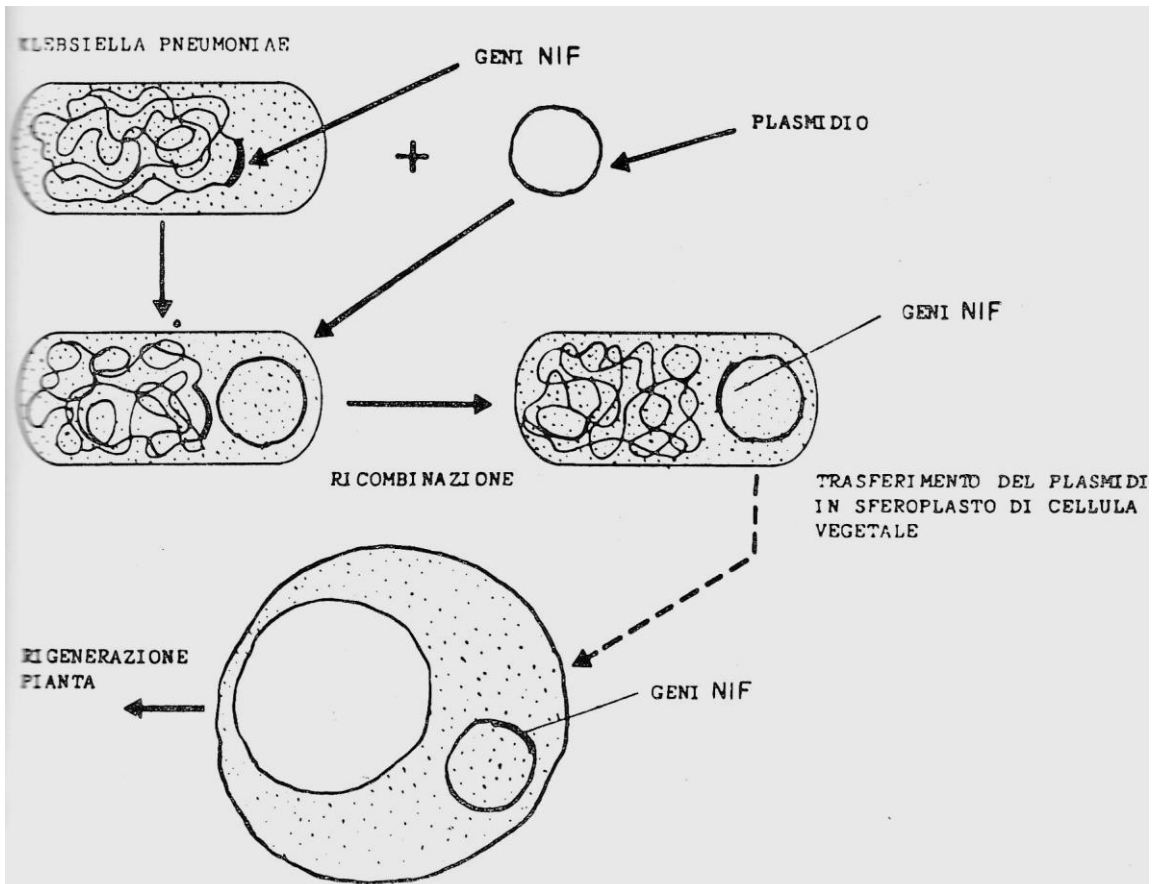


Fig. 6 - I plasmidi possono venire utilizzati per compiere il trasferimento di segmenti di DNA da un organismo ad un altro. Nella figura viene schematizzata l'operazione completa di inserimento di un plasmide in un batterio azotofissatore (*Klebsiella*) nel quale si induce per ricombinazione un nuovo plasmidio contenente l'informazione genetica responsabile della azotofissazione. Questo plasmidio può venire isolato dal batterio ed introdotto in una cellula vegetale, dopo asportazione o modifica della parete cellulare (steroplasto), la quale con opportuni trattamenti può dare origine per rigenerazione ad una pianta nelle cui cellule è inserita l'informazione genetica per la azotofissazione.

tofissatori *Rhizobium*, presenti solo nelle Leguminose, sono attivi in condizioni di anaerobiosi, ed in queste piante la anaerobiosi viene realizzata, a livello dei noduli radicali che ospitano *Rhizobium*, dalla presenza di *leghemoglobina* prodotta dalla pianta, la quale ha la funzione di escludere la presenza dell'ossigeno all'interno dei noduli radicali ove sono presenti ed attivi i batteri azotofissatori.

Sarà quindi indispensabile per le piante non leguminose creare anche queste barriere della anaerobiosi, ad esempio inducendo nella pianta la capacità di produrre *leghemoglobina* o un composto simile, per poter procedere alla creazione di nuove specie coltivate utilizzatrici di azoto atmosferico, mediante l'impiego di un plasmide già disponibile che si è dimostrato in grado di trasferire ad altre specie i geni *nif* di *Klebsiella*.

Altri risultati ottenuti con questa tecnica

di trasferimento di materiale ereditario da un ceppo ad un altro della stessa specie o da una specie ad un'altra sottolineano la elevata dose di rischio derivante da situazioni non previste. La semplice coltura in vitro di virus tumorali del topo su cellule umane ha messo in evidenza la comparsa di virus oncogeni per le cellule umane che contemporaneamente hanno perduto la proprietà tumorigena nei riguardi del topo. Una eventuale fuga dal laboratorio di questi nuovi virus patogeni per l'uomo determinerebbe la diffusione di nuove cause di tumore per l'uomo certamente indesiderate.

Lo stesso esempio può valere per plasmidi già costruiti in grado di fornire a batteri normalmente patogeni la resistenza agli antibiotici o la capacità di produrre tossine in batteri normalmente innocui per l'uomo o per gli animali.

Questi nuovi aspetti di rischio vengono suggeriti dalle normali modalità di azione di batteri che, come l'*Agrobacterium tumefaciens*, sono in grado di indurre sviluppo di tumori nelle piante. Infatti, la attività tumorale di questo batterio è la conseguenza di una insolita forma di parassitismo, in quanto il batterio inocula nelle cellule della pianta attaccata una frazione del suo DNA sotto forma di plasmidio il quale si riproduce anche quando manca il batterio, determinando alterazioni del metabolismo della cellula vegetale che conducono allo sviluppo del tumore.

I risultati di queste ultime ricerche sulle modalità di azione di *Agrobacterium* che riguardano una ingegneria genetica spontanea descritta come parassitismo genetico, fanno pensare molto ai rischi connessi a trasformazioni indesiderate che possono comparire nel corso della produzione di plasmidi e della loro introduzione nei batteri, in grado di determinare condizioni di virulenza non ancora esistenti o condizioni di resistenza ai mezzi terapeutici ora disponibili per combattere infezioni batteriche.

Questi timori sono stati recepiti da tutti i ricercatori i quali hanno proposto delle regole limitative per questo tipo di ricerca, che comprendono la creazione di strutture di laboratorio con prescrizioni di sicurezza contro la «fuga» casuale dei nuovi organismi, in grado cioè di realizzare un «conteni-

tore fisico» dei materiali sperimentali, ed un controllo del lavoro sperimentale attraverso la assegnazione condizionata del finanziamento delle ricerche in funzione del tipo di lavoro che ci si propone di fare. In alcuni paesi, ad esempio negli USA o in Gran Bretagna queste regole sono state recepite per una specifica legislazione. Questo vale, è ovvio, per coloro che desiderano sottoporsi al controllo burocratico. Ma per coloro che non desiderano sottoporsi a questo controllo e possono ottenere il finanziamento delle loro ricerche da enti ed organismi che agiscono in regime di segretezza, ad esempio organizzazioni militari, quale regime di controllo potrà essere realizzato?

È questo invero il campo di confronto e scontro tra libertà di ricerca e rischio dato dai possibili prodotti della ricerca. Poiché i rischi non sono potenziali anche se si presentano normalmente come improbabili, quale potrà essere l'atteggiamento del «genetista ingegnere» di fronte a questo enorme e inesplorato campo di sviluppo della conoscenza? È una domanda questa alla quale è difficile rispondere poiché coinvolge un conflitto tra libertà di pensiero per la ricerca del «nuovo» ed i rischi connessi con il prodotto del pensiero.

---

L'Autore:

Prof. Renzo E. Scossioli, Istituto di Genetica dell'Università di Bologna.

---