

I PRIMI PASSI NELLO SVILUPPO DELLE BIOTECNOLOGIE

di Maria Cristina Speciani

Il cammino delle scienze biologiche, come quello di ogni scienza, è influenzato dallo sviluppo tecnologico. La storia delle scoperte compiute al livello molecolare degli organismi è una storia densa di avvenimenti che hanno portato allo sviluppo delle biotecnologie e hanno preparato la strada alle terapie geniche. Nella scia aperta dagli articoli pubblicati sui primi numeri di Emmequadrato e rimandando ai prossimi numeri la riflessione sulle conquiste più recenti.

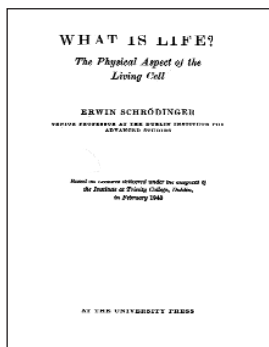
Nel lungo sviluppo delle scienze biologiche si compie un salto qualitativo nel XIX secolo, quando si comincia a applicare il metodo scientifico in senso stretto allo studio dei viventi.

A partire da questo periodo si possono identificare diversi percorsi concettuali che hanno aiutato l'uomo a capire meglio la propria natura e il suo posto nell'ambiente.

Una linea di sviluppo, importante in una prospettiva didattica, approfondisce tre grandi domande-problemi: come sono costituiti gli esseri viventi (teoria cellulare), come si trasmettono i caratteri (teoria dell'ereditarietà) e come si spiega la diversità dei viventi (teoria dell'evoluzione).¹

Un'altra linea di sviluppo segue le scoperte compiute sulla cellula man mano che la tecnologia mette a disposizione della scienza microscopi sempre più potenti²: grazie al microscopio ottico nasce l'istologia, si identificano le fasi della mitosi e della meiosi, si realizzano le prime mappe cromosomiche; dopo la seconda guerra mondiale, quando il microscopio elettronico permette il salto rivoluzionario nell'aumento del potere di risoluzione, si afferma la citologia e lo studio degli organuli, fino a scoprire che il citoplasma, così come i cloroplasti o i mitocondri, sono strutture di membrana organizzate che compiono particolari funzioni.

Qui, per dimostrare come ogni passo della scienza è influenzato dall'introduzione di tecnologie nuove, seguiremo un'ulteriore linea di sviluppo che prende avvio, ancora nell'Ottocento, con la scoperta che gli organismi sono costituiti da molecole e che arriva fino all'applicazione terapeutica delle biotecnologie. Questo percorso deve essere un punto di riferimento per i docenti: non solo perché molti fenomeni biologici trovano una spiegazione a livello molecolare, ma perché aiuta a giudicare avvenimenti e problemi di estrema attualità.



Frontespizio della terza edizione (1948) di *What is Life?*

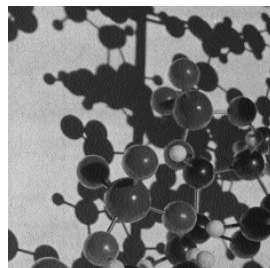
L'analisi chimica degli esseri viventi

Agli inizi dell'Ottocento era chiaro che la vita è, in termini chimici, una combinazione fondamentale di carbonio, ossigeno, azoto, zolfo e fosforo: nel 1807, su proposta del francese Jacob Berzelius, si era introdotto il termine «chimica organica» per identificare l'enorme quantità di sostanze che si andavano isolando da organismi vegetali e animali. Come è noto, dopo il 1828, anno in cui Friedrich Wöhler realizza la sintesi artificiale dell'urea, i chimici cominciarono a indagare sui meccanismi che operano negli organismi viventi.

Dalla scoperta del primo enzima (zimasi, nelle cellule del lievito) realizzata nel 1897 dal tedesco Eduard Buchner, che per questo lavoro riceverà il premio Nobel per la chimica nel 1907, la biologia diventò rapidamente scienza degli enzimi. Nel 1926 l'americano James B. Sumner riuscì per primo a cristallizzare un enzima, l'ureasi, e John H. Northrop cristallizzò la pepsina e la tripsina. Entrambi prenderanno il premio Nobel nel 1946. I lavori successivi chiarirono la natura degli enzimi come catalizzatori di tutte le reazioni metaboliche della cellula: il tedesco Leonor Michaelis (nel 1913) fu il primo a proporre una teoria sul funzionamento degli enzimi che sarà punto di riferimento per le ricerche degli anni seguenti.

Durante la prima metà del XX secolo, alcuni scienziati pensavano che fosse giunto il momento di spiegare i fenomeni biologici in termini chimici. Tra questi il fisico austriaco Erwin Schrödinger che, nel suo libro *What is Life?*, che raccoglie una serie di conferenze tenute nel 1943 scriveva: «[...] la materia vivente, mentre non elude le 'leggi della fisica' stabilite fino a oggi, è probabile che coinvolga 'altre leggi della fisica' fino ad ora sconosciute, che, una volta scoperte, formeranno una parte integrale di questa scienza.» E ancora: «Una piccola molecola può essere chiamata 'il germe di un solido'. Partendo da questo piccolo germe solido sembra che ci siano due differenti modi di costruire delle associazioni sempre più grosse: uno è il modo comparativamente cretino di ripetere la stessa struttura in tre direzioni nello stesso modo. Questo è il modo con cui cresce un cristallo. Una volta che la periodicità è definita non vi è un limite teorico alle dimensioni dell'aggregato. L'altro modo è quello di fare aggregati sempre più ampi senza questo sciocco congegno ripetitivo. Questo è il caso della molecola organica complessa, in cui ogni atomo e ogni gruppo di atomi svolgono una funzione specifica, non identificabile con quella degli altri (come succede in una struttura periodica). Una simile struttura si potrebbe chiamare, in modo abbastanza appropriato, cristallo o solido aperiodico e potremmo esprimere la nostra ipotesi dicendo che: Crediamo che un gene, forse l'intera fibra del cromosoma possa essere definito come un solido aperiodico.»³

Oggi molte speculazioni di Schrödinger si sono dimostrate sbagliate, ma il libro convinse molti scienziati a lavorare sui problemi biologici.



¹Cfr.: *Emmeciquadro* n.1, marzo 1998 e n. 3, settembre 1998.

²Le prime scoperte risalgono a Van Leewenhoek (1632-1723) e a Spallanzani (1729-1799), ma solo nel 1834, grazie a microscopi capaci di 500 ingrandimenti si identificano gli elementi fondamentali della cellula.

³E. Schrödinger, *What is life?*, Cambridge 1948, p. 60-61.

«SE IL SUSSEGUIRSI DI QUESTI ANTEFATTI VIENE CONSIDERATO CON IL DOVUTO DISTACCO, SI RIMANE COLPITI DALLA NOTEVOLE CONTINUITÀ DEL MODO DI PROCEDERE, CHE RIVELA UN APPROCCIO RIDUZIONISTA E ANALITICO AGLI ORGANISMI VIVENTI, ISPIRATO INIZIALMENTE ALLA CHIMICA, POI ALLA FISICO-CHIMICA. SE NE DEDUCE INOLTRE CHE QUESTE RICERCHE HANNO PORTATO AD UNA SPIEGAZIONE SINTETICA E RAZIONALE DEL METABOLISMO E DELL'ENERGETICA. LA VITA È CATALISI. I CATALIZZATORI SONO GLI ENZIMI. E LA GRANDE FONTE DI ENERGIA (...) È L'ATP. COSÌ L'UNITÀ CHIMICA DEGLI ORGANISMI VIVENTI SI È IMPOSTA IN MODO INCONTESTABILE COME UNA DELLE PRINCIPALI CONQUISTE DELLA NUOVA BIOLOGIA, SUBITO DOPO LA SECONDA GUERRA MONDIALE.»⁴

Un modello per il DNA

Nonostante lo scetticismo di James Watson, che scrisse: «Come potevo appassionarmi allo studio di noiosi fenomeni chimici, quando i chimici non riuscivano a dire nulla di importante sugli acidi nucleici?», i progressi nello studio chimico-fisico delle molecole biologiche segnarono le tappe fondamentali nel cammino verso l'identificazione della struttura del DNA.

Nell'immediato dopoguerra, molti ritenevano che la logica della materia organica fosse stata svelata. Ma restavano aperte domande fondamentali: di che cosa sono fatti i geni? qual è la loro struttura e in che modo si passa dal gene alla proteina?

Il DNA era tra i candidati dal 1869, quando Friedrich Miescher, un ricercatore svizzero che lavorava all'università di Tubinga lo aveva isolato da molte cellule e lo aveva chiamato «nucleina». Ma «la maggior parte degli scienziati di inizio secolo era convinta che le proteine fossero portatrici di geni [...] pochi pensavano che il segreto della vita fosse custodito nel DNA.»⁵

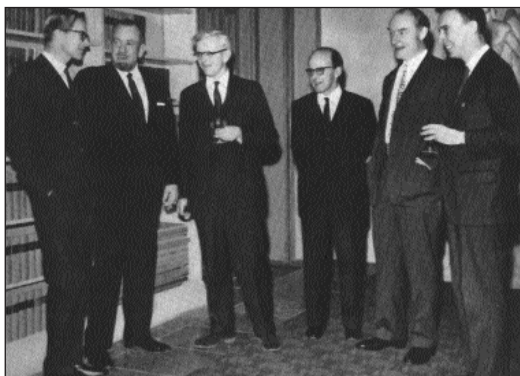
I notissimi esperimenti del microbiologo inglese Fredrick Griffith con i ceppi batterici che provocavano la polmonite nei topi, avevano portato già nel 1928 a sospettare che il DNA contenesse i geni. La scoperta fu resa nota nel 1936.

Nel 1941 George W. Beadle e Edward L. Tatum, lavorando sulla *Neurospora*, avevano dimostrato che «il gene contiene l'informazione necessaria alla sintesi di un enzima» (prenderanno il Nobel nel 1958).

Nel 1942 Oswald T. Avery, un batteriologo del *Rockefeller Institute* di New York, dimostrò che il DNA (e non la proteina) porta l'informazione genetica. I risultati furono pubblicati sul *Journal of Experimental Medicine* nel 1944.

Un altro passo avvenne all'interno del gruppo *Phage*, un'associazione di biologi e fisici costituitasi nel 1941 che operava nei laboratori di *Cold Spring Harbor*. Nel 1952, Alfred Hershey e Martha Chase dimostrarono che i virus che attaccano i batteri, i batteriofagi, trasferiscono solo il proprio DNA nella cellula ospite, senza introdurre proteine e che il DNA, da solo, potesse controllare la produzione di nuovi virus.

Nell'aprile del 1953 il biologo americano James



A Stoccolma per ricevere il premio Nobel, dicembre 1962: da sinistra: Maurice Wilkins, John Steinbeck, John Kendrew, Max Perutz, Francis Crick e James D. Watson

Watson e il fisico inglese Francis Crick, pubblicarono su *Nature* una breve comunicazione descrivendo il modello a doppia elica per la molecola del DNA, il primo che riusciva a giustificare i dati sperimentali di tipo chimico e fisico che si erano accumulati in quegli anni.⁶ L'intuizione di Watson e Crick sulla complementarità delle basi azotate e sui legami deboli risolse problemi critici sul ruolo biologico del DNA. I due scienziati prenderanno il Nobel nel 1962, insieme a Maurice Wilkins.

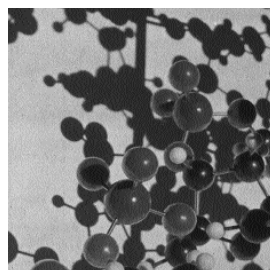
«QUESTO MODELLO È DAVVERO IL CENTRO DELLA BIOLOGIA, CHE CON ESSO RINASCE. TUTTE LE NOSTRE CONOSCENZE SUI MECCANISMI INTERNI DELLA RIPRODUZIONE DEL MATERIALE GENETICO DERIVANO DALLA DOPPIA ELICA, COSÌ COME CIÒ CHE ABBIAMO ACQUISITO SUL TRASFERIMENTO DELL'INFORMAZIONE SI MATERIALIZZA NELLA COSTRUZIONE DELLE PROTEINE.»⁷

«LA SCOPERTA DELLA STRUTTURA DA PARTE DI CRICK E WATSON, CON TUTTE LE SUE IMPLICAZIONI BIOLOGICHE, È UNO DEI PIÙ GRANDI AVVENIMENTI SCIENTIFICI DEL NOSTRO SECOLO. HA ISPIRATO UN NUMERO SORPRENDENTE DI RICERCHE NUOVE: HA RIVOLUZIONATO LA BIOCHIMICA TRASFORMANDO ANCHE LA SCIENZA.»⁸

La rivoluzione molecolare

La scoperta della struttura del DNA aveva fornito ai biologi uno schema per interpretare i fenomeni che avvengono nella cellula; i passi successivi evidenziano i nodi attorno a cui si sviluppò una vera rivoluzione, come testimoniano i premi Nobel assegnati nel decennio successivo. Nel 1959 venne assegnato il Nobel a Severo Ochoa e Arthur Kornberg per le scoperte sul meccanismo della biosintesi degli acidi nucleici. La comprensione che il DNA contiene il codice per la sintesi delle proteine, diede avvio alle ricerche sulla decifrazione del codice e sul meccanismo della sintesi.

Alla fine degli anni Cinquanta, Marshall Nirenberg, un biochimico trentenne formatosi all'Università del Michigan, aveva cominciato a lavorare sulla sintesi delle proteine di cui non si sapeva quasi nulla: era stato suggerito che l'informazione genetica fosse codificata dalla sequenza di nucleotidi, ma nessuno aveva dimostrato l'ipotesi né aveva letto il codice. Nell'agosto 1960, insieme con Johann Matthaei, un fisiologo trentunenne dell'Università di Bonn, usando un RNA artificiale fatto solo di uracile, ottenne una proteina composta da un solo tipo di aminoacido: la fenilalanina. Fu l'esperimento chiave: svelava il primo pezzetto del codice e mostrava il metodo per la sua decifrazione. Nell'estate del 1961, al Simposio Internazionale di Biochimica di Mosca, Nirenberg



⁶F. Gros, *Biologia molecolare e biotecnologie*, Jaca Book, Milano 1994 (1989), p. 24.

⁷L. Thompson, *Correggere il codice*, Garzanti, Milano 1996, p. 71.

⁸Sistemando le basi azotate una sopra l'altra si realizzava una struttura che corrispondeva ai 3,4 Å del modello a raggi X; ponendo due catene antiparallele affacciate una all'altra in corrispondenza delle basi avevano ottenuto il diametro di 20 Å; avvolgendo tra loro le due catene si otteneva la struttura elicoidale evidente nelle figure di diffrazione.

⁹F. Gros, op. cit., p. 31.

¹⁰Dalla Prefazione scritta da Lawrence Bragg a: J.D. Watson, *La doppia elica*, Garzanti, Milano 1968.

| prima posizione (lettera 3') | seconda posizione | | | | terza posizione (lettera 3') |
|------------------------------|-------------------|-----|-----|-----|------------------------------|
| | U | C | A | G | |
| U | UUU | UUC | UUA | UUG | U |
| | UUA | UUG | UUU | UUC | C |
| | UUG | UUC | UUA | UUG | A |
| | UUU | UUC | UUA | UUG | G |
| C | CUU | CUA | CUG | CUU | U |
| | CUA | CUU | CUU | CUU | C |
| | CUU | CUA | CUU | CUU | A |
| | CUU | CUA | CUU | CUU | G |
| A | AUU | AUA | AUG | AUU | U |
| | AUA | AUU | AUU | AUU | C |
| | AUU | AUA | AUU | AUU | A |
| | AUU | AUA | AUU | AUU | G |
| G | GUU | GUA | GUG | GUU | U |
| | GUA | GUU | GUU | GUU | C |
| | GUU | GUA | GUU | GUU | A |
| | GUU | GUA | GUU | GUU | G |

Schema del codice genetico



Premi Nobel per la medicina e la fisiologia 1965:
A. Lwoff, J. Monod e F. Jacob

annunciò i primi dati sulla struttura a triplette del codice genetico, scatenando una corsa febbrile alla sua decifrazione completa. Occorsero cinque anni: nel giugno 1966 Nirenberg presentò la versione ufficiale, la forma definitiva del codice genetico di tutti i viventi. Nel 1968, insieme a Robert Holley e Har Khorana, vinse il premio Nobel.

Per quanto riguarda il meccanismo della sintesi proteica fu determinante la scoperta dell'RNA messaggero, compiuta nel 1961 da Jacques Monod, François Jacob e François Gros, ma anche quella dei ribosomi, degli RNA transfer (Paul Berg 1956), degli enzimi di attivazione e degli innumerevoli fattori della traduzione. Si affermava così quello che sarà chiamato «dogma centrale della biologia»: DNA → RNA → proteina. Contemporaneamente si cercava di spiegare l'influenza dell'ambiente sui geni. In questo

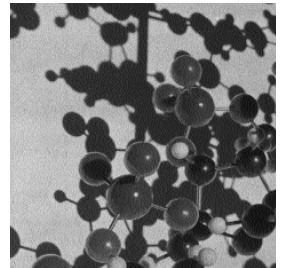
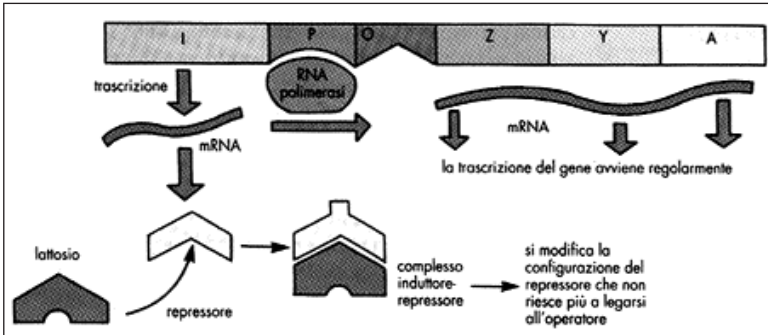
quadro si collocano le ricerche di Francois Jacob, Jacques Monod e André Lwoff (per cui prenderanno il Nobel nel 1965) sui meccanismi di trasferimento dell'informazione genetica e sui circuiti di regolazione nella cellula batterica: mentre la maggior parte dei geni guida le attività della cellula (o la sua morfologia), attraverso le proteine, esistono geni regolatori (teoria dell'operone) che modellano, attraverso attivatori o repressori, l'attività dei geni strutturali.

«LA BIOLOGIA, CHE INIZIALMENTE ERA STATA UNA SCIENZA D'INVENTARIO E DI CLASSIFICAZIONE CON I COMPARATISTI DEL XIX SECOLO, POI UNA SCIENZA STATISTICA CON I GENETISTI ED INFINE UNA POTENTE DISCIPLINA ANALITICA CON I BIOCHIMICI DEL PERIODO ANTEGUERRA, ERA DIVENTATA UNA SCIENZA DEI CODICI E DEI CIRCUITI. DA LÌ S'IMPARENTAVA STRANAMENTE ALLA MICROELETTRONICA E ALL'INFORMATICA. BIOLOGI E FISICI POTEVANO ALLORA COMPRENDERSI, ADERIRE AD OBIETTIVI SIMILI E CONDIVIDERE GLI STESSI ENTUSIASMI PER UN UNIVERSO CHE COMINCIAVA APPARENTEMENTE A SVELARE I SUOI SEGRETI.»⁹

La capacità di analisi rivelata dalla biologia molecolare apre una serie di problemi epistemologici, che registrano numerose prese di posizione nel mondo e culturale. Nel 1970 viene pubblicato in Italia il libro di Monod *Il caso e la necessità*, che suscita un ampio dibattito attorno al determinismo scientifico e ai principi etici legati alle scoperte scientifiche. Si apre il dibattito sull'applicabilità dei concetti e dei metodi della biologia molecolare alla medicina, agli organismi e agli ecosistemi. Come sosteneva Erwin Chargaff, sembrava che la biologia molecolare, attraverso i suoi modelli, dogmi e codici, avesse ricondotto la vita alle interazioni molecolari, trascurando questioni importanti che riguardano la salute, il benessere dell'uomo e il suo posto nell'ambiente.¹⁰

Verso l'ingegneria genetica

Nel 1969, lo stesso anno del primo sbarco dell'uomo sulla luna, il premio Nobel venne assegnato a tre ricercatori del gruppo *Phage* (Max Delbruck, Alfred Hershey e Salvador Luria) per le scoperte sul meccanismo di replicazione dei virus. In quello stesso anno, alla facoltà di medicina dell'università di Harvard, un gruppo di ricerca guidato da Jonathan Beckwith, riuscì a isolare l'operone lattosio dai tremila geni che compongono il cromosoma del batterio *Escherichia coli*.



Si confermava il modello dell'operone di Jacob e Monod, e, per la prima volta, «la scienza aveva un gene tra le mani, poteva fotografarlo con il microscopio elettronico e osservarne le interazioni chimiche con altri elementi [...] i geni erano qualcosa di più che un'astrazione, erano una cosa visibile.»¹¹

I membri del gruppo di Harvard erano consapevoli della portata rivoluzionaria della loro scoperta, per la scienza ma anche per le possibili conseguenze sul piano sociale e politico, come dimostrano le parole di un'intervista rilasciata in quell'anno al *New York Times*: «Più ragioniamo sulla nuova tecnica per isolare i geni, più ci rendiamo conto che potrebbe essere usata per purificare i geni negli organismi superiori. Non si tratta ancora di una realtà, ma non è da escludere che lo possa divenire, in tempi neppure tanto lontani. Il fatto è ancora più spaventoso se pensiamo all'uso che il governo ha fatto della scienza in Vietnam per la messa a punto di armi chimiche e biologiche.»

In soli due anni nuove tecniche di laboratorio avrebbero reso concreta la possibilità di trasferire geni da una cellula all'altra.

Questa rivoluzione si compie, a partire dagli anni Settanta, grazie alla collaborazione tra i gruppi di ricerca di diversi laboratori: *Cold Spring Harbor*, dove operava il gruppo *Phage*, il *Salk Institute for Biological Studies* di La Jolla, in California, di cui era direttore Renato Dulbecco¹², il *Beckman Center for Molecular Biology* alla *Stanford University*, di cui era direttore Paul Berg e il MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) di cui era direttore Salvador Luria e presso cui lavorava David Baltimore.

⁹F. Gros, op. cit., p. 33.

¹⁰Molti noti biologi molecolari cominciano a studiare la neurobiologia (tra essi Francis Crick) e l'embriologia degli organismi superiori (tra essi anche James Watson).

¹¹L. Thompson, op. cit., p. 62.

¹²Fondato da Jonas Salk, lo scopritore del vaccino per la poliomielite.

Berg, Baltimore e Dulbecco sono figure centrali non solo per le loro scoperte, ma anche per il ruolo sostenuto nei dibattiti scientifici e politici sull'ingegneria genetica della metà degli anni Settanta.

«GLI EUGENISTI DI FINE SECOLO AVEVANO IMMAGINATO PROSPETTIVE FANTASCIENTIFICHE DI EVOLUZIONE DELLA RAZZA UMANA BASANDOSI SU SCARSE CONOSCENZE DI GENETICA, MENTRE I BATTERIOLOGI DEGLI ANNI CINQUANTA E SESSANTA NON ERANO ANCORA RIUSCITI A TRASFERIRE GENI NELLE CELLULE DI MAMMIFERO. LADDOVE GLI UNI E GLI ALTRI AVEVANO FALLITO, ALCUNI SCIENZIATI CREDEVANO CHE LE SOLUZIONI SAREBBERO ARRIVATE DALLA BIOCHIMICA.»¹³

I passi dell'ingegneria genetica

Negli anni Cinquanta, il gruppo Phage, applicando le tecniche quantitative della fisica allo studio dei batteri e dei virus, aveva rivoluzionato l'approccio alla genetica molecolare e aveva indicato per la prima volta il modo in cui i geni possono essere trasferiti da una cellula all'altra. Contemporaneamente, al *Caltech (Californian Institute of Technology)*, Renato Dulbecco aveva messo a punto tecniche di mantenimento in coltura delle cellule eucariotiche e scoperte compiute dal suo gruppo avevano suggerito che i virus animali potessero essere utilizzati per trasferire geni nelle cellule di mammifero.

In particolare, Howard Temin, studiando il virus del sarcoma di Rous, un virus RNA che provoca il cancro nei polli, nel 1964 aveva suggerito che il virus convertisse in qualche modo i suoi geni in un prodotto intermedio di DNA che veniva integrato nei cromosomi della cellula infettata. Temin aveva scoperto i retrovirus, scoperta censurata perché violava il «dogma centrale» della biologia. Solo nel 1975, per queste ricerche, prese il Nobel insieme a Dulbecco e Baltimore.

Nel 1967, Paul Berg, docente di biochimica alla *Stanford University*, che già nel 1956 aveva scoperto l'RNA transfer, trascorse un «anno sabbatico» al *Salk Institute* con l'intenzione di acquisire tecniche utili per «trasferire i geni da una cellula all'altra a suo piacimento».

Tra i biologi molecolari del Salk c'era David Baltimore che, lavorando sul virus Rauscher della leucemia del topo (un altro retrovirus RNA), aveva scoperto un enzima che trasformava i geni virali dell'RNA in DNA e che quei geni potevano essere inseriti nel genoma della cellula infettata. Nel 1970, due articoli, uno di Temin e uno di Baltimore, sullo stesso numero di *Nature* annunciarono la scoperta dell'enzima, che sarà chiamato «transcrittasi inversa», capace di tradurre le informazioni genetiche contenute in una singola catena di RNA virale in un segmento di DNA a doppia elica.¹⁴



D. Baltimore (1938-)

Il DNA ricombinante

Nel 1968, a Stanford, Berg cominciò a lavorare su cellule e virus animali, in particolare su SV40, un virus DNA con 5000 coppie di basi, che ha la forma di un minicromosoma eucariotico. SV40 era un interessante strumento di laboratorio in quanto può prelevare porzioni di materiale genetico dalle cellule che infetta e trasferirle nel virus stesso; in alcune fasi del suo ciclo vitale può integrare in modo permanente i suoi geni nei cromosomi della cellula ospite. Berg aveva capito che SV40 poteva diventare un vettore per trasportare geni da una cellula all'altra. Nel suo laboratorio cominciarono i tentativi di produrre DNA ibrido, inserendo nel virus geni particolari appositamente isolati. Ma le difficoltà erano molte: le ricombinazioni utili potevano avvenire solo casualmente (non erano ancora stati scoperti gli enzimi di restrizione) e il trasferimento genico trasformava le cellule normali in cellule cancerose.

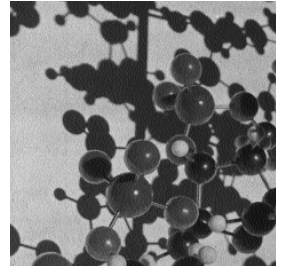
Solo tra il 1971 e il 1972 Berg, Jackson e Symons riuscirono finalmente a costruire un DNA ibrido per inserire i geni dell'operone lattosio nei cromosomi dell'SV40. L'operazione non era del tutto soddisfacente, ma realizzava per la prima volta la sintesi del DNA ricombinante.

Gli enzimi di restrizione

Nel 1965, il biologo svizzero Werner Arber, collega di Luria, dimostrò che quando il DNA virale entrava nella cellula di *Escherichia Coli* di tipo B, un enzima lo distruggeva. Per ragioni oscure, gli stessi enzimi non attaccavano i geni propri del batterio. Arber pensava che gli enzimi distruttori riconoscessero alcune particolari sequenze di coppie di basi lungo il genoma virale e che qualche altro enzima proteggesse il DNA batterico.

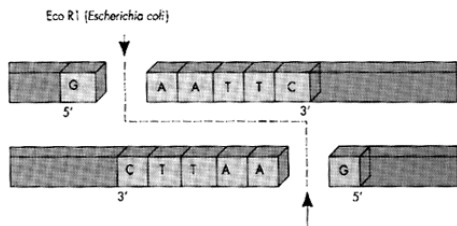
Nel 1968 Matthew Meselson e Robert Yuan, un suo studente di dottorato, scoprirono, nei batteri di *Escherichia Coli* K, una classe di enzimi, definiti di «restrizione» capaci di sminuzzare, a caso, il DNA virale iniettato dai fagi.

Nella primavera del 1968, dopo aver letto l'articolo di Meselson e Yuan, Hamilton Smith e Ken Wilcox, della *Johns Hopkins School of Medicine*, trovarono nel ceppo Rd di *Haemophilus influenzae*, *Hind II*, enzima di restrizione che distruggeva il DNA estraneo in un punto particolare del DNA virale e lo frammentava sempre in quel punto. Gli scienziati cominciarono a cercare enzimi di restrizione sempre più precisi. Daniel Nathans dimostrerà che gli enzimi possono essere impiegati per creare una specie di «mappa di restrizione» dell'SV40. Per queste ricerche gli sarà assegnato il premio Nobel nel 1978, con Arber e Smith.



¹³L. Thompson, op. cit., p. 138.

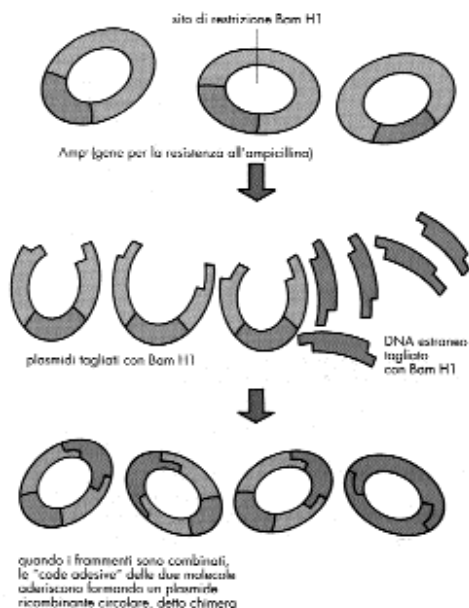
¹⁴Alcuni anni dopo, Inder Verma, un associato di Baltimore al MIT, utilizzò la trascrittasi inversa per costruire la prima porzione di DNA complementare, o cDNA, partendo dall'RNA messaggero, tecnica che sarebbe diventato un potente strumento per isolare in modo rapido i geni e studiare il genoma.



Nel 1972, un ricercatore del laboratorio di Herbert Boyer, all'università di San Francisco (California), scoprì un nuovo enzima di restrizione che venne chiamato *Eco R1* e fu distribuito a diversi laboratori per la sperimentazione. A Stanford Berg lo utilizzò sul genoma circolare di SV40 e scoprì che lo spezzava solo in un punto.¹⁵

Janet Mertz, una collaboratrice di Berg, notò che l'enzima sembrava lasciare automaticamente estremità coesive sul DNA lineare che rimaneva dopo il suo passaggio. Questa osservazione ebbe conseguenze importanti sullo sviluppo dell'ingegneria genetica. Infatti, il gruppo di Boyer riuscì a dimostrare che qualsiasi segmento di DNA venisse tagliato dall'enzima, rimaneva dotato di estremità coesive. In pratica, due parti qualsiasi di DNA potevano essere unite tra loro, tagliandole prima con *Eco R1* e poi mescolandole insieme. In breve, il nuovo enzima poteva fare in pochi minuti quello che Berg e i suoi collaboratori tentavano di fare da anni. E si potevano creare anche combinazioni geniche non esistenti in natura. Mancava però una tecnica per riprodurre i segmenti isolati di DNA che ora si potevano ricombinare a piacere. Era necessario imparare a clonare i geni ricombinanti.

I plasmidi e la clonazione dei geni



Stanley Cohen¹⁶, dell'Università di Stanford, era un esperto di plasmidi, piccoli anelli di DNA che possono vivere indipendentemente all'interno dei batteri ospiti e aveva sviluppato un sistema per estrarre e reintrodurre facilmente i plasmidi nei batteri.

Nel novembre 1972, durante una conferenza sui plasmidi che si teneva alle Hawaii, Cohen sentì Boyer parlare di *Eco R1* e si rese conto che se con quell'enzima avesse tagliato prima i plasmidi e poi un segmento di DNA (preso da una cellula qualsiasi) avrebbe potuto attaccare il segmento estraneo di DNA ai suoi plasmidi e reinserire l'intero bagaglio genetico nel batterio. Il batterio, riproducendosi, avrebbe prodotto milioni di copie del gene.

I laboratori di Boyer e di Cohen cominciarono a collaborare e, nel marzo 1973, riuscirono a clonare i geni.

La tecnica messa a punto rendeva possibile a qualunque laboratorio l'assemblaggio di molecole di DNA ibrido.

Il dibattito degli anni Settanta

All'inizio degli anni Settanta comincia il dibattito pubblico sulla manipolazione dei geni che coinvolge, in prima battuta, il mondo scientifico. La maggioranza dei ricercatori concentra la propria attenzione sul rischio biologico per gli sperimentatori.

Per esempio, Robert Pollack, che lavorava con gli enzimi di restrizione sull'SV40 a *Cold Spring Harbor* temeva i rischi che comportava l'inserimento di geni di un virus cancerogeno in un batterio che vive nell'intestino umano. Tra i contrari c'era anche Baltimore. Leon Kass, un biologo molecolare che sarebbe diventato bioetico, il 30 ottobre 1970 scrisse una lettera a Berg ripercorrendo le questioni etiche sui rischi e benefici della tecnologia di trasferimento dei geni, ma allo stesso tempo relativizzandoli in quanto simili ai dubbi sollevati da qualunque terapia medica innovativa. Questioni più spinose riguardavano il fine per cui poteva essere usato il trasferimento genico. Questa prima fase del dibattito ebbe come conseguenza una moratoria negli esperimenti: Berg scelse di non inserire i geni di SV40 in nessuna cellula, ma il suo gruppo continuò a lavorare sulle tecniche di costruzione dell'ibrido.

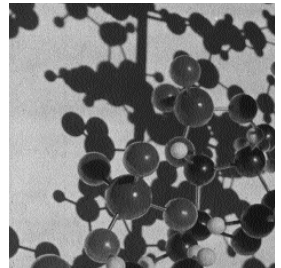
Alla fine del 1972, Berg prese l'iniziativa di convocare a congresso i maggiori esperti mondiali del settore degli esperimenti virali. La conferenza concluse che bisognava condurre studi epidemiologici che accertassero l'effettiva presenza del pericolo e decise di riconvocarsi dopo due anni. Ma gli eventi si susseguirono velocemente e la comunità scientifica perse il controllo della questione.

Nel giugno 1973, alla *Gordon Conference* sugli acidi nucleici, Herbert Boyer descrisse gli esperimenti eseguiti con Cohen sulle nuove modalità di inserimento del DNA nei batteri. Alcuni scienziati vollero discutere i rischi di questa nuova tecnologia e chiesero tra l'altro la costituzione di una commissione di studio sul rischio biologico legato alle ricerche sul DNA ricombinante. Il documento che esponeva le loro preoccupazioni venne pubblicato sulla rivista *Science*, ma le reazioni dell'opinione pubblica furono scarse.

Paul Berg venne messo a capo della commissione istituita dall'Accademia delle Scienze, di cui facevano parte anche James Watson, Daniel Nathans e David Baltimore.

La commissione chiese agli scienziati di osservare una specie di moratoria volontaria per alcuni generi di esperimenti, almeno finché non fosse stato indetto un convegno internazionale per discutere i pericoli di tale pratica. Venne pubblicata una seconda lettera su *Science* e a questo punto il dibattito sul rischio biologico divenne di pubblico dominio.

Tra gli scienziati, il premio Nobel George Wald parlò contro l'ingegneria genetica; Jonathan Beckwith continuò a comunicare la sua



¹⁵D. Nathans dimostrò come gli enzimi potessero essere usati per indicare le posizioni relative dei punti in cui gli enzimi tagliano il cromosoma circolare del virus SV40 e aiutano a identificare i singoli geni all'interno dei vari frammenti.

¹⁶S. Cohen prenderà il Nobel nel 1986, insieme a Rita Levi-Montalcini, per le ricerche compiute sul sistema nervoso.

preoccupazione per lo sviluppo di programmi di governo relativi alla manipolazione genetica dell'uomo. Anche i ricercatori di genetica molecolare esortarono i genetisti a prendere sul serio queste preoccupazioni. Molti scrittori, commentatori e anche alcuni scienziati paragonarono l'acquisita capacità di manipolare i geni alla creazione della bomba atomica.

Nel 1975, il «Congresso di Asilomar» riunì i maggiori esperti mondiali per valutare i rischi noti e decidere una linea di condotta. Più di 150 ricercatori provenienti da tredici paesi e sedici giornalisti si trovarono a Pacific Grove: progettisti di plasmidi, ingegneri di fagi e virologi ebbero molte difficoltà a trovare un accordo. Molti pensavano che i timori dei rischi fossero esagerati. Watson, che pure aveva firmato la richiesta di moratoria, aveva cambiato idea e sulle sue posizioni si schierò anche Joshua Lederberg; altri, come il gruppo di Wald, chiedevano controlli ancora più severi.



L'ingresso al centro congressi di Asilomar

In realtà, i dati sui rischi ridimensionarono le preoccupazioni: sembrava che *Escherichia coli* di tipo K12 fosse abbastanza sicuro. Sidney Brenner propose di costruire batteri fragili, incapaci di vivere fuori dal laboratorio in modo da non diffondere nell'ambiente eventuali malattie: il controllo biologico era la soluzione, sia biologica che politica.

Asilomar fu un evento determinante nell'evolu-

zione dell'ingegneria genetica: pose le basi per regolamentare la ricerca genetica tracciando linee guida che decretavano quali esperimenti fossero vietati e quali permessi. Dalla fine della seconda guerra mondiale per la prima volta gli scienziati cercavano di non perdere il controllo di una tecnologia emergente. In ogni caso, come dice Gros:

«IL MONDO CAPISCE CHE È NATA UNA TECNOLOGIA MODERNA, AL TEMPO STESSO MOTORE E PRODOTTO DELLE SCIENZE BIOLOGICHE DA CUI È POSSIBILE ASPETTARSI IMPORTANTI CONSEGUENZE PRATICHE, SE NON ADDIRITTURA RIVOLUZIONARIE, NEL CAMPO DELLA SANITÀ PUBBLICA, DELL'AGRICOLTURA, DELL'ALLEVAMENTO, DELLA PRODUZIONE ENERGETICA, DELLA CHIMICA E DELL'AMBIENTE. LA BIOLOGIA DIVIENE, IN MODO PIÙ CHE PALESE, UNA SCIENZA D'INTERVENTO.»

v