

ConoScienza



Nbt, oltre la propaganda

Questo articolo è un estratto dal documento “Costruire il futuro: curare la biodiversità agricola e naturale” scritto da un gruppo di persone perché fosse parte integrante del progetto “Biodiversità e sementi contadine”, presentato alla Regione Emilia-Romagna dalla Rete per la Sovranità Alimentare e dal CRESER (Coordinamento Regionale per l’Economia Solidale in Emilia-Romagna)

(Nota: il link di questo documento sarà disponibile nel sito della rete per la Sovranità Alimentare, attualmente in costruzione, i numeri progressivi che compaiono fra parentesi a fianco delle voci bibliografiche sono relativi alla bibliografia del documento originale che potete trovare nel blog nuovabiologia.it <https://nuovabiologia.it/nbt-oltre-la-propaganda/>).

I NUOVI OGM, OVVERO IL LATO OSCURO DELLE NUOVE TECNICHE DI EDITING

Nel 2012, due ricercatrici (recentemente insignite del Nobel per la loro scoperta) trovarono che il sistema chiamato CRISPR-Cas9, con cui i batteri si difendono dalle invasioni dei loro virus tagliandone a pezzi il DNA, poteva costituire un sistema universale di editing (modifica) del DNA. Queste tecniche sono

dette *gene* (o *genome*) editing e spesso abbreviate in nbt, *new breeding techniques*.

Uno dei vantaggi riconosciuti delle tecniche di editing è che la modificazione può avvenire **entro specie**, ovvero nel DNA dell’organismo che si intende modificare **non vengono inseriti** (almeno in teoria) **elementi genetici** di origine estranea, cioè **provenienti da una specie diversa**. (Per questo motivo l’editing è indicato come una tecnica di *cisgenesi* e non di *transgenesi*, come nei vecchi OGM.)

Nel manifesto “Prima i geni – Liberiamo il futuro dell’agricoltura” (49: SIGA, 2017) della Società Italiana di Genetica Agraria (tra i principali fautori di un approccio biotecnologico alla soluzione dei problemi in agricoltura), si enfatizza l’assoluta precisione di questo metodo: “(p. 15), perché riesce a cambiare solo il tratto di DNA da migliorare e nessun altro... e senza introdurre DNA estraneo (come negli OGM o nelle ibridazioni fra specie diverse)... (p. 25) In pratica, il sistema CRISPR-cas9 è un ‘bisturi’ molecolare estremamente preciso... Con il *genome editing* si produce solo la mutazione voluta, senza ottenerne anche molte altre, indesiderate e distribuite casualmente nell’intero genoma.”

Questa fiducia nella totale precisione e prevedibilità dello strumento porta la SIGA a formulare un appello (p. 15 del manifesto citato) perché i prodotti di queste nuove tecnologie di editing siano sottratti alla regolamentazione degli OGM e immessi in commercio senza alcun particolare controllo pre- e post-mercato. Diventa quindi necessario, per evitare potenziali rischi per l'ambiente e le persone, approfondire la questione della *precisione* di queste nuove tecniche.

NBT CON IMPIEGO DI VETTORI

Iniziamo con l'indagare la tecnica utilizzata in maniera predominante fino a non molto tempo fa, cioè **l'editing mediato da vettori**. In questa tecnica, per entrare nelle cellule e agire, le due componenti CRISPR e Cas9 devono essere 'montate' su vettori, in genere molecole circolari di DNA derivate da batteri (dette plasmidi) o da virus ingegnerizzati. Numerosi studi hanno evidenziato **effetti non voluti** di questa tecnologia, che possono essere distinti in:

Effetti "off-target", cioè fuori bersaglio, in quanto avvengono in punti del genoma diversi da quello che si intende modificare, spesso anche distanti. Il problema di queste mutazioni non volute è che potenzialmente possono portare alla produzione di tossine e allergeni, ovvero composti nocivi alla salute e all'ambiente.

Effetti "on-target" (sul bersaglio) **non voluti**, perché la tecnica produce a volte effetti imprevisti anche a livello della sequenza bersaglio su cui si interviene con l'editing.

Creazione di OGM in senso classico, ovvero di **organismi transgenici**, in seguito all'incorporazione, nel DNA dell'organismo editato, dell'intero vettore (o suoi

Secondo gli autori il danno genomico causato dall'editing con CRISPR-Cas9 "può avere conseguenze patogene".

frammenti) che ha trasportato le componenti dell'editing dentro le cellule.

Poiché tali vettori sono di origine batterica o virale, la loro integrazione nel DNA dell'organismo editato fa di esso un OGM secondo la definizione standard.

VEDIAMO ALCUNI ESEMPI DI QUESTI TRE DIVERSI CASI

Effetti off-target dell'editing, molti lavori hanno trovato il verificarsi di mutazioni off-target nei DNA editati (per le cellule animali vedere p.e. 50: Skryabin *et al.*, 2020; per le piante, p.e., 51: Zhang *et al.*, 2018; 52: Hahn e Nekrasov, 2019). In generale, gli effetti off-target dell'editing sono definiti un problema non eliminabile.

Purtroppo si tratta di inserzioni e delezioni di basi del DNA, o anche di riarrangiamenti di lunghi tratti, **ovvero di mutazioni le cui potenziali conseguenze sull'ambiente e sulle persone dovrebbero essere individuate, studiate e valutate.**

Ciò detto, è piuttosto preoccupante quanto è emerso da un lavoro svolto da ricercatori dell'istituto federale tedesco di Biosicurezza delle biotecnologie vegetali (53: Modrzejewski, Hartung *et al.* 2019). Sondando i maggiori database scientifici, hanno trovato che solo nel 22% degli studi di editing delle piante condotti con CRISPR-Cas9 si è proceduto a un'approfondita analisi delle possibili mutazioni fuori bersaglio, non volute, nel DNA editato. Ovvio concludere che, se non le si cerca, certo di queste mutazioni poi non si trova traccia.

Effetti on-target non voluti dell'editing, un lavoro pubblicato su *Nature Biotechnology* (54: Kosicki *et al.*, 2018) ha trovato importanti mutazioni non volute nel sito bersaglio dell'editing con CRISPR-Cas9, in esperimenti con cellule di

topo e cellule umane. Secondo gli autori il danno genomico causato dall'editing con CRISPR-Cas9 "può avere conseguenze patogene".

In un altro importante lavoro pubblicato su *Nature Methods* (55: Smits *et al.*, 2019) i ricercatori hanno verificato se il gene bersaglio dell'editing con CRISPR-Cas9 viene davvero messo fuori uso (*knock out* genico) dalla manipolazione genetica, come in molti esperimenti di editing i ricercatori si prefiggono. In altre parole, si è valutato se davvero il gene bersaglio dell'editing cessa di produrre la sua solita proteina.

Lavorando su cellule umane coltivate, gli autori hanno trovato che **in circa un terzo** dei siti bersaglio editati con CRISPR-Cas9 la produzione e l'attività della rispettiva proteina si manteneva a livelli praticamente normali.

Spesso il taglio prodotto da Cas9 aveva dato origine a mutazioni, che portavano alla sintesi di proteine anomale, i cui effetti a breve e a lungo termine restano ignoti.

Anche se ottenuti su cellule animali, questi risultati, del tutto inattesi, sono di speciale importanza anche per l'editing delle piante. Alla luce del fatto che, come emerge dal lavoro citato in precedenza (53), **ben l'87% degli esperimenti di editing delle piante ha come scopo il knock out di un particolare gene**, è essenziale che anche negli esperimenti di editing delle piante si controlli l'eventuale funzionalità residua della proteina bersaglio, ma tale verifica non è MAI stata fatta.

Inserimenti non voluti di DNA estraneo, nati senza corna da un bovino editato nel 2013, questi vitelli sono stati propagandati come la dimostrazione vivente dei prodigi dell'editing. Ma nel 2019 la FDA (Food and Drug Administration) esaminandone (56: Norris *et al.*,

La FDA ha deciso nel 2020 che gli animali editati e i loro prodotti, devono essere sottoposti ad approfondite analisi pre-mercato e saranno soggetti alla stessa regolamentazione dei nuovi farmaci

2020) il DNA con analisi più approfondite di quelle standard, ha trovato che nel loro DNA, oltre alla versione editata del gene per l'assenza di corna, c'era anche il DNA dell'intero vettore (un plasmide batterico) usato per l'editing. Dal bovino inizialmente editato, il vettore si era trasmesso intero a tutta la sua discendenza. Essendo il vettore plasmidico composto da DNA di varie specie batteriche, compresi anche geni per la resistenza ad antibiotici (di cui sarebbe bene limitare la diffusione), questi vitelli ricadono palesemente nella definizione classica di OGM. Sulla base di questi risultati la FDA, che negli USA autorizza i nuovi farmaci e alimenti, ha deciso nel 2020 che gli animali editati, e i loro prodotti, devono essere sottoposti ad approfondite analisi pre-mercato e saranno quindi soggetti alla stessa regolamentazione dei nuovi farmaci.

Questa decisione ha scatenato numerose polemiche, soprattutto da parte del Dipartimento dell'Agricoltura (USDA), a cui spetta di autorizzare i prodotti dell'editing di piante, per il quale gli **organismi vegetali editati** non devono essere sottoposti ad alcuna particolare regolamentazione.

In un articolo pubblicato da *Nature* (57: Banakar *et al.*, 2019), si riportano i risultati di un esperimento di editing di un gene del riso, applicando il sistema CRISPR-Cas9 con metodiche che utilizzano **vettori di origine batterica**, alcuni contenenti geni batterici di resistenza ad antibiotici o a erbicidi, usati per la selezione delle cellule modificate. Ogni vettore è un mosaico di elementi genetici da diverse specie, non solo batteriche. Gli autori hanno trovato nei siti bersaglio di Cas9 **inserimenti inattesi di DNA dei vettori batterici e riarrangiamenti del**

DNA frammentato del riso: di nuovo un organismo transgenico, cioè un OGM in senso classico.

NBT DNA-FREE, CIOÈ SENZA IMPIEGO DI VETTORI

Consapevoli del fatto che le nbt comportano un elevato rischio di integrazione del vettore nel DNA dell'organismo editato (con conseguente alto rischio di ricadere nelle regolamentazioni europee sugli OGM), molti ricercatori si stanno sempre più spesso rivolgendo a un metodo di **editing genetico** delle piante detto **DNA-free**, in quanto non prevede l'utilizzo di vettori. Le componenti del sistema CRISPR-Cas9 sono sintetizzate in vitro e vengono poi veicolate già pronte dentro protoplasti di cellule vegetali, per mezzo di nanoparticelle o tramite l'infusione in una soluzione di glicole polietilenico (PEG).

In un'ampia rassegna di lavori sulle nuove tecniche di editing (58: Agapito-Tenfen *et al.*, 2018), gli autori riscontrano che il non utilizzo di vettori, se da un lato elimina il problema dell'integrazione di DNA estraneo, non elimina però quello della formazione di **mutazioni non volute on- e off-target**. Tali effetti non sono prevedibili data l'ignoranza che ancora perdura su molti aspetti dell'azione del sistema CRISPR-Cas9 e sulle sue interazioni con le strutture cellulari. Quindi neppure questo metodo di editing consente di escludere l'imprevista produzione di tossine, anti-nutrienti e allergeni, che costituiscono un rischio per l'ambiente e la salute umana o animale.

In un recente lavoro (64: Ribeiro Arnt Sant'Ana *et al.*, 2020) sull'editing del mais con CRISPR-Cas9 metodo DNA-free, gli autori concludono: "Sebbene la nostra piattaforma non utilizzi DNA esogeno evitando così un potenziale rischio di integrazione, non si può

Non si può escludere che micromologie [del DNA del mais] con sequenze del gRNA [CRISPR] producano tagli spuri o grandi riarrangiamenti genomici

escludere che micromologie [del DNA del mais] con sequenze del gRNA [CRISPR] producano tagli spuri o grandi riarrangiamenti genomici".

IN CONCLUSIONE: la tecnica dell'editing genetico è ancora in fase sperimentale ed è più che giustificato, dal punto di vista scientifico, attenersi al principio di precauzione nei riguardi delle sue possibili applicazioni pratiche o addirittura commerciali.

Quindi ha solide basi scientifiche il giudizio espresso il 25 luglio 2018 dalla Corte europea di giustizia (65: sentenza Corte europea di giustizia, 2018), la quale ha sentenziato che anche gli organismi ottenuti con le nuove tecniche di editing genomico debbano essere considerati geneticamente modificati (OGM) e in quanto tali soggetti alla direttiva europea 2001/18/CE.

La sentenza della Corte europea giustamente sposta l'attenzione dalla definizione di OGM come organismo transgenico e dal prodotto finale della modificazione, per focalizzarla sui **processi di laboratorio** con cui questi prodotti sono ottenuti.

Infatti tali modifiche genetiche sono mediate da complicate procedure tecnologiche, niente affatto "naturali" come le si pretende. Perciò queste tecniche sono ampiamente esposte al rischio di effetti imprevedibili e nocivi per l'ambiente e la salute umana. I loro prodotti necessitano quindi di una stretta sorveglianza prima di autorizzarne l'eventuale commercializzazione.

Estratto da
"Costruire il futuro: curare la biodiversità agricola e naturale"