CAPITOLO

13

Le biotecnologie e le loro applicazioni

Un gene è un'istruzione: scritta per una cellula, si può leggere anche in un'altra. Il difficile non è farlo, ma decidere quando è giusto.

OBIETTIVI

1. Distinguere biotecnologie tradizionali e moderne, OGM e organismi transgenici.
2. Spiegare come si producono proteine ricombinanti, vaccini ricombinanti e a mRNA e anticorpi umanizzati.
3. Descrivere la terapia genica ex vivo e in vivo, le cellule CAR-T e l'uso terapeutico delle cellule staminali.
4. Leggere un profilo STR, calcolare una probabilità di coincidenza casuale e risolvere un test di paternità.
5. Spiegare come si ottiene una pianta transgenica e valutare benefici, rischi e regole degli OGM e delle NGT.
6. Descrivere la clonazione per trasferimento nucleare e discutere le questioni bioetiche distinguendo fatti e valori.

INDICE DEL CAPITOLO

13.1 Le biotecnologie, antiche e moderne 2
13.2 Le biotecnologie mediche 3
13.3 La terapia genica e cellulare 8
13.4 Le biotecnologie forensi 10
13.5 Le biotecnologie in agricoltura, nell'industria e nell'ambiente 13
13.6 Animali modificati, clonazione e bioetica 16

Scienze naturali 5 · Parte III · Le biotecnologie · versione 1.0
Capitolo 13: Le biotecnologie e le loro applicazioni · pagine 351–376 del volume completo · estratto per lo studio

Chi ha il diabete di tipo 1 si inietta ogni giorno un'insulina identica a quella umana, prodotta da batteri o da lieviti. Un bambino nato senza difese immunitarie può guarire grazie alle proprie cellule del midollo, corrette in laboratorio con un virus. Una traccia di sangue di pochi millimetri può scagionare un innocente. Un mais produce da sé la proteina che uccide il suo principale insetto parassita, e in quasi tutta Italia non si può coltivare. Sono tutte **biotecnologie**: l'uso di organismi viventi, di loro parti o di loro molecole per ottenere prodotti e servizi utili.

Nel capitolo 12 hai studiato gli strumenti: enzimi di restrizione, vettori, PCR, sequenziamento, CRISPR. Qui vediamo che cosa se ne fa, in medicina, nella giustizia, in agricoltura, nell'industria e nell'ambiente, e quali domande pongono. Su molti di questi temi la discussione pubblica è accesa: per orientarsi bisogna tenere distinte le domande che la scienza può risolvere con i dati da quelle che dipendono da valori e da scelte politiche.

13.1 Le biotecnologie, antiche e moderne

Le biotecnologie sono molto più antiche della parola. Da millenni l'uomo usa lieviti per fare il pane e il vino e batteri lattici per lo yogurt e il formaggio (sono le fermentazioni del capitolo 9), e con la **selezione artificiale** ha trasformato il teosinte in mais e il lupo in cane, scegliendo come genitori gli individui con le caratteristiche desiderate. In questi casi però si lavora con il patrimonio genetico che c'è, mescolato a ogni generazione dalla riproduzione sessuata.

Le biotecnologie moderne nascono negli anni Settanta del Novecento con il DNA ricombinante, cioè con la possibilità di trasferire un gene preciso da un organismo a un altro, anche di specie lontanissime (vedi il capitolo 12). Un organismo il cui materiale genetico è stato modificato in un modo che non avviene in natura con l'accoppiamento o la ricombinazione naturale si chiama **OGM**, organismo geneticamente modificato: è la definizione della normativa europea (direttiva 2001/18/CE). Se il gene introdotto proviene da un'altra specie si parla di organismo **transgenico**, e il gene si chiama transgene.

DA RICORDARE

Richiamo · Gli strumenti. Un *vettore* (plasmide o virus) trasporta un gene in una cellula ospite; il gene si ottiene come cDNA, copiando un mRNA con la trascrittasi inversa, oppure si sintetizza; la PCR lo amplifica; l'elettroforesi separa i frammenti di DNA secondo la lunghezza; CRISPR-Cas9 taglia il DNA in un punto scelto (vedi il capitolo 12). Le cellule staminali e le iPS sono in *Scienze naturali 3*, cap. 15; gli anticorpi monoclonali e i vaccini in *Scienze naturali 4*, cap. 10.

Per orientarsi in un campo così vasto si usa spesso una convenzione a colori: biotecnologie **rosse** per la medicina, **verdi** per l'agricoltura, **bianche** per l'industria, **blu** per quelle che usano organismi marini e **grigie** per l'ambiente. È soltanto un modo di classificare, non una regola: lo stesso enzima può servire a un farmaco e a un detersivo, e molte applicazioni stanno a cavallo di due colori.

13.2 Le biotecnologie mediche

13.2.1 Le proteine ricombinanti

Fino agli anni Ottanta l'insulina per i diabetici si estraeva dal pancreas di bovini e suini macellati; l'ormone della crescita, dall'ipofisi di persone decedute. Erano farmaci scarsi, non identici alla proteina umana e, nel caso dell'ormone della crescita, a rischio di trasmettere malattie. La soluzione fu far produrre la proteina umana a un microrganismo. La sequenza che codifica la proinsulina (o le due catene separate, nei primi processi) si inserisce in un vettore di espressione, cioè un plasmide con un promotore forte, e si introduce in *Escherichia coli* o in un lievito; i microrganismi crescono in grandi fermentatori, la proteina si purifica e, con enzimi, si taglia nella forma attiva (Figura 13.1). Nell'ottobre 1982 la Food and Drug Administration statunitense (FDA) approvò l'insulina umana ricombinante prodotta da Eli Lilly su un processo sviluppato da Genentech: fu il primo farmaco ottenuto con il DNA ricombinante. Una **proteina ricombinante** è appunto una proteina prodotta da una cellula ospite a partire da un gene introdotto con le tecniche del DNA ricombinante.

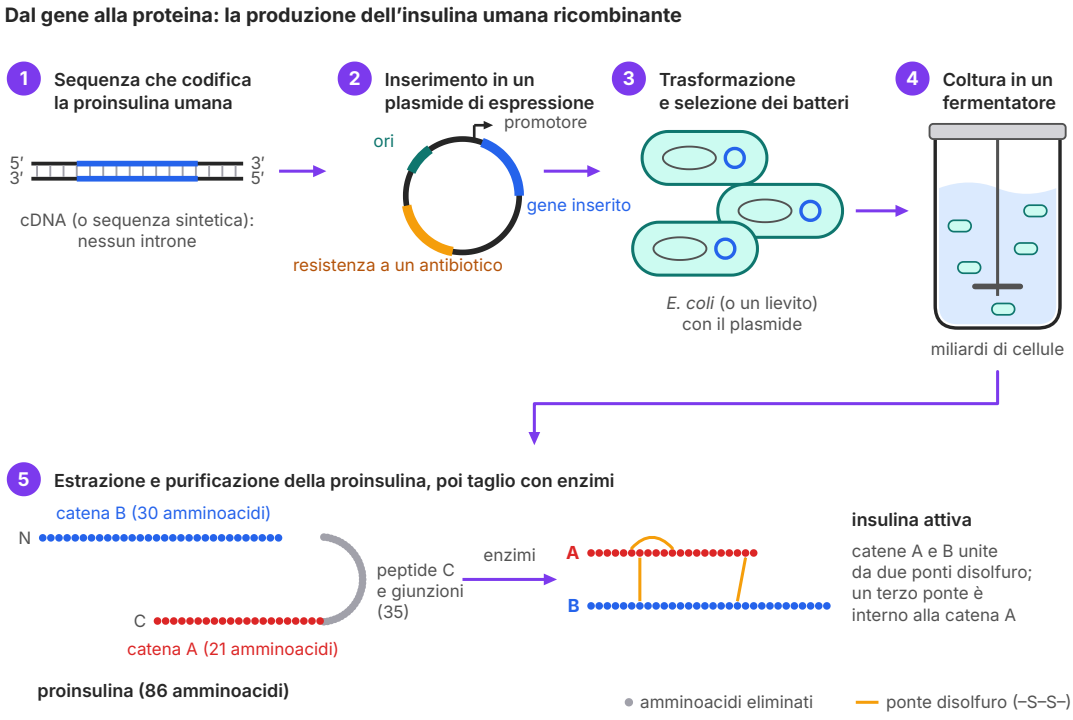

Figura 13.1 La produzione dell'insulina umana ricombinante (schema non in scala). La sequenza della proinsulina, priva di introni, è inserita in un plasmide di espressione; i batteri trasformati sono selezionati con l'antibiotico e coltivati in un fermentatore. Dalla proinsulina purificata gli enzimi rimuovono il peptide C e quattro amminoacidi di giunzione: restano la catena A (21 amminoacidi) e la catena B (30), unite da due ponti disolfuro (A7–B7 e A20–B19), con un terzo ponte fra A6 e A11. Oggi si usano processi diversi, con batteri o con lieviti.

ESEMPIO SVOLTO

Quanto è lungo il gene da inserire? La proinsulina umana è formata da 86 amminoacidi. a) Quanti nucleotidi servono, come minimo, per codificarla? b) Per farla produrre a *E. coli* si aggiunge in testa un codone d'inizio AUG e in coda un codone di stop: quanto diventa lunga la sequenza codificante? c) Il gene umano dell'insulina contiene due introni: perché nel batterio non si può inserire il gene preso dal genoma?

Soluzione. a) Ogni amminoacido è codificato da una tripletta: 86 × 3 = 258 nucleotidi. b) Si aggiungono due codoni: (86 + 2) × 3 = 264 nucleotidi, cioè 264 bp nel DNA a doppio filamento. c) I batteri non hanno lo spliceosoma e non rimuovono gli introni: tradurrebbero anche le sequenze introniche, ottenendo una proteina sbagliata. Per questo si usa un cDNA, copiato dall'mRNA maturo, oppure una sequenza sintetica (vedi il capitolo 12).

Non tutte le proteine si possono fare in un batterio. Molte proteine umane, nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi, ricevono catene di zuccheri (sono glicoproteine) o devono ripiegarsi con l'aiuto di chaperoni che i batteri non hanno. Per queste si usano cellule di mammifero in coltura, per esempio le cellule CHO, derivate dall'ovaio di criceto cinese; sono più lente e costose, ma producono la proteina nella forma corretta (Tabella 13.1).

Tabella 13.1 Alcune proteine ricombinanti di uso medico o alimentare e le cellule ospiti in cui sono prodotte.

Proteina	Uso	Cellula ospite
insulina umana	diabete	*E. coli* o lievito (*Saccharomyces cerevisiae*)
ormone della crescita (somatotropina)	deficit di crescita	*E. coli*
antigene di superficie del virus dell'epatite B	vaccino	lievito
eritropoietina (EPO), glicoproteina	anemia da insufficienza renale	cellule di mammifero (CHO)
fattore VIII della coagulazione	emofilia A	cellule di mammifero
anticorpi monoclonali	tumori, malattie autoimmuni	cellule di mammifero (CHO)
chimosina (caglio)	produzione dei formaggi	funghi, lieviti o batteri

13.2.2 I vaccini ricombinanti e i vaccini a mRNA

Anche i vaccini a subunità che hai incontrato in *Scienze naturali 4* (cap. 10) sono figli del DNA ricombinante. Il vaccino contro l'epatite B contiene la sola proteina di superficie del virus, prodotta da un lievito in cui è stato inserito il gene corrispondente: autorizzato negli Stati Uniti nel 1986, fu il primo vaccino ricombinante. Nel vaccino non c'è alcun virus, né intero né in frammenti di genoma.

I **vaccini a mRNA** fanno un passo in più: invece della proteina portano le istruzioni per produrla (Figura 13.2). L'mRNA si ottiene senza cellule, per trascrizione in provetta da uno stampo di DNA, e al posto dell'uridina contiene un nucleoside modificato che lo rende meno infiammatorio e ne aumenta la traduzione (è la scoperta per cui Katalin Karikó e Drew Weissman hanno ricevuto il Nobel nel 2023). L'mRNA nudo verrebbe degradato rapidamente dagli enzimi e non attraverserebbe la membrana: per questo è racchiuso in **nanoparticelle lipidiche**, un biomateriale che hai studiato nel capitolo 6. Le cellule le inglobano per endocitosi, l'mRNA passa nel citoplasma e i ribosomi lo traducono nella proteina del virus, che il sistema immunitario impara a riconoscere. Il principio è lo stesso dei vaccini a subunità; cambia il luogo in cui la proteina viene fabbricata, cioè le nostre cellule invece del fermentatore. Il vantaggio principale è la velo-
-

cità: cambiare l'antigene significa cambiare una sequenza, non mettere a punto un nuovo processo produttivo.

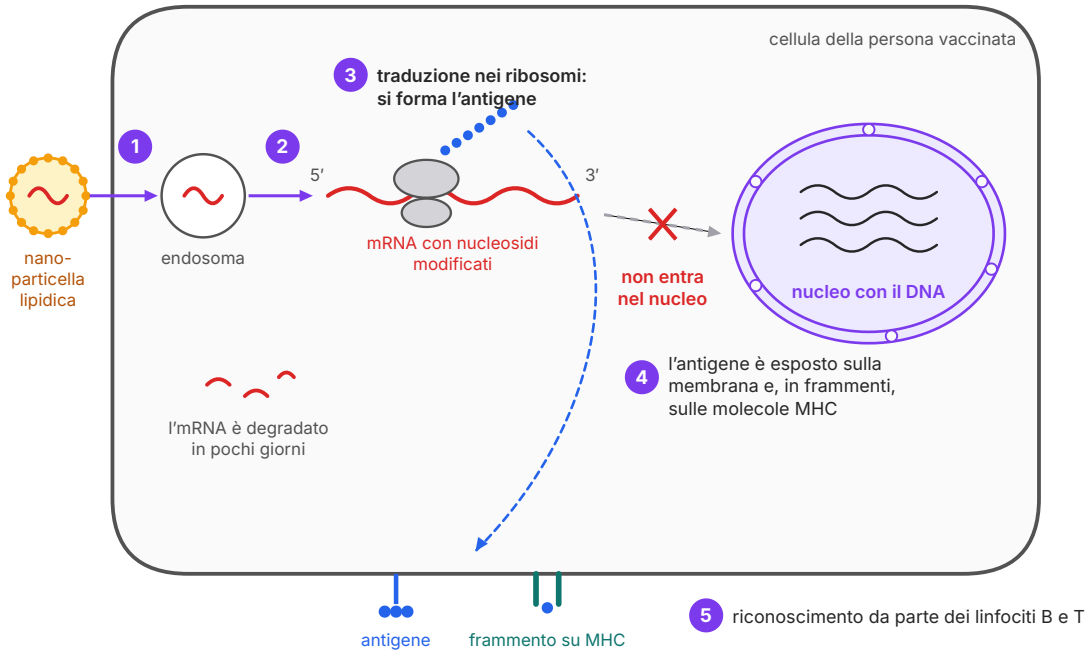

Figura 13.2 Come funziona un vaccino a mRNA (schema non in scala). 1: la nanoparticella lipidica è inglobata per endocitosi; 2: l'mRNA esce dall'endosoma nel citoplasma; 3: i ribosomi lo traducono nella proteina dell'agente infettivo; 4: la proteina è esposta sulla membrana e, in frammenti, sulle molecole MHC; 5: linfociti B e T la riconoscono e si forma la memoria immunitaria. L'mRNA non entra nel nucleo ed è degradato in pochi giorni.

ERRORE FREQUENTE

«Il vaccino a mRNA modifica il nostro DNA». Perché un RNA modifichi il DNA dovrebbe essere ricopiato in DNA da una trascrittasi inversa, entrare nel nucleo e integrarsi in un cromosoma. L'mRNA del vaccino resta nel citoplasma, non porta con sé alcuna trascrittasi inversa, non ha le sequenze che servono a un retrovirus per integrarsi e viene demolito in pochi giorni, come i nostri mRNA. Diverso è il caso dei **vaccini a vettore virale**, che usano un adenovirus reso incapace di replicarsi per portare il gene dell'antigene: qui il DNA entra nel nucleo, ma l'adenovirus non ha un meccanismo per integrarsi nei cromosomi: il suo DNA resta separato e viene eliminato.

13.2.3 Gli anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali dei primi anni (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 10) erano anticorpi di topo: iniettati più volte in una persona, venivano riconosciuti come estranei e neutralizzati. Le biotecnologie hanno permesso di «umanizzarli». Negli anticorpi **chimerici** si uniscono le regioni variabili del topo alle regioni costanti umane; negli **anticorpi umanizzati** del topo restano soltanto i brevi tratti che toccano l'antigene; gli anticorpi **interamente umani** si ottengono da topi transgenici con i geni umani delle immunoglobuline o con il *phage display*, una tecnica che seleziona gli anticorpi da enormi raccolte esposte sulla superficie di fagi (Gregory Winter, Nobel per la chimica 2018). Gli anticorpi si producono poi in cellule di mammifero (Tabella 13.1).

Oggi gli anticorpi monoclonali sono una delle classi di farmaci più importanti. Contro alcuni tumori si legano a una proteina che le cellule tumorali espongono in eccesso, per esempio un recettore per un fattore di crescita, e la bloccano o segnalano la cellula al sistema immunitario; altri, gli inibitori dei «checkpoint» immunitari, tolgono i freni con cui i linfociti T vengono spenti, così che riconoscano il tumore. Nelle malattie autoimmuni, come l'artrite reumatoide, altri anticorpi neutralizzano le citochine dell'infiammazione.

13.2.4 Diagnosi e farmacogenomica

Le biotecnologie hanno trasformato anche la diagnosi. I test molecolari cercano direttamente il genoma di un patogeno con la PCR, come i test per SARS-CoV-2 (vedi il capitolo 12). I **test genetici** cercano mutazioni responsabili di malattie ereditarie, per esempio nel gene *CFTR* della fibrosi cistica, e permettono di individuare i portatori sani. In gravidanza, il DNA fetale che circola nel sangue materno consente test di screening non invasivi per alcune anomalie cromosomiche; un risultato positivo va però confermato con una diagnosi prenatale come l'amniocentesi o la villocentesi.

Persone diverse rispondono in modo diverso allo stesso farmaco, e parte della differenza è scritta nel DNA: varianti degli enzimi che metabolizzano un farmaco lo fanno eliminare troppo in fretta o troppo lentamente; varianti delle molecole del sistema immunitario possono scatenare reazioni gravi. La **farmacogenomica** studia queste relazioni per scegliere il farmaco e la dose adatti al genotipo del paziente. Un esempio entrato nella pratica: prima di prescrivere l'abacavir, un farmaco contro l'HIV, si verifica che il paziente non porti la variante HLA-B*57:01, associata a una reazione di ipersensibilità che può essere grave.

13.3 La terapia genica e cellulare

13.3.1 Correggere i geni

Se una malattia dipende da un gene che non funziona, la soluzione più diretta è dare alle cellule una copia funzionante. È l'idea della **terapia genica**: l'introduzione di materiale genetico nelle cellule di un paziente a scopo terapeutico. Si lavora sulle **cellule somatiche**, quindi la modifica riguarda solo il paziente e non passa ai figli. Esistono due strategie. Nella terapia **ex vivo** si prelevano cellule dal paziente, le si corregge in laboratorio e le si reinfonde; nella terapia **in vivo** il vettore, di solito un virus adeno-associato (AAV) privato dei suoi geni, è iniettato direttamente nell'organismo o nel tessuto bersaglio, per esempio sotto la retina in una forma ereditaria di cecità. I vettori AAV sono poco immunogeni, ma possono trasportare al massimo circa 4,7 kb di DNA: per un gene grande non bastano.

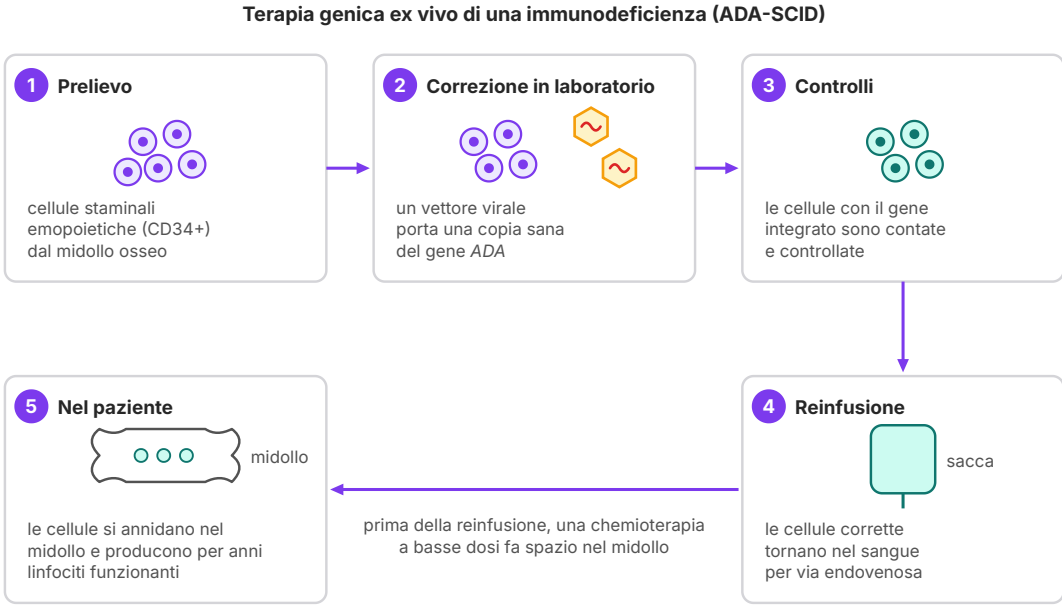

Figura 13.3 Terapia genica ex vivo dell'ADA-SCID (schema non in scala). Il vettore retrovirale integra la copia sana del gene *ADA* nel DNA delle cellule staminali emopoietiche del paziente; le cellule corrette, reinfuse, si stabiliscono nel midollo osseo e producono per anni cellule del sangue, compresi linfociti funzionanti. Poiché le cellule sono del paziente stesso, non c'è rischio di rigetto.

La prima sperimentazione autorizzata di terapia genica, nel 1990 negli Stati Uniti, riguardò una bambina di quattro anni malata di **ADA-SCID**, un'immunodeficienza combinata grave. La man-

canza dell'enzima adenosina deaminasi (ADA) fa accumulare nei linfociti un prodotto del metabolismo delle purine che li uccide, e i bambini colpiti si ammalano gravemente per qualunque infezione. In Italia questa linea di ricerca è stata portata avanti all'Istituto San Raffaele Telethon per la terapia genica (SR-Tiget) di Milano: le cellule staminali emopoietiche del bambino vengono prelevate dal midollo, ricevono con un vettore retrovirale una copia del gene *ADA* e vengono reinfuse (Figura 13.3). Questa terapia, chiamata Strimvelis, ha ottenuto nel maggio 2016 l'autorizzazione della Commissione europea: è stata la prima terapia genica ex vivo con cellule staminali approvata nell'Unione europea. Dal 2023 la titolare dell'autorizzazione è la Fondazione Telethon, un ente senza scopo di lucro: un caso raro, nato dopo che l'azienda farmaceutica che la commercializzava aveva deciso di abbandonare un farmaco destinato a pochissimi pazienti.

APPROFONDIMENTO

Approfondimento · Le prime terapie geniche: entusiasmo e battute d'arresto. Nel 1999 un volontario di diciotto anni, Jesse Gelsinger, morì negli Stati Uniti per una violenta reazione infiammatoria a un vettore adenovirale somministrato in una sperimentazione. Pochi anni dopo, in uno studio francese su un'altra immunodeficienza, alcuni bambini guariti svilupparono una leucemia: il vettore retrovirale si era integrato vicino a un gene che controlla la proliferazione delle cellule del sangue e lo aveva attivato. È la *mutagenesi inserzionale*, il rischio di ogni vettore che si integra nel genoma in un punto non scelto.

Questi casi rallentarono il settore per anni e cambiarono le regole: controlli più severi sui pazienti arruolati, e vettori più sicuri, come i lentivirus «autoinattivanti» che non contengono promotori capaci di accendere i geni vicini. Sono un esempio di come la ricerca impari anche dai propri fallimenti.

13.3.2 Le cellule come farmaci

In altri casi le cellule non servono a sostituire un gene mancante, ma a svolgere un compito nuovo. Nelle **cellule CAR-T** i linfociti T del paziente ricevono, con un vettore virale, il gene di un recettore artificiale (CAR, *chimeric antigen receptor*): la parte esterna è presa da un anticorpo e riconosce una proteina delle cellule tumorali, la parte interna attiva il linfocita. Moltiplicate in laboratorio e reinfuse, queste cellule riconoscono e uccidono le cellule del tumore. La prima terapia CAR-T è stata approvata dalla FDA nell'agosto 2017 per una leucemia linfoblastica acuta dei bambini e dei giovani adulti; oggi si usano contro alcune leucemie, alcuni linfomi e il mieloma multiplo.

L'editing genomico del capitolo 12 è arrivato alla clinica alla fine del 2023, con la prima terapia basata su CRISPR-Cas9 per l'anemia falciforme e la β-talassemia, autorizzata a novembre nel Regno Unito, a dicembre negli Stati Uniti (per la β-talassemia nel gennaio 2024) e nel febbraio 2024 nell'Unione europea. L'idea è elegante: invece di correggere il gene dell'emoglobina adulta, Cas9 interrompe nelle cellule staminali emopoietiche del paziente una sequenza regolatrice che, nei precursori dei globuli rossi, accende il gene *BCL11A*: è la proteina BCL11A che,

dopo la nascita, spegne i geni dell'**emoglobina fetale**. Le cellule modificate, reinfuse, producono di nuovo emoglobina fetale, che compensa quella difettosa o mancante.

13.3.3 Le cellule staminali in terapia

La terapia con cellule staminali più diffusa ha decenni di storia: il **trapianto di cellule staminali emopoietiche**, dal midollo osseo, dal sangue periferico o dal cordone ombelicale di un donatore compatibile, cura leucemie, talassemie e immunodeficienze. Per gli altri tessuti la strada è più difficile, ma l'Italia ha un primato. Il gruppo di Michele De Luca e Graziella Pellegrini a Modena ha messo a punto una terapia per chi ha perso le cellule staminali della cornea in seguito a un'ustione chimica o termica dell'occhio: da una piccola biopsia del bordo della cornea sana, il limbus, si coltivano le cellule staminali dell'epitelio corneale, che vengono poi trapiantate sull'occhio danneggiato. Con il nome di Holoclar, nel febbraio 2015 è stata autorizzata nell'Unione europea come primo medicinale a base di cellule staminali.

Le cellule staminali **embrionali** sono pluripotenti, ma per ottenerle si distrugge un embrione di pochi giorni: per chi ritiene che l'embrione abbia fin dall'inizio la dignità di una persona questo è inaccettabile, per altri è lecito con embrioni soprannumerari destinati comunque a non essere impiantati. In Italia la legge 40/2004 vieta la sperimentazione sugli embrioni umani. Le cellule iPS, riprogrammate da cellule adulte, aggirano in parte il problema e sono oggi molto usate nella ricerca, per esempio per studiare in coltura i neuroni di un paziente con una malattia genetica; le applicazioni terapeutiche sono ancora in sperimentazione.

13.4 Le biotecnologie forensi

Ognuno di noi, tranne i gemelli monozigoti, ha un DNA unico. Nel 1984 il genetista britannico Alec Jeffreys, a Leicester, scoprì che alcune regioni ripetute del genoma variano così tanto da una persona all'altra da produrre, dopo un'elettroforesi, un disegno di bande caratteristico di ciascuno: lo chiamò *DNA fingerprinting*, impronta genetica. Il metodo fu presto usato nelle cause di paternità e nelle indagini penali.

Oggi si analizzano gli **STR** (*short tandem repeats*, brevi ripetizioni in tandem): tratti di DNA non codificante in cui una sequenza di pochi nucleotidi, di solito quattro (per esempio AGAT), è ripetuta un numero variabile di volte. Ogni locus STR esiste in molti alleli, che si indicano con il numero di ripetizioni; ogni persona ne ha due per locus, uno ereditato da ciascun genitore, uguali (omozigote) o diversi (eterozigote). Con una PCR multipla, i cui primer sono marcati con molecole fluorescenti, si amplificano insieme una ventina di loci, poi un'elettroforesi capillare separa i prodotti per lunghezza. Il risultato è un **profilo del DNA**, l'insieme degli alleli di una persona ai loci analizzati (Figura 13.4). Negli Stati Uniti la banca dati nazionale usa dal 2017 un insieme di 20 loci di base; nell'Unione europea lo standard comune comprende 12 loci, in parte gli stessi.

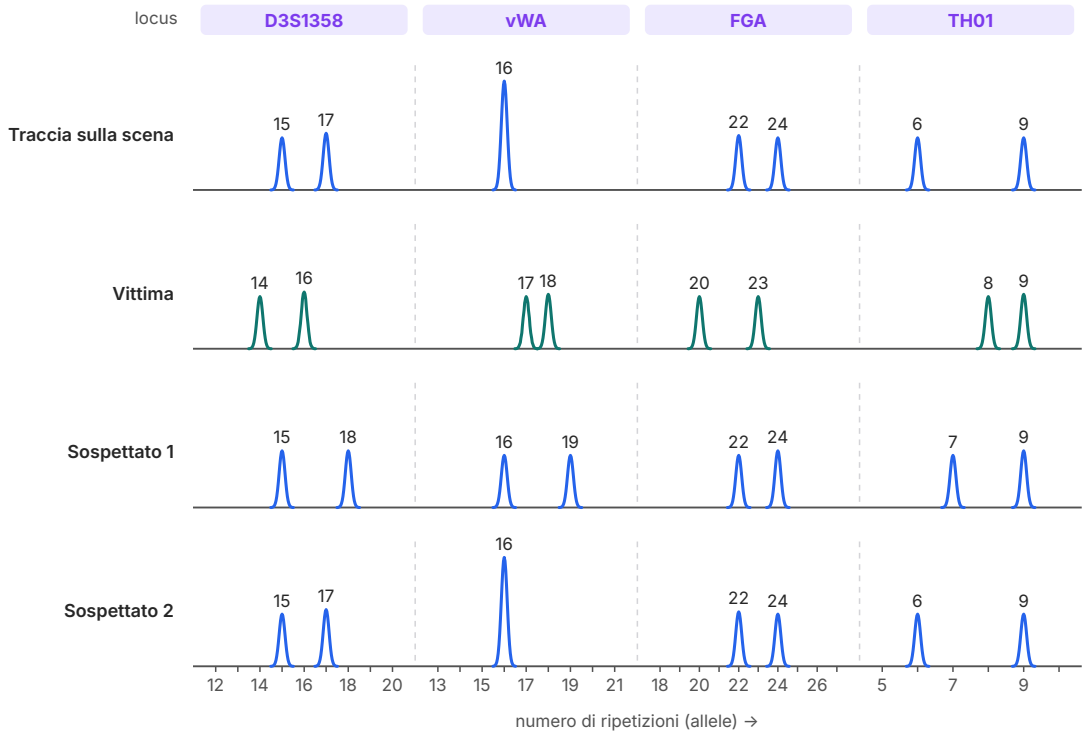

Figura 13.4 Profili STR a confronto (dati di esempio). Per ogni campione e ogni locus i picchi indicano gli alleli, cioè il numero di ripetizioni; un solo picco, alto circa il doppio, indica che la persona è omozigote a quel locus. La traccia trovata sulla scena coincide con il sospettato 2 a tutti i loci; il sospettato 1 è escluso dai loci D3S1358, vWA e TH01, anche se coincide a FGA.

Leggere un profilo richiede due regole. Basta un locus che non coincide per **escludere** che una traccia appartenga a una persona (salvo errori tecnici, che si controllano ripetendo l'analisi). Una coincidenza a tutti i loci, invece, non è una certezza assoluta: si esprime con la **probabilità di coincidenza casuale**, cioè la probabilità che una persona presa a caso dalla popolazione abbia per puro caso lo stesso profilo. Poiché i loci sono scelti per lo più su cromosomi diversi, o lontani sullo stesso cromosoma, e si ereditano in modo indipendente, si moltiplicano le frequenze dei genotipi ai singoli loci; con una ventina di loci si ottengono numeri piccolissimi.

IN SINTESI

Leggere un profilo STR. Esclusione: anche un solo locus con alleli diversi esclude la persona come fonte della traccia. Coincidenza: la probabilità di coincidenza casuale è il prodotto delle frequenze dei genotipi ai singoli loci (loci indipendenti):

$$P = f_1 \times f_2 \times \ldots \times f_n$$

Paternità: a ogni locus il figlio ha un allele della madre e uno del padre; un uomo che non ha l'allele paterno è escluso (in pratica si richiede l'esclusione ad almeno due loci, perché a un singolo locus può esserci una mutazione).

ESEMPIO SVOLTO

Una traccia e un sospettato. Il profilo di una traccia coincide con quello di un sospettato a quattro loci, dove i genotipi hanno nella popolazione le frequenze 0,10; 0,06; 0,20 e 0,08. a) Calcola la probabilità di coincidenza casuale. b) In una città di 500 000 abitanti, quante persone ci si aspetta che abbiano per caso lo stesso profilo? c) Che cosa cambierebbe analizzando 20 loci?

Soluzione. a) $P = 0{,}10 \times 0{,}06 \times 0{,}20 \times 0{,}08 = 9{,}6 \times 10^{-5}$, cioè circa 1 su 10 000. b) $500\,000 \times 9{,}6 \times 10^{-5} \approx 48$ persone: con quattro loci la coincidenza non basta a indicare un colpevole. c) Ogni locus in più moltiplica P per un altro numero minore di 1: con 20 loci la probabilità diventa così piccola che, salvo un gemello monozigote o un parente stretto, la coincidenza indica con altissima probabilità la stessa persona. Resta da capire *come* il DNA sia arrivato sulla scena: questa è una domanda per l'indagine, non per il laboratorio.

Lo stesso ragionamento serve nei **test di paternità** e nell'identificazione delle vittime di disastri, confrontando il DNA dei resti con quello dei parenti. In Italia la legge 85/2009 ha istituito la Banca dati nazionale del DNA, presso il Ministero dell'Interno, con un laboratorio centrale presso il Ministero della Giustizia: raccoglie i profili delle tracce trovate sulle scene dei reati e quelli di alcune categorie di persone arrestate o detenute, e li confronta. Le regole sono rigide perché il DNA dice molto di più dell'identità: rivela parentele, l'origine geografica, predisposizioni a malattie. Lo mostrano i test genetici venduti ai privati: nel 2018, negli Stati Uniti, un pluriomicida fu identificato dopo decenni confrontando il DNA delle scene con quello che alcuni suoi lontani parenti avevano caricato in una banca dati genealogica.

COLLEGAMENTI

Educazione civica · Di chi è il mio DNA? Il Regolamento generale sulla protezione dei dati dell'Unione europea (Regolamento UE 2016/679) mette i *dati genetici* fra le «categorie particolari» di dati personali, il cui trattamento è vietato salvo casi precisi, come il consenso esplicito dell'interessato o motivi di interesse pubblico previsti dalla legge. Il problema è che il mio genoma è in parte anche quello dei miei genitori, fratelli e figli: un test fatto da me rivela qualcosa su persone che non hanno dato alcun consenso. Discutete in classe: un datore di lavoro o un'assicurazione dovrebbero poter conoscere i risultati di un test genetico? E la polizia dovrebbe poter consultare le banche dati genealogiche private?

13.5 Le biotecnologie in agricoltura, nell'industria e nell'ambiente

13.5.1 Come si fa una pianta transgenica

Per modificare una pianta i biotecnologi hanno preso in prestito un «ingegnere genetico» naturale. *Agrobacterium tumefaciens* è un batterio del suolo che causa nelle piante tumori chiamati galle. Possiede il **plasmide Ti** (*tumor-inducing*), da cui trasferisce nelle cellule della pianta un tratto, il **T-DNA**, che si integra in un cromosoma vegetale e fa produrre alla cellula ormoni della crescita e sostanze nutritive per il batterio. Il trasferimento è affidato ai geni *vir* e richiede soltanto le brevi sequenze ai bordi del T-DNA. In laboratorio si tolgono i geni del tumore e al loro posto si mettono il gene di interesse e un gene marcatore; poi si infettano frammenti di foglia, si selezionano su un terreno con l'agente selettivo le cellule trasformate e da queste si rigenerano piante intere, che trasmettono il transgene ai semi (Figura 13.5). Per le specie poco sensibili ad *Agrobacterium*, come all'inizio molti cereali, si usa il **cannone genico**, che spara nelle cellule microscopiche particelle d'oro rivestite di DNA.

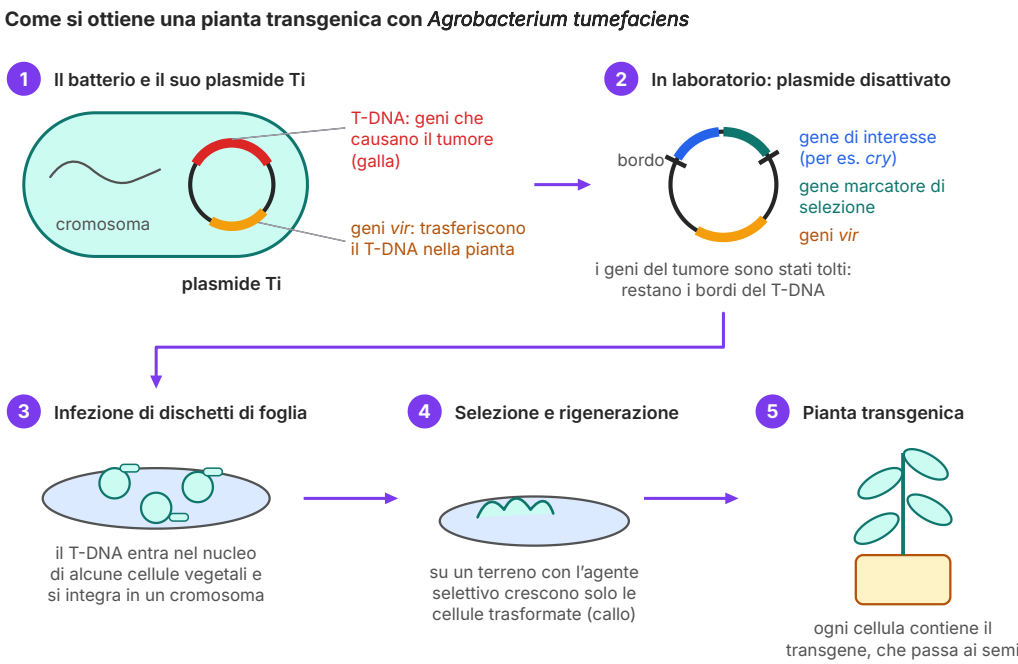

Figura 13.5 La trasformazione di una pianta con *Agrobacterium tumefaciens* (schema non in scala). Nel plasmide Ti modificato restano i bordi del T-DNA e i geni *vir*, ma i geni del tumore sono sostituiti dal gene di interesse e da un marcatore di selezione. Il T-DNA si integra nel DNA della pianta in un punto non scelto.

13.5.2 Esempi: resistenza agli insetti, agli erbicidi, valore nutritivo

Il **mais Bt** porta un gene *cry* del batterio *Bacillus thuringiensis*, che codifica una proteina tossica per alcuni insetti, come la piralide del mais: la proteina Cry, attivata nell'intestino alcalino della larva, si lega a recettori specifici e ne perfora le cellule. Nei mammiferi, che non hanno quei recettori e hanno uno stomaco acido, non ha effetto; da decenni, del resto, preparati di *B. thuringiensis* sono usati come insetticidi anche nell'agricoltura biologica. Le piante **tolleranti a un erbicida** sopravvivono a un diserbante che uccide le erbe infestanti, così che il campo si può trattare durante la crescita. Il **Golden Rice** (pubblicato nel 2000) contiene geni presi da piante e da un batterio che gli fanno produrre β-carotene nel chicco: è il precursore della vitamina A, la cui carenza nei paesi poveri causa cecità e mortalità infantile. Nelle Filippine ne è stata autorizzata la coltivazione nel 2021; nell'aprile 2024 una corte d'appello ha revocato l'autorizzazione, richiamando il principio di precauzione.

Accanto alla transgenesi ci sono oggi le tecniche che non introducono geni estranei: la **cisgenesi** trasferisce un gene da una pianta della stessa specie o di una specie incrociabile, come un gene di resistenza a una malattia preso da una varietà selvatica di melo; la **mutagenesi mirata** con CRISPR modifica poche basi di un gene della pianta. Le une e le altre sono chiamate

NGT (*new genomic techniques*, nuove tecniche genomiche). Il risultato può essere indistinguibile da una mutazione spontanea o da un incrocio, ma ottenuto in pochi anni invece che in decenni.

13.5.3 Benefici, rischi, prove e regole

Sugli OGM agricoli si scontrano domande diverse, che conviene separare. La prima è scientifica: **gli alimenti derivati da piante GM sono sicuri da mangiare?** Ogni pianta viene valutata caso per caso, nell'Unione europea dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA). Nel 2016 le Accademie nazionali delle scienze degli Stati Uniti hanno pubblicato una revisione di centinaia di studi: non hanno trovato prove che gli alimenti dalle piante GM autorizzate siano meno sicuri di quelli delle varietà convenzionali. La seconda riguarda l'**ambiente**, e qui i problemi documentati esistono: dove si è usato sempre lo stesso erbicida si sono selezionate erbe infestanti resistenti, e in alcune regioni insetti resistenti alla proteina Bt, soprattutto dove non si sono lasciate le «zone rifugio» di piante non Bt che rallentano l'evoluzione della resistenza (è la selezione naturale di *Scienze naturali 2*). Ci sono poi il flusso di geni verso piante selvatiche affini e gli effetti sulla biodiversità, da valutare specie per specie. La terza domanda è **economica e politica**: chi possiede i brevetti sulle sementi, che cosa succede ai piccoli agricoltori, chi decide che cosa si coltiva. Sono questioni legittime, ma non si risolvono con un esperimento di laboratorio.

Le regole riflettono questa complessità. Nell'Unione europea gli OGM sono autorizzati dopo una valutazione del rischio (direttiva 2001/18/CE) e gli alimenti che li contengono vanno etichettati. Dal 2015 la direttiva (UE) 2015/412 permette a ogni Stato di vietarne la coltivazione sul proprio territorio anche quando l'UE l'ha autorizzata, e l'Italia lo ha fatto: per esempio il mais Bt autorizzato in Europa non si può coltivare in Italia, mentre si importano e si usano come mangimi grandi quantità di soia e mais GM. Per le NGT, il Regolamento (UE) 2026/1388, adottato nel giugno 2026, distingue due categorie: le piante di **categoria 1**, con modifiche paragonabili a quelle che si possono ottenere con il miglioramento genetico tradizionale, saranno trattate come le piante convenzionali, salvo l'etichettatura delle sementi e il divieto nell'agricoltura biologica; quelle di **categoria 2** resteranno soggette alle regole sugli OGM, con alcuni adattamenti. Restano comunque in categoria 2 le piante rese tolleranti a un erbicida o capaci di produrre una sostanza insetticida. Le nuove norme si applicheranno dal luglio 2028.

ERRORE FREQUENTE

«Gli OGM contengono geni, il cibo naturale no». Ogni alimento di origine vegetale o animale, una mela, una bistecca, un pomodoro biologico, contiene migliaia di geni e il loro DNA: ogni giorno ne mangiamo grammi, e lo digeriamo in nucleotidi. Che cosa distingue un OGM è un gene (o pochi geni) *in più o modificati* con tecniche di laboratorio. Allo stesso modo «naturale» non significa «sicuro», né «modificato» significa «pericoloso»: va valutato il singolo prodotto, con i dati.

COLLEGAMENTI

Storia · Dalla rivoluzione verde agli OGM. Negli anni Sessanta la *rivoluzione verde* diffuse in Asia e in America latina varietà di frumento e di riso ad alto rendimento, insieme a fertilizzanti, pesticidi e irrigazione; uno dei suoi promotori, l'agronomo Norman Borlaug, ricevette il Nobel per la pace nel 1970 (vedi *Storia 5*). Quelle varietà erano frutto di incroci e selezione, non di ingegneria genetica, ma il dibattito di allora (rese più alte e meno fame da un lato, dipendenza dai fertilizzanti, perdita di varietà locali e vantaggio per gli agricoltori più ricchi dall'altro) anticipa molti argomenti di quello sugli OGM. Il collegamento con l'Agenda 2030 è l'obiettivo 2, «sconfiggere la fame».

13.5.4 Le biotecnologie bianche, blu e grigie

Nell'industria i microrganismi e i loro enzimi sostituiscono processi chimici che richiedono alte temperature o reagenti tossici. I detersivi contengono proteasi, lipasi e amilasi ricombinanti, scelte o modificate per lavorare a basse temperature: lavare a 30 °C invece che a 60 °C fa risparmiare energia. La chimosina che coagula il latte nei formaggi, un tempo estratta dallo stomaco dei vitelli, è oggi prodotta per lo più da microrganismi ricombinanti. Dalla fermentazione di zuccheri si ottengono biocarburanti (vedi il capitolo 11) e l'acido lattico da cui si fa la bioplastica PLA (vedi il capitolo 6). Dal mare vengono molecole preziose: la proteina fluorescente verde (GFP) di una medusa, oggi usata in tutti i laboratori per rendere visibili le proteine nelle cellule, è valsa il Nobel per la chimica 2008.

Nel **biorisanamento** (*bioremediation*) si usano organismi per eliminare o rendere innocui gli inquinanti di un suolo o di un'acqua. Dopo il naufragio della petroliera Exxon Valdez in Alaska, nel 1989, sulle spiagge furono sparsi fertilizzanti che accelerarono la crescita dei batteri capaci di degradare gli idrocarburi, già presenti nell'ambiente. I metalli pesanti, invece, non si possono distruggere: alcune piante li assorbono e li concentrano nei tessuti, che poi si raccolgono e si smaltiscono (fitorisanamento). Nei **biosensori**, infine, un enzima, un anticorpo o un microrganismo è accoppiato a un dispositivo che trasforma il riconoscimento di una sostanza in un segnale misurabile, come nei misuratori di glicemia.

13.6 Animali modificati, clonazione e bioetica

13.6.1 Animali transgenici e knock-out

Anche negli animali si possono aggiungere geni o spegnerli. Un animale **transgenico** ha un gene in più: alcune capre producono nel latte una proteina umana del sangue, che si purifica come farmaco; negli Stati Uniti nel 2015 è stato autorizzato come alimento un salmone transgenico che cresce più in fretta. Molto più diffusi sono gli animali da ricerca. Nel **topo knock-out** un gene preciso è stato inattivato, così che dagli effetti della sua mancanza si capisce a che cosa

serve; i topi knock-out sono anche modelli di malattie umane, su cui si sperimentano le terapie. La tecnica, basata sulla ricombinazione omologa in cellule staminali embrionali di topo, è valsa nel 2007 il Nobel a Mario Capecchi (nato a Verona), Martin Evans e Oliver Smithies; oggi lo stesso risultato si ottiene più rapidamente con CRISPR.

13.6.2 La clonazione

Un **clone** è un insieme di individui geneticamente identici, come i batteri di una colonia o le piante ottenute per talea. Nei mammiferi la **clonazione per trasferimento nucleare** consiste nell'inserire il nucleo di una cellula somatica in una cellula uovo privata del proprio nucleo. Il 5 luglio 1996 nacque all'Istituto Roslin, in Scozia, la pecora **Dolly**, il primo mammifero clonato da una cellula di un individuo adulto; l'esperimento era guidato da Ian Wilmut e Keith Campbell (Figura 13.6).

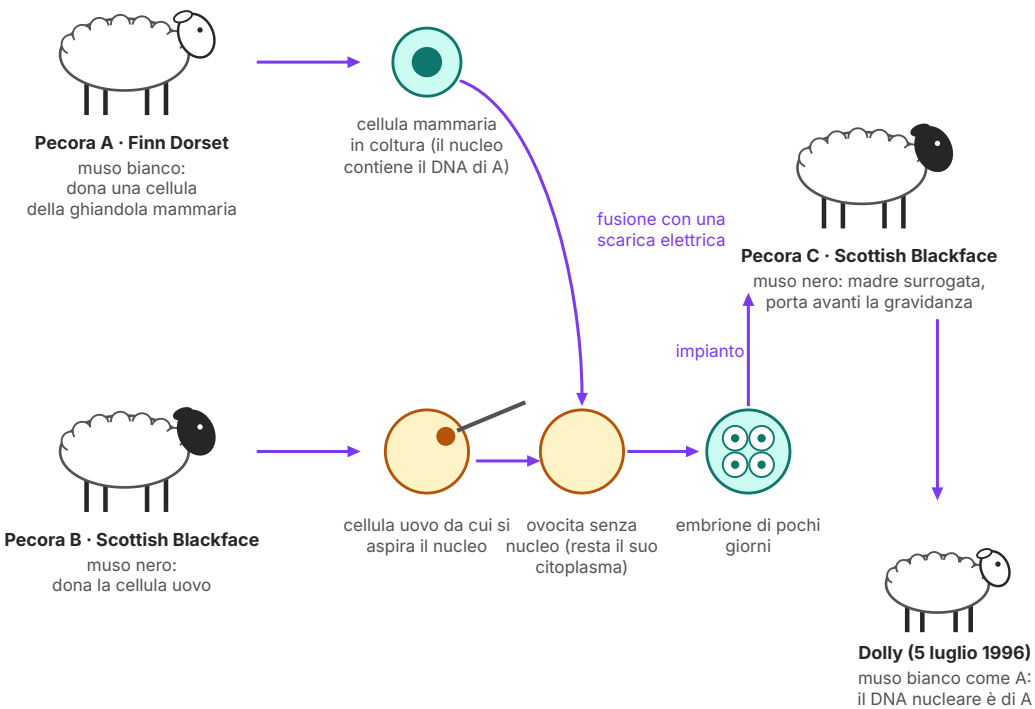

Figura 13.6 La clonazione della pecora Dolly per trasferimento nucleare (schema non in scala). Le tre pecore hanno ruoli diversi: A (Finn Dorset, muso bianco) dona il nucleo, B (Scottish Blackface, muso nero) dona la cellula uovo, C (Scottish Blackface) è la madre surrogata. Dolly ha il muso bianco perché il suo DNA nucleare è quello di A; il DNA mitocondriale viene invece dal citoplasma della cellula uovo di B.

Il nucleo veniva da una cellula della ghiandola mammaria di una pecora di razza Finn Dorset, a muso bianco; la cellula uovo da una pecora Scottish Blackface, a muso nero, e un'altra pecora a muso nero portò avanti la gravidanza. Dolly nacque con il muso bianco: il suo DNA nucleare era quello della donatrice del nucleo. Il risultato dimostrava, come Gurdon con le rane (vedi *Scienze naturali 3*, cap. 15), che il nucleo di una cellula differenziata conserva tutta l'informazione per costruire un organismo. Ma l'efficienza era bassissima: per arrivare a Dolly ci vollero 277 fusioni, da cui si ottennero 29 embrioni.

ERRORE FREQUENTE

«Clonare una persona produce una sua copia». Il clone nasce come un neonato e cresce in un altro tempo, in un altro utero, in un altro ambiente: è più simile a un gemello monozigote nato anni dopo che a una copia. Non ha nemmeno esattamente lo stesso DNA, perché i mitocondri vengono dalla cellula uovo, né lo stesso stato epigenetico. Soprattutto, la personalità, i ricordi e le scelte non sono scritti nel DNA. La clonazione riproduttiva umana, del resto, è vietata dal Protocollo aggiuntivo (1998) alla Convenzione di Oviedo negli Stati che lo hanno ratificato e, in Italia, dalla legge 40/2004.

La clonazione degli animali si usa oggi soprattutto nella ricerca e, in qualche caso, nella conservazione di specie minacciate, come il furetto dai piedi neri del Nord America, per riportare nella popolazione la variabilità genetica di individui conservati in cellule congelate. Da non confondere con la clonazione riproduttiva è la clonazione **terapeutica**, in cui il trasferimento nucleare serve soltanto a ottenere cellule staminali compatibili con il donatore del nucleo; la strada più seguita, oggi, è quella delle iPS.

13.6.3 Bioetica e regole

Le biotecnologie pongono domande che non riguardano solo ciò che si *può* fare, ma ciò che si *deve* fare. Alcuni principi tornano in tutti i dibattiti. Il **principio di precauzione** afferma che, quando un'attività può causare danni gravi o irreversibili alla salute o all'ambiente, l'incertezza scientifica non è una ragione sufficiente per rinviare le misure di protezione; il diritto dell'Unione europea lo richiama fra i principi della politica ambientale. Il **consenso informato** chiede che nessuno sia sottoposto a un trattamento o a una ricerca senza averne capito scopi, rischi e alternative e senza averlo accettato liberamente; per un test genetico vuol dire anche decidere che cosa si vuole sapere, compresi i risultati inattesi.

Il riferimento europeo è la **Convenzione di Oviedo** del Consiglio d'Europa sui diritti dell'uomo e la biomedicina, aperta alla firma il 4 aprile 1997. L'Italia l'ha firmata e con la legge 145/2001 ne ha autorizzato la ratifica, ma non ha depositato lo strumento di ratifica presso il Consiglio d'Europa: formalmente non è vincolata, anche se i giudici italiani ne applicano i principi. L'articolo 13 stabilisce che un intervento volto a modificare il genoma umano può essere intrapreso solo per scopi preventivi, diagnostici o terapeutici e solo se non ha lo scopo di intro-

durre una modifica nel genoma dei discendenti: è il divieto dell'editing della **linea germinale**, che si trasmetterebbe a tutte le generazioni successive. Nel novembre 2018 il ricercatore cinese He Jiankui annunciò la nascita di due gemelle da embrioni in cui aveva modificato con CRISPR il gene *CCR5*, nel tentativo di renderle resistenti all'HIV. La comunità scientifica internazionale condannò l'esperimento: non c'era alcuna necessità medica, il rischio di effetti fuori bersaglio non era controllato, il consenso dei genitori era stato ottenuto in modo scorretto, e le modifiche riguardavano persone che non avevano potuto scegliere. Alla fine del 2019 un tribunale cinese lo condannò a tre anni di carcere.

COLLEGAMENTI

Filosofia · Un'etica per la tecnica. Nel capitolo 12 hai visto Asilomar; in *Filosofia 5* incontri Hans Jonas e il suo *principio responsabilità*: la tecnica moderna ha effetti cumulativi, spesso irreversibili, che riguardano generazioni non ancora nate, e per questo serve un'etica orientata al futuro. Prova ad applicarlo all'editing della linea germinale e a una pianta NGT: in quale dei due casi gli effetti sono più difficili da revocare? Lo stesso volume presenta la *bioetica*; in Italia il Comitato nazionale per la bioetica, istituito nel 1990 presso la Presidenza del Consiglio, esprime pareri su questi temi.

Per discutere di questi temi in modo serio conviene seguire uno schema: individuare la domanda, separare i fatti verificabili dai valori in gioco, cercare le prove migliori (revisioni sistematiche, pareri delle agenzie, non singoli studi o titoli di giornale), ascoltare gli argomenti contrari nella loro forma più forte, e solo alla fine prendere posizione, dichiarando su quali valori si fonda.

ESPERIENZA DI LABORATORIO

Un dibattito strutturato sulle piante NGT. Scopo: esercitarsi a distinguere le domande scientifiche da quelle etiche ed economiche e a sostenere una posizione con le prove.

Materiali: il testo del Regolamento (UE) 2026/1388 nella sintesi della Commissione europea; la pagina dell'EFSA sulle nuove tecniche genomiche; il riassunto del rapporto delle Accademie nazionali degli Stati Uniti (2016); un articolo di un'associazione di agricoltori biologici e uno di un'associazione di produttori di sementi.

Procedimento: 1) La classe si divide in cinque gruppi: ricercatori, agricoltori convenzionali, agricoltori biologici, consumatori, legislatori. 2) Ogni gruppo prepara in 30 minuti tre argomenti, indicando per ciascuno se è un fatto (con la fonte), una previsione o un giudizio di valore. 3) Dibattito con tempi fissi (2 minuti per intervento, una replica per gruppo); un moderatore segna alla lavagna gli argomenti divisi in tre colonne: scientifici, economici, etici. 4) Alla fine il gruppo dei legislatori propone una regola e la motiva.

Sicurezza: l'attività non richiede materiale biologico. Nessuna modifica di organismi si fa a scuola al di fuori dei kit didattici certificati, usati dall'insegnante.

Risultato atteso e domande: quasi sempre gli argomenti si concentrano nella colonna dei valori e dell'economia. a) Quali affermazioni si potevano verificare con i dati e quali no? b) Su quale argomento i gruppi erano d'accordo pur partendo da interessi diversi? c) Una variante: ripetere l'attività leggendo una serie di profili STR (dati di esempio) per un caso giudiziario simulato.

Laboratori di ricerca: molte università italiane, anche con i progetti di orientamento del Piano Lauree Scientifiche, aprono i loro laboratori di biotecnologie agli studenti delle superiori per esperienze di estrazione del DNA, PCR ed elettroforesi.

SINTESI

- Le **biotecnologie** moderne si basano sul DNA ricombinante. Un **OGM** ha materiale genetico modificato in un modo che non avviene in natura; un organismo **transgenico** ha un gene di un'altra specie.
- Le **proteine ricombinanti** si producono in batteri, lieviti o cellule di mammifero (quando servono glicosilazione o un ripiegamento complesso). L'insulina umana ricombinante (FDA, 1982) è stato il primo farmaco ricombinante; nei batteri si usa un cDNA perché non sanno rimuovere gli introni.
- Il vaccino contro l'epatite B (1986) è il primo vaccino ricombinante. I **vaccini a mRNA** portano in nanoparticelle lipidiche un mRNA modificato che le cellule traducono nell'antigene: non entra nel nucleo e non modifica il DNA.
- Gli anticorpi monoclonali, da murini, sono diventati chimerici, **umanizzati** e interamente umani; si usano contro tumori e malattie autoimmuni. La **farmacogenomica** adatta farmaco e dose al genotipo.
- La **terapia genica** somatica può essere **ex vivo** (cellule corrette in laboratorio e reinfuse: Strimvelis per l'ADA-SCID, UE 2016) o **in vivo** (vettori AAV, capacità circa 4,7 kb). Rischio storico: la mutagenesi inserzionale.
- Le **cellule CAR-T** sono linfociti T del paziente con un recettore artificiale contro il tumore (FDA, 2017). La prima terapia CRISPR (2023–2024) riattiva l'emoglobina fetale nell'anemia falciforme e nella β-talassemia.
- Terapie con staminali: trapianto di cellule emopoietiche; Holoclar (Modena, UE 2015) per la cornea. Le staminali embrionali pongono problemi etici; le iPS sono soprattutto uno strumento di ricerca.
- Il **profilo del DNA** si basa sugli **STR**: un locus diverso esclude; una coincidenza si pesa con la probabilità di coincidenza casuale, prodotto delle frequenze dei genotipi. I dati genetici sono dati personali «particolari».
- Le piante transgeniche si ottengono con il **plasmide Ti** di *Agrobacterium tumefaciens* o con il cannone genico (mais Bt, piante tolleranti agli erbicidi, Golden Rice). **Cisgenesi** e mutagenesi mirata sono **NGT**, regolate dal Regolamento (UE) 2026/1388 (applicabile dal luglio 2028).
- Le prove indicano che gli alimenti GM autorizzati non sono meno sicuri dei convenzionali; i problemi ambientali documentati sono erbe e insetti resistenti. Le questioni economiche e politiche vanno distinte da quelle scientifiche. L'Italia vieta la coltivazione di OGM (direttiva 2015/412). Nell'industria e nell'ambiente: enzimi, bioplastiche, **biorisanamento**.
- Topi **knock-out** (Nobel 2007) e animali transgenici; la pecora **Dolly** (1996) è nata per trasferimento nucleare e ha il DNA nucleare della donatrice del nucleo. La Convenzione di Oviedo (1997, art. 13) vieta le modifiche del genoma trasmissibili ai discendenti; il caso delle gemelle del 2018 fu condannato dalla comunità scientifica.

ESERCIZI

Comprendere e ricordare

1. ● Un organismo transgenico è
   - **A.** un organismo ottenuto con la selezione artificiale
   - **B.** un organismo in cui è stato introdotto un gene di un'altra specie
   - **C.** un individuo geneticamente identico a un altro
   - **D.** un organismo con una mutazione spontanea

2. ● L'eritropoietina (EPO) ricombinante si produce in cellule di mammifero e non in *E. coli* perché
   - **A.** è troppo lunga per i ribosomi batterici
   - **B.** è tossica per i batteri
   - **C.** è una glicoproteina, e i batteri non aggiungono le catene di zuccheri
   - **D.** il suo gene non ha introni

3. ● Dopo un vaccino a mRNA, la proteina dell'agente infettivo viene prodotta
   - **A.** dai ribosomi nel citoplasma di alcune cellule della persona vaccinata
   - **B.** nel nucleo, dopo che l'mRNA si è integrato nel DNA
   - **C.** da batteri in un fermentatore, prima dell'iniezione
   - **D.** dai lipidi della nanoparticella

4. ●● Un anticorpo monoclonale umanizzato
   - **A.** è prodotto dai linfociti B del paziente
   - **B.** è interamente di topo
   - **C.** ha le regioni costanti di topo e le variabili umane
   - **D.** conserva del topo soltanto i brevi tratti che si legano all'antigene

5. ●● Nella terapia genica dell'ADA-SCID autorizzata nell'Unione europea
   - **A.** le cellule staminali emopoietiche del paziente sono corrette in laboratorio e reinfuse
   - **B.** un vettore AAV è iniettato direttamente nel midollo osseo
   - **C.** si corregge il gene in un embrione
   - **D.** si trapiantano le cellule di un donatore compatibile

6. ●● Le cellule CAR-T sono
   - **A.** linfociti B che producono anticorpi monoclonali
   - **B.** cellule staminali di un donatore
   - **C.** cellule tumorali rese innocue
   - **D.** linfociti T del paziente con un recettore artificiale contro una proteina del tumore

7. ● Un locus STR è
   A. un gene che codifica un enzima di restrizione
   B. un tratto di DNA in cui una breve sequenza è ripetuta un numero variabile di volte
   C. un tratto del DNA mitocondriale
   D. il sito in cui si lega un primer

8. ●● Nel plasmide Ti usato per trasformare le piante
   A. si conservano i geni che causano il tumore
   B. si eliminano i bordi del T-DNA
   C. i geni del tumore sono sostituiti dal gene di interesse e da un marcatore
   D. si eliminano i geni *vir*

9. ●●● Secondo il Regolamento (UE) 2026/1388, le piante NGT di categoria 1
   A. sono vietate in tutta l'Unione
   B. restano soggette alle stesse regole degli OGM
   C. devono contenere almeno un gene di un'altra specie
   D. saranno trattate, dal 2028, come le piante ottenute con il miglioramento genetico convenzionale

Vero o falso

10. ● L'insulina umana ricombinante, approvata negli Stati Uniti nel 1982, è stata il primo farmaco ottenuto con il DNA ricombinante.

11. ●● Una terapia genica eseguita sulle cellule del midollo osseo di un paziente si trasmette ai suoi figli.

12. ● Per escludere che una traccia appartenga a una persona basta che un solo locus STR non coincida.

13. ●● Il DNA mitocondriale della pecora Dolly è quello della pecora Finn Dorset che ha donato il nucleo.

14. ● La proteina Cry del mais Bt è tossica per tutti gli animali che la ingeriscono, compresi i mammiferi.

15. ●●● Un vettore AAV può trasportare senza problemi l'intera sequenza codificante del gene della distrofina, lunga circa 11 kb.

Applicare

16. ●● L'ormone della crescita umano maturo è formato da 191 amminoacidi. Per farlo produrre a *E. coli* si usa una sequenza che comincia con il codone d'inizio e termina con un codone di stop. Quanti nucleotidi ha la sequenza codificante? Perché non si usa il gene preso dal genoma umano?

17. ●● In un fermentatore le cellule di *E. coli* si dividono ogni 30 minuti. Partendo da $1{,}0 \times 10^6$ cellule, quante cellule ci sarebbero dopo 8 ore se la crescita non incontrasse limiti? Perché in realtà la crescita rallenta?

18. ●● Un tratto dell'mRNA di un vaccino ha la sequenza 5′-AUG UUU GUU UUU CUU GUU UUA UUG-3′. a) Scrivi la sequenza di amminoacidi codificata (codice genetico, Tabella D.2 dell'appendice). b) Nel vaccino ogni U è sostituita da un nucleoside modificato che i ribosomi leggono come U: la proteina cambia?

Tabella 13.2 Esercizio sulla traccia biologica: alleli di quattro loci STR (dati di esempio).

Campione	D8S1179	D21S11	D18S51	TH01
Traccia	13, 14	29, 30	15, 17	7, 9
Sospettato A	13, 14	29, 31	15, 17	7, 9
Sospettato B	13, 14	29, 30	15, 17	7, 9
Sospettato C	12, 14	29, 30	14, 17	6, 9

19. ●● Usa la Tabella 13.2. Quale sospettato è compatibile con la traccia? A quali loci sono esclusi gli altri due?

20. ●●● Un profilo coincide con quello di un sospettato a cinque loci, dove i genotipi hanno nella popolazione le frequenze 0,08; 0,12; 0,05; 0,10 e 0,07. a) Calcola la probabilità di coincidenza casuale. b) In una regione di 4,0 milioni di abitanti, quante persone ci si aspetta che abbiano lo stesso profilo per caso? c) Che cosa ne concludi?

Tabella 13.3 Esercizio di paternità: alleli di quattro loci STR (dati di esempio).

Persona	TH01	vWA	FGA	D8S1179
Madre	6, 9	15, 17	21, 24	12, 14
Figlio	7, 9	17, 18	21, 22	13, 14
Presunto padre 1	7, 8	16, 18	22, 25	13, 15
Presunto padre 2	7, 9	14, 18	20, 23	10, 11

21. ●●● Usa la Tabella 13.3. a) Per ogni locus individua l'allele che il figlio ha ricevuto dal padre. b) Quale dei due uomini è escluso, e a quali loci? c) L'altro è certamente il padre?

22. ●● Un vettore AAV può portare circa 4,7 kb di DNA. Oltre alla sequenza codificante servono circa 1,0 kb di sequenze regolatrici (promotore e segnale di poliadenilazione). Quali di queste sequenze codificanti si possono trasportare: fattore IX della coagulazione (1,4 kb), adenosina deaminasi (1,1 kb), distrofina (11 kb)?

23. ● La proinsulina ha 86 amminoacidi; l'insulina attiva è formata da una catena A di 21 amminoacidi e da una catena B di 30. Quanti amminoacidi vengono rimossi dagli enzimi?

Leggere dati e figure

24. ●● Osserva la Figura 13.4. a) Quale campione coincide con la traccia? b) A quanti loci il sospettato 1 è escluso? c) Perché al locus vWA alcuni campioni mostrano un solo picco, più alto? d) Perché si analizza anche il DNA della vittima?

25. ●● Osserva la Figura 13.6. a) Qual è il ruolo di ciascuna delle tre pecore? b) Se l'esperimento fosse stato fatto al contrario, con il nucleo di una Scottish Blackface e la cellula uovo di una Finn Dorset, di che colore sarebbe stato il muso dell'agnello? c) Da quale pecora proviene il DNA mitocondriale di Dolly?

Tabella 13.4 Prova in campo di mais Bt (dati di esempio): piante danneggiate dalla piralide e resa in granella, media di quattro parcelle per trattamento.

Trattamento	Piante danneggiate (%)	Resa (t/ha)
mais convenzionale, nessun insetticida	38	9,1
mais convenzionale con insetticida	15	9,8
mais Bt della stessa varietà, nessun insetticida	4	10,4

26. ●●● Usa la Tabella 13.4. a) Qual è il controllo dell'esperimento, e perché il mais Bt è della stessa varietà? b) Di quanto per cento aumenta la resa del mais Bt rispetto al convenzionale senza insetticida? c) Perché la prova va ripetuta in più anni e in più località? d) Che cosa dovrebbero fare gli agricoltori per ritardare la comparsa di piralidi resistenti?

Indagare e argomentare

27. ●●● Un gruppo di ricerca ha ottenuto piante di pomodoro con un gene di resistenza a un fungo. Progetta un esperimento per verificare che la resistenza sia dovuta al transgene: indica la variabile indipendente, quella dipendente, i controlli, le ripetizioni e le precauzioni di sicurezza richieste per coltivare una pianta GM a scopo di ricerca.

28. ●●● Spiega perché l'insulina si può produrre in un batterio o in un lievito, mentre per gli anticorpi monoclonali e per l'EPO servono cellule di mammifero. Collega la risposta alla struttura delle proteine e agli organuli della cellula eucariote.

29. ●●● Il Golden Rice è stato presentato come una soluzione alla carenza di vitamina A e criticato come una distrazione da soluzioni più semplici. Elenca due domande scientifiche, due economiche o politiche e una etica che il caso solleva, e spiega quali si possono risolvere con esperimenti. Come è stato usato il principio di precauzione nella vicenda delle Filippine?

Verso l'esame

30. ●●● **Dal documento al colloquio.** Leggi questa cronologia: 1982, insulina umana ricombinante (FDA); 1986, primo vaccino ricombinante, contro l'epatite B; 1990, prima sperimentazione di terapia genica (ADA-SCID); 2015, Holoclar, primo medicinale a base di cellule staminali autorizzato nell'UE; 2016, Strimvelis; 2017, prima terapia CAR-T; 2023, prima terapia basata su CRISPR. a) Scegli due tappe e spiega la tecnica su cui si basano. b) Fra la prima sperimentazione sull'ADA-SCID e l'autorizzazione di Strimvelis passano 26 anni: quali ragioni scientifiche e regolatorie spiegano tempi così lunghi? c) L'articolo 32 della Costituzione afferma che «la Repubblica tutela la salute come fondamentale diritto dell'individuo e interesse della collettività»: come si concilia con farmaci per malattie rarissime, molto costosi? Che ruolo hanno avuto enti non profit come Telethon? d) Collega la cronologia alla conferenza di Asilomar (1975, vedi il capitolo 12): perché la comunità scientifica si diede regole prima ancora che esistessero applicazioni?

31. ●●● **Collegare.** Il vaccino contro l'epatite B, il vaccino a mRNA e l'insulina ricombinante sono tre modi di far produrre una proteina. Confrontali collegando questo capitolo al capitolo 8 (struttura delle proteine, ponti disolfuro; le glicoproteine sono in questo capitolo), al capitolo 6 (nanoparticelle lipidiche come biomateriali) e a *Scienze naturali 4*, capp. 10 e 12 (risposta immunitaria, regolazione della glicemia).

Approfondimento

32. ●●● (Approfondimento) Spiega che cos'è la mutagenesi inserzionale e perché ha causato leucemie in una sperimentazione con un vettore retrovirale. Perché il rischio è minore con un vettore AAV usato in vivo, che resta per lo più fuori dai cromosomi? E perché, anche nel caso peggiore, la mutazione non passa ai figli del paziente?

PER APPROFONDIRE

- [BRO] T. A. Brown, *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*: i capitoli sulla produzione di proteine ricombinanti, sulle piante transgeniche, sulla terapia genica e sul DNA in medicina legale.
- [ALB] B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*: le pagine sugli animali transgenici e knock-out, sulle cellule staminali e sulla riprogrammazione.
- [STR] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*: il capitolo sulle tecnologie del DNA e degli anticorpi, con gli esempi di proteine ricombinanti di uso medico.

Glossario del capitolo

Anticorpo umanizzato
Anticorpo monoclonale in cui, del topo, restano soltanto i brevi tratti delle regioni variabili che si legano all'antigene; il resto è umano. (ingl. *humanized antibody*)

Biorisanamento
Uso di organismi viventi, soprattutto microrganismi e piante, per eliminare o rendere innocui gli inquinanti di suoli e acque. (ingl. *bioremediation*)

Biotecnologie
Uso di organismi viventi, di loro parti o di loro molecole per ottenere prodotti e servizi utili; quelle moderne si basano sul DNA ricombinante. (ingl. *biotechnology*)

Cellule CAR-T
Linfociti T del paziente modificati con un vettore virale perché esprimano un recettore artificiale che riconosce una proteina delle cellule tumorali. (ingl. *CAR T cells*)

Cisgenesi
Trasferimento in una pianta di un gene, con le sue sequenze regolatrici, preso dalla stessa specie o da una specie incrociabile. (ingl. *cisgenesis*)

Clonazione per trasferimento nucleare
Tecnica che inserisce il nucleo di una cellula somatica in una cellula uovo privata del proprio nucleo, per ottenere un embrione con il DNA nucleare del donatore. (ingl. *somatic cell nuclear transfer*)

Consenso informato
Accettazione libera di un trattamento o di una ricerca da parte di una persona che ne ha compreso scopi, rischi e alternative. (ingl. *informed consent*)

Farmacogenomica
Studio di come le varianti del genoma influenzano la risposta ai farmaci, per scegliere farmaco e dose adatti al paziente. (ingl. *pharmacogenomics*)

NGT
Nuove tecniche genomiche: mutagenesi mirata (per esempio con CRISPR) e cisgenesi applicate al miglioramento delle piante. (ingl. *new genomic techniques*)

OGM
Organismo, diverso da un essere umano, il cui materiale genetico è stato modificato in un modo che non avviene in natura con l'accoppiamento o la ricombinazione naturale (direttiva 2001/18/CE). (ingl. *GMO, genetically modified organism*)

Plasmide Ti
Plasmide di *Agrobacterium tumefaciens* che trasferisce nelle cellule vegetali un tratto di DNA (T-DNA); modificato, si usa per ottenere piante transgeniche. (ingl. *Ti plasmid*)

Principio di precauzione
Principio secondo cui, se un'attività può causare danni gravi o irreversibili, l'incertezza scientifica non giustifica il rinvio delle misure di protezione. (ingl. *precautionary principle*)

Profilo del DNA
Insieme degli alleli di una persona a un gruppo di loci STR, usato per l'identificazione e i test di parentela. (ingl. *DNA profile*)

Proteina ricombinante
Proteina prodotta da una cellula ospite a partire da un gene introdotto con le tecniche del DNA ricombinante. (ingl. *recombinant protein*)

STR
Brevi ripetizioni in tandem: tratti di DNA in cui una sequenza di pochi nucleotidi è ripetuta un numero di volte che varia fra le persone. (ingl. *short tandem repeat*)

Terapia genica
Introduzione di materiale genetico nelle cellule di un paziente a scopo terapeutico; ex vivo se le cellule sono modificate fuori dal corpo e reinfuse, in vivo se il vettore è somministrato direttamente. (ingl. *gene therapy*)

Topo knock-out
Topo in cui un gene preciso è stato inattivato, usato per studiarne la funzione e come modello di malattie. (ingl. *knockout mouse*)

Transgenico
Detto di un organismo in cui è stato introdotto un gene (transgene) di un'altra specie. (ingl. *transgenic*)

Vaccino a mRNA
Vaccino che contiene un mRNA, protetto da nanoparticelle lipidiche, che le cellule traducono nella proteina antigenica di un agente infettivo. (ingl. *mRNA vaccine*)

Soluzioni

1. B. Transgenico = con un gene di un'altra specie. La selezione artificiale usa la variabilità esistente; un clone è geneticamente identico a un altro individuo.

2. C. L'EPO è glicosilata nel reticolo endoplasmatico e nel Golgi, organuli che i batteri non hanno; senza zuccheri la proteina è instabile e meno attiva.

3. A. L'mRNA è tradotto dai ribosomi nel citoplasma; non entra nel nucleo e non si integra nel DNA.

4. D. Negli anticorpi umanizzati restano del topo solo le regioni che toccano l'antigene; nei chimerici è di topo l'intera regione variabile.

5. A. È una terapia ex vivo: cellule staminali emopoietiche autologhe, vettore retrovirale con il gene *ADA*, reinfusione. Nessun rischio di rigetto.

6. D. I linfociti T del paziente ricevono il gene di un recettore chimerico (CAR) che riconosce una proteina delle cellule tumorali.

7. B. Brevi ripetizioni in tandem, in numero variabile da persona a persona; l'allele si indica con il numero di ripetizioni.

8. C. I geni del tumore sono tolti; si conservano i bordi del T-DNA, che delimitano il tratto trasferito, e i geni *vir*, che lo trasferiscono.

9. D. Le piante di categoria 1 saranno trattate come quelle convenzionali dal luglio 2028; quelle di categoria 2 restano sotto le regole sugli OGM, con adattamenti.

10. V. FDA, ottobre 1982 (Eli Lilly, processo di Genentech).

11. F. Le cellule del midollo sono somatiche: la modifica riguarda solo il paziente. Si trasmetterebbe ai figli solo una modifica della linea germinale (gameti o embrione), vietata dall'art. 13 della Convenzione di Oviedo.

12. V. Un solo locus diverso basta per l'esclusione (dopo aver escluso errori tecnici ripetendo l'analisi).

13. F. Il DNA *nucleare* è della Finn Dorset; il DNA mitocondriale viene dal citoplasma della cellula uovo, cioè dalla Scottish Blackface.

14. F. La proteina Cry agisce solo su alcuni insetti che hanno nell'intestino i recettori specifici; i mammiferi non li hanno e la digeriscono nello stomaco acido.

15. F. La capacità di un AAV è circa 4,7 kb: la sequenza codificante della distrofina (circa 11 kb) non ci sta; si studiano versioni accorciate del gene.

16. Codoni: 1 (AUG) + 191 + 1 (stop) = 193; 193 × 3 = 579 nucleotidi (579 bp). Il gene genomico contiene introni, che i batteri non sanno rimuovere: si usa un cDNA o una sequenza sintetica.

17. In 8 ore ci sono 8 × 60 / 30 = 16 divisioni: $1{,}0 \times 10^6 \times 2^{16} = 1{,}0 \times 10^6 \times 65\,536 \approx 6{,}6 \times 10^{10}$ cellule. In realtà la crescita rallenta perché si esauriscono i nutrienti e l'ossigeno e si accumulano prodotti di rifiuto.

18. a) AUG Met, UUU Phe, GUU Val, UUU Phe, CUU Leu, GUU Val, UUA Leu, UUG Leu: Met-Phe-Val-Phe-Leu-Val-Leu-Leu. b) No: se il nucleoside modificato è letto come U, i codoni e quindi la proteina restano gli stessi; cambiano solo la stabilità dell'mRNA e la reazione infiammatoria.

19. Compatibile: B, uguale alla traccia a tutti e quattro i loci. A è escluso al locus D21S11 (29, 31 invece di 29, 30); C ai loci D8S1179 (12, 14), D18S51 (14, 17) e TH01 (6, 9).

20. a) $P = 0{,}08 \times 0{,}12 \times 0{,}05 \times 0{,}10 \times 0{,}07 = 3{,}36 \times 10^{-6} \approx 3{,}4 \times 10^{-6}$ (circa 1 su 300 000). b) $4{,}0 \times 10^6 \times 3{,}36 \times 10^{-6} \approx 13$ persone. c) Con cinque loci la coincidenza restringe molto il campo ma non identifica una sola persona: servono più loci (i panel attuali ne usano circa 20) e altri elementi di indagine.

21. a) Alleli paterni: TH01 7 (la madre ha dato il 9), vWA 18 (la madre ha dato il 17), FGA 22 (la madre ha dato il 21), D8S1179 13 (la madre ha dato il 14). b) Il presunto padre 2 è escluso a due loci: FGA (20, 23, manca il 22) e D8S1179 (10, 11, manca il 13). c) Il presunto padre 1 ha tutti gli alleli paterni ed è compatibile, ma con soli quattro loci altri uomini potrebbero esserlo: si analizzano più loci e si calcola un indice di paternità.

22. Fattore IX: 1,4 + 1,0 = 2,4 kb, entra. ADA: 1,1 + 1,0 = 2,1 kb, entra. Distrofina: 11 + 1,0 = 12 kb, molto oltre 4,7 kb: non entra.

23. 86 − (21 + 30) = 35 amminoacidi: il peptide C (31) e quattro amminoacidi basici di giunzione.

24. a) Il sospettato 2. b) A tre loci: D3S1358 (18 invece di 17), vWA (19 invece del solo 16) e TH01 (7 invece di 6); coincide solo a FGA. c) La persona è omozigote: ha ereditato lo stesso allele (16) da entrambi i genitori, e il picco unico ha circa il doppio del segnale. d) Per riconoscere e sottrarre il DNA della vittima, che può essere mescolato alla traccia, e per escludere che la traccia sia sua.

25. a) A dona il nucleo (cellula mammaria), B dona la cellula uovo senza nucleo, C è la madre surrogata. b) Nero, perché il DNA nucleare sarebbe quello della Scottish Blackface. c) Dalla cellula uovo di B (Scottish Blackface).

26. a) Il controllo principale è il mais convenzionale senza insetticida; la stessa varietà fa sì che l'unica differenza sia il transgene (variabile indipendente). b) (10,4 − 9,1) / 9,1 × 100 ≈ 14 %. c) Le infestazioni di piralide e il clima cambiano da anno ad anno e da luogo a luogo: una sola prova potrebbe dare un risultato dovuto al caso. d) Lasciare zone rifugio di mais non Bt, dove gli insetti sensibili sopravvivono e si incrociano con eventuali resistenti, e alternare le colture.

27. Traccia: variabile indipendente = presenza del transgene; dipendente = sviluppo della malattia dopo l'inoculo del fungo (per esempio percentuale di foglie colpite). Controlli: piante non trasformate della stessa varietà e piante trasformate con il solo vettore senza il gene; tutte inoculate con la stessa quantità di fungo nelle stesse condizioni. Più linee transgeniche indipendenti (il punto di inserzione è casuale), molte piante per gruppo, disposizione casuale, valutazione «in cieco». Sicurezza: serra di contenimento autorizzata, nessun rilascio di semi o polline, smaltimento controllato del materiale, come prevedono le norme sugli OGM.

28. Traccia: l'insulina non è glicosilata e ha una struttura relativamente semplice (due catene, tre ponti disolfuro) che si può ottenere anche tagliando e ripiegando in provetta un precursore prodotto da batteri o lieviti. EPO e anticorpi sono glicoproteine: le catene di zuccheri si aggiungono nel reticolo endoplasmatico e nel Golgi, che i procarioti non hanno; gli anticorpi hanno quattro catene unite da ponti disolfuro e richiedono chaperoni e un ambiente ossidante per ripiegarsi. Il lievito è eucariote ma glicosila in modo diverso dalle cellule umane: per molte proteine servono cellule di mammifero (CHO).

29. Traccia: domande scientifiche: quanto β-carotene arriva nel chicco e quanto ne resta dopo conservazione e cottura? quanto se ne assorbe e converte in vitamina A in persone malnutrite? (risolvibili con misure e studi di nutrizione). Economiche e politiche: chi controlla semi e licenze, se i coltivatori possono riseminare, se conviene investire in integratori, diversificazione della dieta o biofortificazione. Etica: è giusto ritardare una possibile soluzione per un rischio non dimostrato, o introdurla senza il consenso delle comunità? Nelle Filippine la corte d'appello (aprile 2024) ha revocato l'autorizzazione del 2021 applicando il principio di precauzione: ha ritenuto che mancasse un consenso sulla sicurezza e ha posto l'onere della prova su chi proponeva la coltivazione.

30. Traccia di risposta: a) per esempio insulina = gene (cDNA) in un plasmide di espressione, batteri o lieviti, purificazione e maturazione; CAR-T = linfociti T del paziente modificati con un vettore virale. b) Sicurezza dei vettori (mutagenesi inserzionale, reazioni immunitarie), sperimentazioni in più fasi su pochi pazienti per malattie rare, produzione in condizioni controllate, valutazione delle agenzie. c) Educazione civica: diritto alla salute e sostenibilità

dei costi; ruolo di Telethon, enti di ricerca, Servizio sanitario nazionale. d) Storia: Asilomar e il principio di precauzione prima delle applicazioni. Termini chiave: DNA ricombinante, vettore, terapia ex vivo, CRISPR, consenso informato.

31. Traccia di risposta: tre «fabbriche» diverse: per l'epatite B la proteina antigenica è prodotta da un lievito e purificata (vaccino a subunità); nel vaccino a mRNA la proteina è prodotta dalle cellule della persona, e la nanoparticella lipidica è il biomateriale che protegge e trasporta l'mRNA (capitolo 6); l'insulina è prodotta da batteri o lieviti come precursore e maturata in provetta, con tre ponti disolfuro essenziali per la struttura terziaria (capitolo 8). I due vaccini stimolano la risposta immunitaria adattativa e la memoria (vol. 4, cap. 10); l'insulina sostituisce un ormone che manca nel diabete di tipo 1 (vol. 4, cap. 12). Termini chiave: proteina ricombinante, glicosilazione, antigene, memoria immunitaria.

32. Traccia: la mutagenesi inserzionale è un danno causato dall'integrazione di un vettore nel genoma: se il vettore si inserisce in un gene lo può interrompere, se si inserisce vicino a un gene che controlla la proliferazione lo può accendere con i suoi promotori, e una cellula staminale emopoietica può dare origine a una leucemia. Un AAV usato in vivo resta per lo più come DNA separato dai cromosomi, quindi raramente si integra. La modifica riguarda comunque cellule somatiche, non i gameti: non passa ai figli.