

## Incontri con i protagonisti della ricerca internazionale

Tra i partecipanti, alcuni assoluti protagonisti della ricerca nazionale e internazionale: Elena Cattaneo, Alberto Mantovani, Michele De Luca, Fabrizio Benedetti, Lamberto Maffei, Mark Hanson, John Harris e quattro premi Nobel: Luc Montagnier, Andrew Fire, Erwin Neher e Kary Mullis. Reading, spettacoli, giochi e tre mostre legheranno l'immaginario medico con quello cinematografico, teatrale, televisivo e letterario

### BIOELETTRICITÀ

## Più sani se i nostri canali ionici funzionano

di Erwin Neher\*

La bioelettricità è stata ritenuta a lungo un fenomeno che si poteva osservare soltanto in un «tessuto eccitabile», i nervi e i muscoli per esempio, come Galvani e Volta avevano fatto vedere con bellissimi esperimenti alla fine del Settecento. L'impulso nervoso o «potenziale d'azione» è senz'altro la manifestazione più spettacolare della bioelettricità e per due secoli se n'è cercata assiduamente la base fisico-chimica. Nei primi anni Cinquanta, i fisiologi britannici Alan L. Hodgkin e Andrew F. Huxley sono riusciti a dimostrare che l'impulso è causato da variazioni nella permeabilità della membrana nervosa, le quali portano a loro volta al flusso dei cationi più abbondanti nel nostro fluido corporeo: so-

dio (Na<sup>+</sup>) e potassio (K<sup>+</sup>).

Quando io e Bert Sakmann abbiamo cominciato a chiederci qual era la causa di queste variazioni, pensavamo ancora che la risposta avrebbe risolto soltanto una questione riguardante l'eccitabilità dei nervi. Volevamo provare che i «canali ionici», i pori della membrana, si aprono e si chiudono per generare in momenti ben precisi la corrente che dà l'avvio all'impulso nervoso. Per avere quella prova, abbiamo dovuto sviluppare un metodo per misurare la corrente 100 volte più sensibile di quelli che esistevano allora. Il metodo ci ha permesso di registrare gli impulsi quando i canali ionici si aprono per brevissimo tempo.

Ma la possibilità di misurare le correnti di membrana non era soltanto la prova del ruolo dei canali ionici nell'impulso nervoso, ha anche rivelato che sono presenti in tutti i tipi di cellule del nostro corpo, dove svolgono svariate fun-



# Bologna medicina

WWW.BOLOGNAMEDICINA.IT



DISSEZIONI | Il teatro anatomico di Bologna

o della terapia genica di tali difetti, conoscere la causa apre nuove strade per cercare una cura. Gli studi che utilizzano i tessuti delle biopsie, o quelli differenziati ottenuti con cellule staminali, consentono ai ricercatori di collegare manifestazioni cliniche, come le aritmie cardiache, a sottili particolari della funzione di singoli canali ionici. Ci aspettiamo che i confronti tra linee cellulari normali e quelle derivate da pazienti portino a conoscenze dei meccanismi patologici migliori di quelle fornite dagli animali transgenici usati come modello. Provare su linee cellulari umane le molecole promettenti dovrebbe permettere di prevederne le probabilità di successo negli esperimenti clinici meglio di quanto sappiamo fare con i metodi attuali.

- Premio Nobel per la Medicina 1991

(Traduzione di Sylvie Coudyot)

© RIPRODUZIONE RISERVATA



### LOTTA AL CANCRO

## Come armare il nostro sistema immunitario

di Alberto Mantovani

Negli ultimi anni in Medicina abbiamo assistito all'avverarsi di un sogno lungo 100 anni: nella lotta al cancro, le armi del nostro sistema immunitario si sono affiancate con successo alle terapie più tradizionali: chirurgia, chemio e radioterapia, terapie mirate. Gli anticorpi, innanzitutto; in particolare i cosiddetti «monoclonali», prodotti in quantità illimitata. Dotati di grande specificità, come missili mirati contro le cellule tumorali, hanno rivoluzionato la diagnostica e la cura dei linfomi e di alcuni tumori solidi come colon e mammella. E ci auguriamo che, in futuro, migliorino sempre più la vita dei pazienti: tra i nuovi farmaci in sperimentazione, uno su tre è un anticorpo. La nuova frontiera, poi, è coniugare agli anticorpi i farmaci chemioterapici, portandoli direttamente contro il cancro e riducendone la tossicità sui tessuti sani. Nella lotta ai tumori abbiamo imparato ad utilizzare anche un altro componente del sistema immunitario: le citochine, ovvero le «parole» dell'immunità: segnali di comunicazione che permettono al sistema immunitario di attivarsi e ne regolano la risposta. Alcune di queste «parole» sono già entrate in uso clinico: i fattori di crescita emopoietici, che aiutano a

contrastare gli effetti nocivi della chemioterapia, l'interleuchina-2 e gli interferoni, usati per curare alcuni tipi di tumori come il melanoma. E nel futuro speriamo di ampliare l'utilizzo di queste «parole»: ad esempio per ridurre le cellule del sistema immunitario, inducendolo ad attivarsi contro il bersaglio-cancro. Proprio dalla consapevolezza che il sistema immunitario non aggredisce il cancro come dovrebbe, infatti, perché da esso viene corrotto o addormentato, stanno derivando nuovi approcci terapeutici, mirati a togliere alle nostre difese i «freni» che il tumore attiva.

Recentemente è stato approvato l'uso clinico di anticorpi che bloccano alcuni di questi «freni molecolari» contro il melanoma: sono CTLA4, PD1 e PDL1. E a breve ci attendiamo l'entrata in clinica di ulteriori anticorpi mirati contro freni diversi. Ancora, alcune cellule del sistema immunitario, i macrofagi, si comportano come poliziotti corrotti che aiutano il cancro: farmarli costituire una linea di lavoro che sta muovendo i primi passi in clinica. Anche le cellule dell'immunità sono entrate a far parte dell'arsenale terapeutico contro i tumori. Siamo capaci di prelevare le cellule T del sistema immunitario, farle crescere, educarle ad un determinato scopo (ad esempio con una tecnologia costituita da recettori chimerici, CAR) e poi reinfonderle nei pazienti: le terapie cellulari stanno muovendo i primi passi in clinica con risultati incoraggianti, ad esempio

nei tumori ematologici. Grazie ad Airc, in Italia sono stati attivati per le leucemie protocolli innovativi di terapia cellulare basati sull'attivazione delle cellule Killer o *Natural Killer*, componenti del sistema immunitario con la naturale capacità di uccidere: cellule potenzialmente in grado di sopprimere il cancro, ma che vengono come «disarmate» da esso. Infine, contro il cancro abbiamo imparato ad utilizzare i vaccini. Quelli preventivi sono già realtà. E infatti in uso clinico quello contro l'epatite B, in grado di prevenire questa malattia e i cancri del fegato causati dal virus che ne è responsabile. Così come il vaccino contro il *Papilloma virus* (HPV), che provoca il tumore della cervice uterina e, nell'uomo, alcuni cancri di testa e collo nell'uomo: un vero e proprio flagello responsabile, ogni anno, di circa 250 mila morti nel mondo. I vaccini terapeutici, invece, rappresentano la nuova frontiera: una sfida, ma anche una speranza concreta, su cui si sta lavorando in tutto il mondo. Si tratta di vaccini basati sull'identificazione e il riconoscimento - da parte del sistema immunitario - di strutture presenti sulla cellula tumorale, e sull'utilizzo di cellule sentinella capaci di riattivare la risposta immunitaria. Per il futuro, approfondire la conoscenza della macchina straordinaria delle nostre difese naturali ci permetterà di imparare a guidarla sempre più, e sempre meglio, contro i tumori.

© RIPRODUZIONE RISERVATA

Mezzogiorno. I cittadini si trovarono quindi sprovvisti di adeguate informazioni, facendo nascere molte dicerie infondate riguardo la diffusione della malattia e i mezzi più adeguati per combatterla. Questo nonostante l'Italia sia stata uno dei primi paesi colpiti dalla seconda ondata della pandemia, quella più grave: l'influenza si presentò infatti una prima volta nella primavera del 1918, con gli stessi sintomi ma con mortalità nella media. In estate, dopo la ricombinazione con un virus di origine animale, ebbe inizio la strage: i primi casi furono segnalati negli stessi giorni nel sud Italia e nel porto francese di Brest, da dove poi il contagio si espanse agli Stati Uniti. La comunità medica dell'epoca era impotente e divisa: incapace di trovare un rimedio a quella che per molti era un'infezione batterica dovuta al cosiddetto bacillo di Pfeiffer (un'ipotesi che aveva comunque incontrato molto scetticismo in tutto il mondo), aveva visto fallire tutti i tentativi terapeutici e profilattici e assisteva al ritorno di credenze popo-

lari e al proliferare di rimedi al limite della ciarlataneria.

L'influenza scomparve nella primavera del 1919, ripresentandosi poi nei due anni successivi: i dati sulla mortalità ci dicono che ancora fece più vittime del normale, ma l'immunizzazione acquisita dall'ondata precedente rese molto meno drammatico il bilancio. Ci sono voluti molti decenni per risolvere, almeno in parte, il mistero della Spagnola: dal permafrost in Alaska, sono stati riesumati cadaveri che nei tessuti polmonari conservati dal ghiaccio hanno permesso la ricostruzione del virus. Un'impresa già tentata negli anni Cinquanta ma poi portata a termine con successo solo grazie alle tecniche molecolari alla fine del XX secolo. Grazie agli esperimenti su animali modello (in particolare i furetti) il comportamento del virus del 1918 è stato studiato a fondo, per capire come mai fu così infettivo e letale: il segreto stava nella capacità di suscitare reazioni immunitarie anormali, che ne hanno facilitato la diffu-

sione e causato quella strana mortalità nei giovani adulti. Per quest'ultimo aspetto, va inoltre considerata la storia delle epidemie influenzali, poiché con ogni probabilità gli ultra quarantenni godevano dell'immunità conferita dalla violenta epidemia che nel 1890 colpì l'Europa (la cosiddetta «Russa»). Studiare i virus influenzali, passati e presenti, può quindi darci molte informazioni sul futuro: la principale eredità della Spagnola è stata la creazione di strutture globali di monitoraggio in grado di rispondere rapidamente alle epidemie, come dimostrato negli ultimi anni dagli allarmi sulle varie avarie, suine, Sars, ecc. La lezione del 1918, quando il conflitto impedì una coordinazione internazionale efficace (tanto che si chiama spagnola perché la neutra Spagna fu l'unica a far filtrare le notizie sulla gravità dell'epidemia), sembra essere stata imparata, ma purtroppo non è mai troppo tardi per commettere antichi errori.

© RIPRODUZIONE RISERVATA

### LA LUNGA VITA - ISTRUZIONI PER L'USO / 2

## La notte della Pcr sulla strada 128

di Kary Mullis\*

Oggi in biologia molecolare la maggior parte della gente non ha l'età di ricordare il pre-PCR. Ma provate a farne a meno e vedrete quanta differenza fa una tecnica piccola e semplice. «Reazione a catena della polimerasi» si trova nei vocabolari, e se mettete «PCR» su Google escono 18 milioni di hit. Fatelo con «pcr song» e arrivate a una deliziosa canzoncina di BioRad che vi frullerà nel cervello come un gatto impazzito nel garage. Provatela.

Quando mi sono imbattuto nella PCR, nella primavera del 1983, cercavo di incrementare la domanda di oligonucleotidi, brevi sequenze di Dna o di Rna che prima dell'automazione, erano fatte a mano. La nuova macchina dell'amico Ron Cook della Bioscience, sull'altro lato della baia di San Francisco, metteva a rischio posti di lavoro nel nostro laboratorio: faceva in otto ore il nostro lavoro di circa tre settimane - ogni otto ore e niente pause. Ci sono riuscito, la domanda è stata moltiplicata per un milione e alla Cetus nessuno è stato licenziato.

Ero sulla strada tra Cloverdale e Boonville, nella contea di Mendocino, andavo nella mia baita per il week-end. La mia ragazza dormiva, io ero funzionalmente sobrio (o la strada non me l'avrebbe perdonato), era notte tarda e mi sentivo strano. Non vedevo niente.

### Potete immaginare un mondo senza «reazione a catena della polimerasi»? Era il 1983 e una strana avventura portò il futuro Nobel a scoprirla

O ero fuori dal tempo. Quel tipo di strada, insomma. E a metà di quelle 46,58 miglia al contatore, in pochi minuti la mia vita stava per subire una svolta colossale. Gli oligonucleotidi sono fantastici. Con uno solo si può localizzare un punto particolare sul Dna. Nei primi anni Ottanta, non c'era verso di esserne certi: i gel dell'intero Dna umano, sezionato in frammenti di restrizione sondati con una serie di 20 oligo, erano pieni di sbavature. Per guardare da vicino una sequenza di Dna umano, toccava clonarla. Sminuzzarla a pezzetti di qualche migliaio di coppie di basi, da isolare una per una coltivando in particolari colonie di batteri, scoprire quale conteneva il pezzo preferito e crescerlo. Magia della clonazione. La sentivamo tutti, anche i custodi che di notte passavano la scopa nei laboratori.

Alla fine degli anni Settanta, biologi molecolari di rango avevano convinto tutti gli altri a fermarsi e pensare un po' alla sicurezza. Si convocavano conferenze, si promulgavano perfino leggi a Cambridge, Massachusetts, e a Berkeley, California. Noi di Emeryville, bische tante e leggi poche, eravamo tranquilli. Infilare geni umani in microrganismi che potevano infettare gli esseri umani forse non era buona idea. Non c'era verso di sapere ma si poteva trovare un compromesso. Fu deciso che alcuni ceppi di *Escherichia coli* avevano meno probabilità di provocare una catastrofe e accettammo di usare solo quelli. L'E. coli K12 non risolveva il problema della nuova macchina che sintetizzava oligo, né quello di stabilire velocemente se il Dna di un embrione conteneva o meno una mutazione sfortunata e di dare ai genitori la scelta di abortire. Inconsciamente, ho incrociato i due problemi. Mi sono messo a progettare metodi che usavano nucleotidi per identificare mutazioni in una sola coppia di basi dell'intero genoma, così le donne incinte non avrebbero più dovuto aspettare i clonatori. Ma i risultati dei gel e delle sonde radioattive erano sfocati, e per decidere tra la vita o la morte, un gel sfocato non va bene. Qualcuno doveva trovare un sistema per concentrare un locus di Dna e solo quello, in presenza di milioni di loci simili eppure diversi, senza l'inevitabile ritardo della clonazione. Stava per accadere quella notte. Il qualcuno sarei stato io e dieci anni dopo a Stoccolma, avrei

brindato alla salute dei reali di Svezia.

Sulla strada 128 sporgevano i grappoli bianchi e rosa dei castani, nella luce dei fari sembravano freddi eppure erano carichi di essenze calde che dominavano l'odorato. Sembrava la notte dei castani in fiore, ma qualcos'altro stava fremendo. La piccola Honda ci issava su per le montagne, nelle maniscenti la strada, le curve, ma agevolamente in laboratorio. Catene di Dna fluttuavano e s'attorcigliavano, immagini sgargianti, blu e rosa, di molecole elettriche s'intromettevano tra i miei occhi e la strada. Vedo le luci negli alberi, ma sto osservando tutt'altro. Mettiammo di estendere un oligo sintetico che deve complementare una base sola sul suo bersaglio di Dna utilizzando la Dna-polimerasi e i deossiribonucleotidi trifosfato, quattro provette contenenti ciascuna le quattro basi, e una sola base in ogni provetta taggata alfa con il <sup>32</sup>fosfato. Da ottimisti potremmo scoprire l'identità del nucleotide sul bersaglio di Dna. Il sequenziamento di deodidassi funziona così. Però. PERÒ... solo con il Dna clonato, quando il rapporto bersaglio/non bersaglio è ridotto di circa un milione. Meno male, quella notte non pensavo a quello che poteva andare storto, oltre alla scarsissima probabilità di centrare unicamente la sequenza giusta. Dedico al problema l'attenzione che bastava al mio piano: usare due nucleotidi, uno per ogni filamento della sequenza bersaglio che converge da ogni lato fino alla coppia di basi. Nella miscela denaturata della reazione i due lati sarebbero stati molto distanti ma comunque complementari e se uno mi diceva «T», l'altro doveva dirmi per forza «A». Senza un gran controllo, ma di oligo ne avevo finché volevo. Anzi, stavo proprio cercando di sprecare una manetta. Almeno tre fraintendimenti mi spingevano verso la PCR. Ero vicino, ma non sapevo a che cosa. Credevo che la mia procedura avrebbe funzionato. Idea altamente improbabile, data la complessità del campione che la PCR avrebbe risolto da lì a poco. E guidavo.

Il terzo fraintendimento, meno ovvio, era condiviso dai miei colleghi. Esisteva un enzima, la fosfatasi alcalina batterica detta Bap, che poteva eliminare gli ipotetici deossinucleotidi trifosfato. Ne avrebbe tagliato la coda di trifosfato in un lampo. Ma prima di aggiungere i miei preziosi dideossi, avrei dovuto tagliare la coda all'enzima e sarebbe stata dura. Stavo quindi considerando altri mezzi per liberarmi dai deossinucleotidi trifosfato. Il *Klenow*! La polimerasi che intendeva usare comunque. Un oligo di partenza, una sequenza di Dna come matrice, e avrebbe polimerizzato tutti i nucleotidi. Eccola... la PCR! Ma non riuscivo ancora a vederla.

Una sovrabbondanza di oligomeri, aggiunti di fresco, sarebbero atterrati sui filamenti - bersaglio e, incrociando le dita, un nucleotide radioattivo li avrebbe estesi. Che cosa poteva andare storto? E se nella fase «facciam fuori il trifosfato», gli oligomeri fossero stati estesi tanto, ma proprio tanto? Ho fermato la Honda sull'orlo della strada, i camion di legname quasi la sfioravano. Eravamo in pericolo io, la mia ragazza che continuava a dormire, e la mia invenzione, ma dovevo capire cosa sarebbe successo agli oligo estesi proprio tanto. Con altri oligo, i prodotti della loro estensione si sarebbero estesi a loro volta. Avrei raddoppiato il segnale, ancora e ancora con quei deossinucleotidi sovrabbondanti che costavano poco, erano solubili in acqua e in California erano legali. Mi conveniva fermarmi in un altro posto. Poco più avanti sulla 128 c'era un'area di sosta. Il tempo di arrivarci, i tasselli si erano incastrati. Tre cicli avrebbero creato una molecola di Dna a doppio filamento e dieci cicli mille e trenta circa un miliardo. Il prodotto sarebbe stato auto-catalitico, avrebbe sommerso tutti gli altri. Non ho dormito quella notte. L'indomani mattina ho comprato due bottiglie di Pinot Noir delle Navarro Vineyards e a metà pomeriggio sono piombato in un sonno agitato. Nella baita, c'erano diagrammi di PCR su ogni superficie disegnabile e matita. Mi sono svegliato in un nuovo mondo.

- Premio Nobel per la Chimica 1993

(Traduzione di Sylvie Coudyot)

© RIPRODUZIONE RISERVATA

### DOPO IL CASO CINESE

## Bioetica senza inutili allarmismi

di Gilberto Corbellini

I biologi molecolari fanno cose sempre più «fantascientifiche» manipolando le molecole, ma non riescono a imparare niente sulla natura umana. Come in una divertente e storica vignetta dove la caricatura di un biologo molecolare diceva: «Ho sequenziato il genoma umano ma non capisco le donne». Ovvero credono (si, credono) i biologi molecolari e affini che società, opinione pubblica, etc. - che sono poi astrazioni - siano in ascolto religioso delle loro istanze e apprezzino il loro senso di responsabilità, quando essi dicono che certe cose è meglio non farle perché c'è qualche rischio, o perché si superano dei confini etici, etc. Non è così. La società/opinione pubblica è fatta di esemplari della specie umana che sappiamo abbastanza bene come reagiscono a questi annunci: i neuroscienziati cognitivi hanno fatto centinaia di esperimenti, alcuni dei quali non meno credibili di quelli che fanno i biologi molecolari, da cui risulta che la comunicazione da parte degli scienziati su questioni controverse è normalmente fraintesa, cioè influenzata da intuizioni ed emozioni poco pertinenti al caso in questione.

Nella recente vicenda che ha visto un gruppo di ricercatori cinesi applicare al Dna di embrioni umani, partendo dalla cellula fertilizzata, una nuova tecnologia che consente di riscrivere e quindi correggere l'informazione genetica, si è scatenata una mezza tempesta. Da qualche tempo, cioè da quando si era visto che questa tecnica è molto efficiente sulle cellule somatiche e su embrioni di topo, si era capito che presto si sarebbe passati all'uomo. Ma i cambiamenti che essa consente di introdurre negli embrioni umani diventano ereditari, cioè passerebbero alle future generazioni. E così un gruppo di biologi molecolari storici, alcuni dei quali avevano firmato già la moratoria sul Dna ricombinante quarant'anni fa, ha chiesto un'altra moratoria, oggi su questo nuova tecnica chiamata CRISPR/Cas9. Non si sono ricordati o non hanno imparato che l'allarme lanciato sul Dna ricombinante fu una delle cause per cui montò una sorta di panico pubblico verso l'ingegneria genetica. Panico che in paesi culturalmente arretrati come l'Italia ancora paghiamo sotto forme di divieto per la ricerca e la coltivazione di ogni vegetale.

Ora, i cinesi hanno bellamente ignorato l'invito alla moratoria e hanno provato la tecnica su 86 embrioni umani portatori di beta talassemia, rimasti dopo fertilizzazione che li rendevano non impiantabili. Hanno fatto qualcosa di male? È vero che *Science* e *Nature* non hanno pubblicato i risultati dell'esperimento per motivi etici? Abbiamo scoperto che l'etica pubblica e quella medica in Cina sono diverse rispetto a quelle occidentali? Vogliamo ripetere gli psicodrammi vissuti con la nascita della prima bambina in provetta (1978) di Dolly (1996), che non hanno fine provocato alcuna tragedia per l'umanità? Che cosa si potrebbe credibilmente fare di male o di bene con questa tecnica, sul piano di cambiamenti genetici che passerebbero alle future generazioni?

L'esperimento non è stato neppure inutile perché si è visto che l'efficienza dell'intervento è ancora molto bassa e che la tecnica introduce nuove mutazioni. Insomma è molto rischioso, quindi sarebbe criminale usarla su embrioni umani e non si deve consentire alcuna sperimentazione che lasci sviluppare gli embrioni sui quali si è stata applicata. Nel mondo liberale e democratico è molto facile da farsi. Invece di chiedere moratorie generiche basterebbe mettere poche e chiare regole, che consentano comunque di proseguire la ricerca di base, perché solo studiando i limiti e le potenzialità di questo nuovo sistema di intervento biochimico sul genoma nei laboratori occidentali si riuscirà in qualche modo a dissuadere gli avventurieri dall'abusarne.

© RIPRODUZIONE RISERVATA