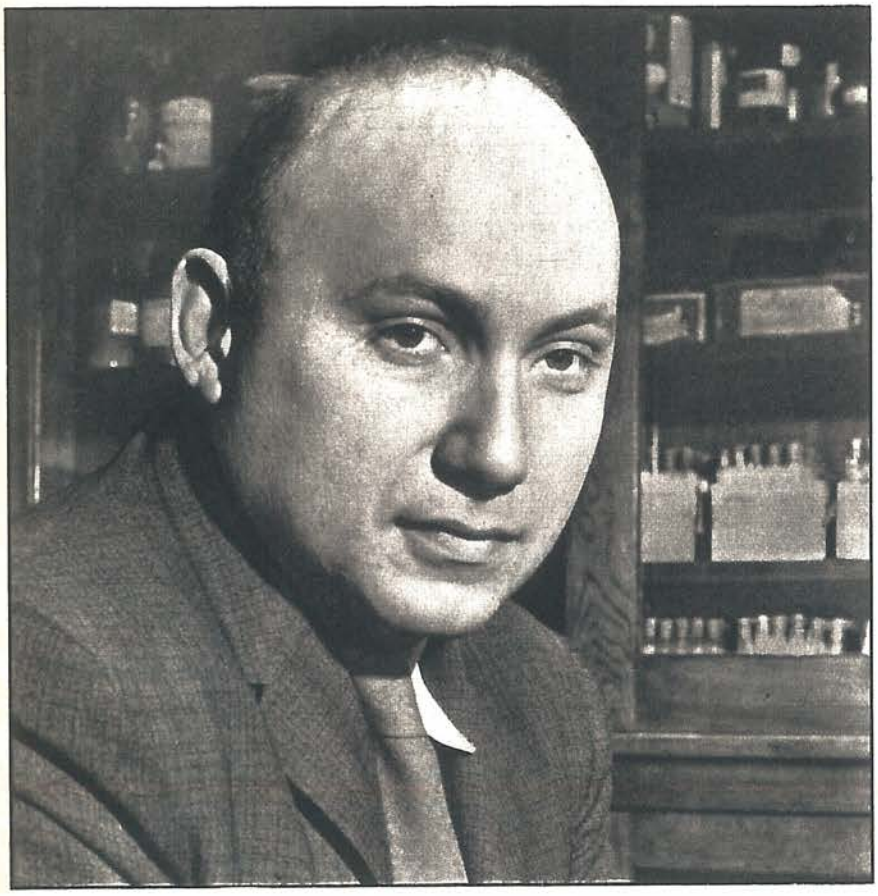
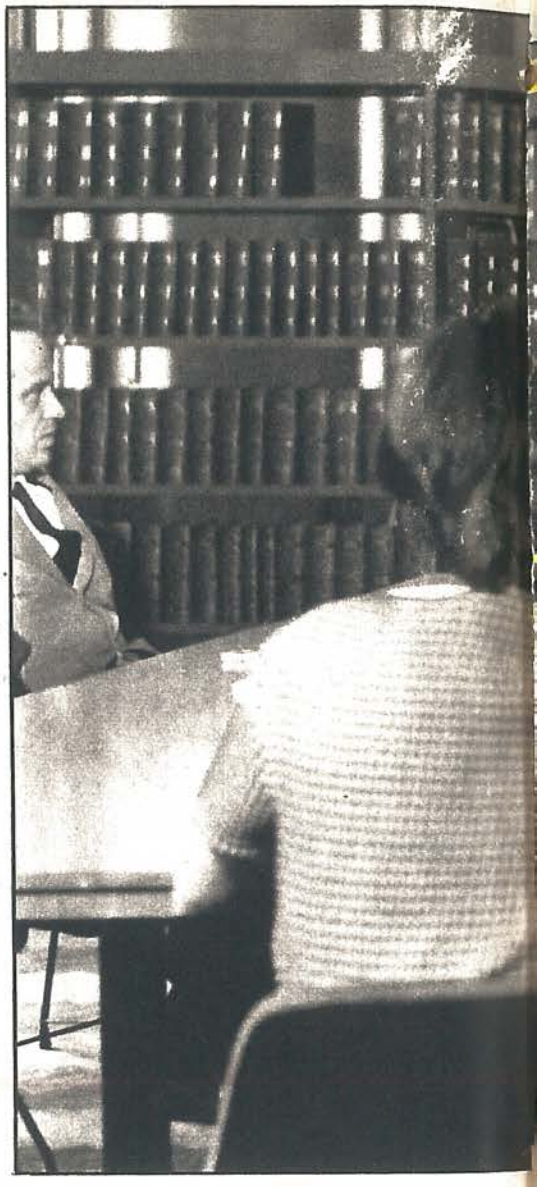
Colloquio in redazione con il Nobel Lederberg





E' venuto a visitare la redazione di *Tempo Medico*, il professor Joshua Lederberg; aveva partecipato al simposio di genetica biochimica organizzato a Napoli dalla Ciba Foundation, aveva svolto un breve ciclo di lezioni presso l'Università di Pavia. Benchè per la prima volta in Italia, Lederberg conta tra noi molti amici: tra gli altri, il direttore di *Tempo Medico*, professor Niccolò Visconti (che negli Stati Uniti trascorse alcuni anni come virologo) e il professor Luca Cavalli-Sforza, che è stato suo diretto collaboratore.

Ma chi è, per il pubblico medico italiano, Lederberg? Per pochi specialisti di microbiologia e genetica, è un genio. Per chi ha memoria cronistica, è il vincitore del premio Nobel per la medicina 1958. Per i più, è quasi uno sconosciuto.

E' probabile che molti si siano domandati perchè mai l'ultimo Nobel di medicina sia andato a tre studiosi i cui nomi ricorrono raramente nelle pubblicazioni mediche: una metà a Lederberg, l'altra metà, congiuntamente, a G. W. Beadle ed a E. L. Tatum.

Eppure, raramente il massimo riconoscimento scientifico internazionale era stato altrettanto meritato da ricercatori le cui osservazioni avessero così grandemente contribuito a rinnovare il pensiero biologico. Per Lederberg la motivazione del premio Nobel si riferisce alle sue «scoperte riguardanti la ricombinazione e l'organizzazione del materiale genetico dei batteri». Anche Beadle e Tatum sono genetisti dei microrganismi. Commentando i loro contributi, il professor Caspersson, relatore ufficiale a Stoccolma, disse fra

Perchè Lederberg, che non è medico, ha avuto il Premio Nobel per la medicina?
E' la prima cosa che gli abbiamo chiesto, quando è venuto a trovarci in redazione. Con l'intervista pubblichiamo due note, una a pagina **44**, sul metodo escogitato da Lederberg per chiarire la natura dell'antibiotico-resistente, l'altra a pagina **46** sull'attualità e sulle prospettive della microbiologia dopo gli studi di Lederberg, Beadle e Tatum.

Nelle fotografie: a sinistra, Lederberg nel suo laboratorio in California; a destra, Lederberg nella nostra redazione; alla sua sinistra il direttore di «Tempo Medico».



l'altro che questi studi «influenzeranno la futura linea d'attacco al cancro». Nobel a trentatrè anni, Lederberg ha bruciato le tappe della carriera scientifica. Al secondo anno di medicina, nel 1946, decise che avrebbe potuto rendersi più utile con la ricerca anzichè con la pratica medica. Si guardò attorno e chiese di poter lavorare come tecnico con un giovane batteriologo, i cui studi gli parevano particolarmente interessanti: era Tatum uno degli studiosi (l'altro era Beadle) con i quali egli doveva dividere, dodici anni dopo, il Nobel.

Subito promosso da tecnico ad assistente, l'anno successivo Lederberg aveva già dimostrato che i «batteri hanno una loro vita sessuata sui generis, cioè possono riprodursi per l'unione di due individui che si scambiano materiale genico».

Conseguito il dottorato in microbiologia nel 1948, Lederberg divenne assistente, quindi professore associato nell'Istituto di Genetica all'Università di Madison. Qui, in collaborazione con N. D. Zinder, parallelamente agli studi di Cavalli-Sforza in Italia, riconobbe varie modalità di scambio genetico tra i batteri. Particolarmente importante, per le implicazioni che esorbitano dalla batteriologia, fu il riconoscimento della *trasduzione*, cioè della possibilità che elementi ereditari si trasferiscano da una cellula all'altra, veicolati da virus.

Nel 1954, a soli ventinove anni, Lederberg era già professore ordinario. Dall'inizio di quest'anno, Lederberg è professore di Genetica e Biologia nella Facoltà Medica all'Università di Stanford, California.

Di medicina: perchè?

Perchè ti è stato assegnato il Premio Nobel di Medicina?

Lederberg: Non so: forse perchè il premio di Medicina comprende anche la fisiologia, e più ampiamente la biologia.

La domanda non era stata posta per mettere alla prova la tua modestia. Vorremmo che tu spiegassi, per i colleghi che leggono TEMPO MEDICO, quali implicazioni

d'ordine teorico e pratico per la medicina, discendono dai tuoi studi e da quelli di Beadle e di Tatum.

Lederberg: I contributi più importanti sono di ordine teorico, poichè hanno consentito di allargare le nostre precedenti nozioni sulla struttura e sul modo d'azione dei geni. Gli studi di Beadle e Tatum con la Neurospora hanno consentito di provare con certezza che il gene è non solo l'unità elementare di trasmissione ereditaria dei caratteri, ma anche l'unità d'azione biochimica primaria della cellula. Tutto il metabolismo della cellula, passo per passo, è controllato dai geni attraverso gli enzimi.

Tra i riflessi più immediati dei tuoi studi sulla medicina applicativa, non è da annoverare la nuova interpretazione dei fenomeni di resistenza dei batteri agli agenti chemioterapici?

Lederberg: Sì, certo. E' ormai indubitabile che il ceppo infettante diventa, *in vivo* come *in vitro*, resistente all'antibiotico somministrato, non perchè l'antibiotico induca la resistenza modificando il batterio (nè tantomeno, come crede il pubblico, perchè il malato si abitui al farmaco), ma perchè l'antibiotico seleziona quelle forme batteriche resistenti, *spontaneamente* insorte per un fenomeno mutativo, le quali si originano di continuo ma in piccolo numero dal tipo più comune.

In presenza dell'antibiotico esse sono evidentemente avvantaggiate e soppiantano le forme sensibili. Abbiamo potuto darne una dimostrazione sperimentale inconfutabile. Strano, è un'idea così semplice (mi pare che in italiano si dica « l'uovo di Colombo ») eppure vi sono molti batteriologi che ancora non sembrano del tutto convinti. A sostegno dell'altra spiegazione, che cioè la resistenza sia direttamente indotta dall'antibiotico, si cita il caso dei cosiddetti enzimi adattativi, cioè di quegli enzimi che, apparentemente assenti dalla cellula in condizioni ordinarie, si producono in gran copia in seguito ad uno stimolo particolare (di solito, ma non esclusivamente, in presenza del substrato specifico).

Per le cellule batteriche abbiamo potuto dimostrare che anche la comparsa di un enzima adattativo è condizionata dalla potenzialità genetica della cellula a produrlo; il substrato, o più genericamente la sostanza induttrice, non fa che scatenare la sintesi di un prodotto che la cellula sa già come produrre. A tali dimostrazioni siamo giunti poichè eravamo fermamente convinti che un agente esterno, l'antibiotico o l'induttore, non potesse specificamente modificare l'informazione, cioè il patrimonio genetico di cui la cellula è dotata. Soltanto la mutazione dall'interno, o l'apporto di nuovo materiale genico dall'esterno, possono modificare il corredo genetico: questo consiste appunto in una somma di informazioni specifiche indelebilmente scritte nel materiale genico della cellula (gli acidi nucleici).

Caspersson ha sottolineato che le tue osservazioni avranno molto probabilmente un'importanza determinante per i futuri studi sulle neoplasie. Che ne dici?

Lederberg: E' prematuro affermarlo. Probabilmente, Caspersson si riferiva alle nuove relazioni, emerse dagli studi sulla trasduzione, tra virus e patrimonio genetico della cellula infettata. Sino a non molto tempo fa, i virus che attaccano i batteri, i batteriofagi, erano considerati agenti patogeni che si comportavano con il batterio come quest'ultimo si comportava con gli organismi superiori: si riteneva che entrassero nell'ospite e si moltiplicassero a spese del metabolismo di quest'ultimo, ma in maniera relativamente autonoma, producendo sostanze tossiche dalle quali derivano malattia o morte del soggetto infettato. I fenomeni di trasduzione, invece, hanno dimostrato che i fagi prendono intimo contatto con il patrimonio genetico del batterio e, passando dalla cellula infettante alla cellula infettata, portano pezzi di cromosoma dall'una all'altra. Ma vi è di più: alcuni fagi, entrando nella cellula ospite, inducono la comparsa di nuovi caratteri: per esempio, determinate specificità antigeni, o addirittura (nel caso del bacillo della difterite), la capacità a produrre la tossina difterica. Sembra quindi che il fago stesso costituisca una parte del corredo cromosomico batterico. Molti fagi perdono temporaneamente la capacità litica: entrati nell'ospite, non si riproducono tumultuosamente provocandone la morte, ma si sottomettono docilmente alle stesse regole che determinano l'ordinata divisione della cellula batterica. Questa perciò trasmette alla prole il fago *temperato* come un normale carattere ereditario. Infine, la maggior parte dei fagi che inducono la trasduzione vanno a localizzarsi in determinati punti del cromosoma batterico; possono essere considerati come parassiti, o simbionti, o *alter ego*, di un dato tratto cromosomico. Quando si pensa che in questi ultimi anni si sono moltiplicate le dimostrazioni dell'origine virale di molte malattie neoplastiche riguardanti non solo gli uccelli ma anche i piccoli mammiferi di laboratorio, è evidente la connessione tra gli studi anzidetti e le neoplasie. E' possibile che le due teorie, infettiva e mutazionale, sino ad ora considerate antitetiche e reciprocamente esclusive, in realtà finiscano per identificarsi. Comunque, un grande progresso è alle porte: l'impiego



IL VIRUS DEI BATTERI

Particelle di batteriofago usato per la trasduzione al microscopio elettronico.

di culture disperse di cellule umane per studi virologici e genetici, da usare come se si trattasse di culture batteriche.

Ritieni che nei prossimi anni vi saranno fondamentali progressi in biologia e specificamente in medicina?

Lederberg: Non ne dubito. I progressi della tecnologia nei vari settori, dalla fisica alla chimica, aumenteranno grandemente le possibilità della terapia. Ma progressi fondamentali possono derivare soltanto da una migliore comprensione dei fenomeni di base. In biologia vi sono ancora troppi problemi cui non può essere data soddisfacente spiegazione Bisogna affrontarli con idee nuove,

con impostazione del tutto anticonformista.

Come può essere pianificata una tale ricerca?

Lederberg: E' difficile rispondere. Lo stadio applicativo può essere pianificato e trovare finanziamenti; ma la ricerca di base non può essere rigorosamente programmata. E' significativo quanto si dice sia accaduto ad una riunione che doveva distribuire «grants» di ricerca. Uno dei membri del comitato, un efficiente uomo d'affari, obbietta dinanzi a un audace progetto: «Ma mi pare che quest'uomo non sappia esattamente dove vuole arrivare». Ribatte il ricercatore: «Se lo sapessi, non mi prenderei la briga di occuparmene». A mio modo di vedere, il miglior sistema è di lasciare al ricercatore la massima libertà. Naturalmente, solo pochi daranno contributi fondamentali. Ma è questione di probabilità statistica: più individui, che volontariamente scelgono la ricerca come loro scopo di vita, sono messi in condizione di seguire il loro estro inventivo, più abbondanti saranno i risultati. Naturalmente vi è il problema economico di distribuire i capitali disponibili. Negli Stati Uniti si è fatto molto e bene, specie da parte delle Autorità Federali: purtroppo una centralizzazione, almeno amministrativa, della ricerca comporta inevitabilmente delle pastoie burocratiche, ma l'orientamento attuale è di distribuire le sovvenzioni non tanto sulla base dei piani di ricerca, quanto facendo affidamento sulla provata personalità del ricercatore.

Che ne dici della ricerca biologica in Italia?

Lederberg: Anche negli Stati Uniti il giovane medico o biologo che sceglie la ricerca anzichè la professione, sa di affrontare un certo sacrificio economico, compensato però dalla soddisfazione di potersi dedicare ad una delle attività umane più affascinanti. Ma in Italia mi pare che l'organizzazione universitaria chieda ai ricercatori sacrifici davvero eccessivi. Mi sembra inoltre troppo poco duttile rispetto al dinamismo del progresso scientifico. Per i settori della biologia di mia competenza, Dulbecco, Luria, Pontecorvo sono nomi di prima grandezza che hanno grandemente onorato la biologia italiana. Ma ora lavorano all'estero. Rimangono ancora in Italia studiosi di valore: attenti a non perderli, l'esportazione di cervelli è sempre un cattivo affare!

Come i batteri diventano antibiotico-resistenti

Con la scoperta della chemioterapia e lo sviluppo della microbiologia quantitativa, si osservò che la resistenza dei micro-organismi agli antibiotici e ai sulfamidici, era un carattere che, una volta sviluppatosi, permaneva anche quando la popolazione batterica non era ulteriormente coltivata a contatto delle sostanze antibatteriche. Anche i clinici dovettero ben presto occuparsi del problema della resistenza agli antibiotici.

Il grave pericolo si presentò poco dopo la scoperta della penicillina. Molte specie batteriche, inizialmente sensibilissime all'antibiotico (stafilococchi) con il diffondersi del suo impiego diventavano sempre più resistenti alla penicillina, come se questa avesse perso completamente la sua attività. Evidentemente, i nuovi casi di infezione erano avvenuti per opera di popolazioni batteriche che già avevano sperimentato l'antibiotico nell'individuo contagiante e avevano imparato a sopravvivergli.

Fin dall'inizio si parlò di adattamento dei germi all'antibiotico e, ancora meno propriamente, di adattamento della coltura all'antibiotico. Questa terminologia portò ad una certa confusione, innanzitutto per l'uso della parola coltura. La coltura in senso stretto, non può essere nè resistente nè sensibile, poichè è costituita da una popolazione di cellule per ognuna delle quali si può parlare di sensibilità o di resistenza.

Anche come problema di popolazione, si potevano avanzare a priori due possibili spiegazioni:

a) la comparsa di germi penicillino-resistenti sarebbe insorta per mutazione casuale e spontanea; l'antibiotico avrebbe agito soltanto selezionando i resistenti a scapito dei germi sensibili;

b) il contatto diretto tra penicillina e germi avrebbe indotto in essi modificazioni funzionali che li rendevano insensibili all'azione stessa dell'antibiotico.

Entrambe le spiegazioni davano ragione del fatto osservato: seminando su piastra contenente l'antibiotico una cultura proveniente da un germe sensibile, soltanto poche cellule si sviluppano, con frequenza intorno ad 1 ogni 10 milioni di cellule seminate.

Improvvisamente si riaccese una classica disputa: adattamento contro selezione, lamarckisti contro darwinisti.

Il punto di vista darwiniano era, come si sa, destinato a prevalere con la dimostrazione della variabilità ereditaria, spontaneamente insorgente nel patrimonio ereditario della specie, e della selezione naturale imposta dall'ambiente. E' curioso notare come una questione già completamente superata per zoologi e botanici, si sia ripresentata così drammaticamente ai microbiologi, i quali si divisero subito in due schiere: alcuni a favore dell'adattamento, altri a favore della mutazione.

All'inizio, la discussione fu piuttosto sterile, poichè nessuno aveva argomenti a favore dell'una nè nell'altra ipotesi; tutt'al più si poteva dire che, siccome in altri campi della biologia la teoria della mutazione s'era dimostrata valida, essa era, per analogia, da estendere ai nuovi organismi e al nuovo carattere.

Il problema dunque c'era, ed era anche molto appassionante.

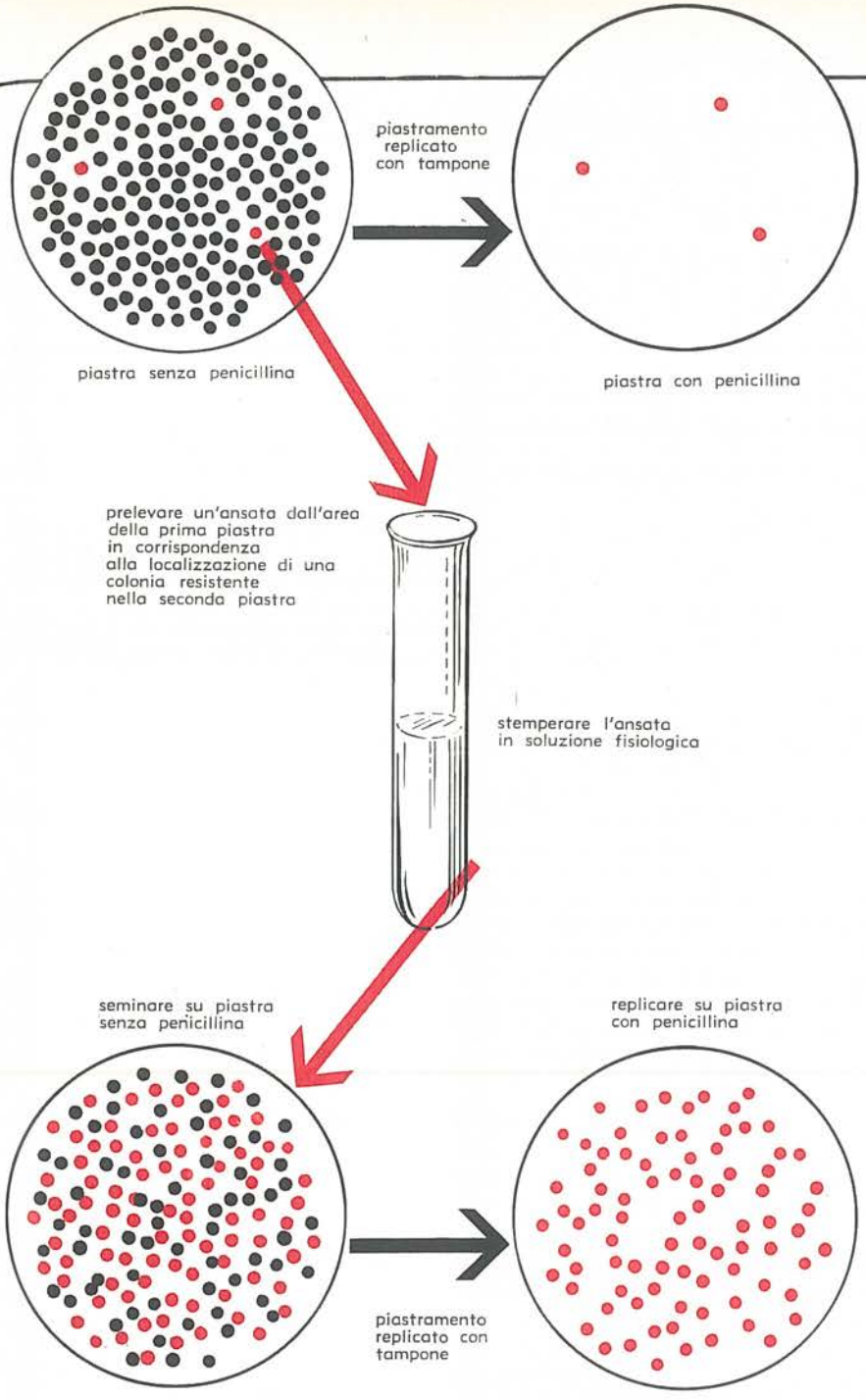
Non sarebbe esatto dire che la soluzione del problema fu data da Lederberg. I primi a dare una soluzione soddisfacente furono, in realtà, un medico italiano e un fisico teorico tedesco. Salvatore Luria e Max Delbrück si erano incontrati un'estate a Cold Spring Harbor, un piccolo villaggio sulla costa atlantica vicino a New York, dove sorge un importante centro di studi biologici: la Carnegie Institution.

Tra un bagno e l'altro discussero il problema. Tra una discussione e l'altra, nacque un'idea.

Subito Luria si mise al lavoro. L'esperimento era relativamente semplice. Si trattava di seminare un centinaio di tubi contenenti 0,2 cc. di brodo con poche cellule di Escherichia coli.

Le colture sviluppate venivano poi seminate su una piastra di agar, contenente un agente antibatterico, e incubate. Il giorno dopo si potevano contare le colonie sviluppate ognuna delle quali, ovviamente, derivava da una cellula resistente.

Questa era la parte sperimentale; la



parte teorica consisteva nell'analisi della distribuzione del numero delle colonie, secondo la teoria delle mutazioni e la teoria dell'adattamento.

Dal confronto delle distribuzioni teoriche con quelle ottenute dall'esperimento, si dimostrò che l'ipotesi dell'adattamento era da scartare.

La parte teorica di questo lavoro presentava alcune difficoltà matematiche e la variabilità sperimentale poteva dar luogo a qualche critica. Problema risolto, dunque; ma chi non capiva la matematica o non aveva troppa fiducia nella precisione delle pipette, poteva avanzare qualche dubbio.

Poi venne Lederberg e diede una dimostrazione sperimentale inconfutabile dell'ipotesi mutazionale. Semplicissimo: un vero uovo di Colombo.

Ed ecco come: Lederberg aveva selezionato i germi resistenti non facendo uso dell'antibiotico, ma servendosi dei loro fratelli: se l'ipotesi della mutazione e della successiva selezione era esatta, doveva esservi una strettissima somiglianza per resistenza o sensibilità tra germi dello stesso clone (cioè originati dalla stessa cellula).

Salvo il caso della mutazione avvenuta nello stesso individuo sottoposto alla azione dell'antibiotico (caso non distinguibile dall'adattamento, ma estremamente raro), in tutti gli altri casi la mutazione, essendo avvenuta più divisioni prima, doveva dare origine ad un'intera colonia di germi resistenti.

In una cultura liquida questa famiglia proveniente da una sola cellula si perde subito, ma in una cultura solida (su piastra) cellule vicine sono cellule sorelle; e tanto più sorelle, in genere, quanto più vicine.

Lederberg semina E.coli, sensibile, su una piastra di agar che non contiene penicillina: ottiene una crescita rigogliosa di miriadi di colonie, in gran parte costituite da germi sensibili: se vi sono alcuni pochi germi resistenti, essi non sono riconoscibili. Ma ora egli mette a contatto della piastra un tampone di velluto, e quindi appoggia questo tampone su una nuova piastra d'agar che contiene penicillina. Egli ottiene, perciò, sulla seconda piastra, una immagine della distribuzione dei germi cresciuti sulla prima: infatti ogni pelo del velluto funziona come una minuscola ansa; si asportano, in modo pressochè omogeneo, cellule da quasi tutta la superficie della piastra.

Se sulla seconda piastra si sviluppano delle colonie, queste devono essere resistenti e provenire dal corrispondente punto della prima piastra: da questo punto della prima piastra si preleva una piccola quantità di batteri con una fine ansa di platino. Questi devono essere i fratelli di quelli che, trasportati dal tampone sulla seconda piastra, hanno dato luogo alla colonia resistente. Da questa ansata di germi che non erano mai stati in contatto con la penicillina, Lederberg otteneva una cultura ricchissima di germi resistenti.

In due o tre passaggi su piastra, si arriva a culture composte in prevalenza di germi resistenti.

Il metodo fu chiamato del "piastramento replicato", perchè ad ogni piastramento corrispondeva una replica con il tampone nel mezzo selezionatore.

L'antibiotico veniva così usato come agente selezionatore non sulle cellule direttamente, ma sulle loro parenti più strette.

L'ipotesi dell'adattamento era definitivamente scartata.