



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

**Conferimento della Laurea ad honorem
in Fisica**

a Martin Chalfie

Laudatio

Cristiano Viappiani

Professore di Fisica applicata

Aula Magna della Sede Centrale

Parma

4 luglio 2023

Magnifico Rettore,
illustre Corpo Accademico,
Autorità Civili, Militari e Religiose,
Rettori e rappresentanti delle Università italiane,
Personale tecnico amministrativo di questa Università,
Studentesse e Studenti,
Signore e Signori,

in questo momento ho l'onore di tratteggiare la rilevanza e la portata del lavoro di Martin Chalfie, mentre ci accingiamo a conferirgli il titolo di Dottore magistrale in Fisica, in riconoscimento dei suoi meriti scientifici per l'attività di scienziato svolta e per le conseguenze immense che le sue scoperte hanno avuto nelle scienze della vita, dove i confini disciplinari si sono fatti sempre più sfumati al passare degli anni, in favore di una interazione sinergica tra competenze di diversa estrazione.

In questo senso, il lavoro di Martin Chalfie è emblematico.

Un lavoro di ricerca teso a comprendere meccanismi fondamentali che stanno alla base del funzionamento degli esseri viventi che, per essere svelati, hanno avuto bisogno dello sviluppo di metodi in precedenza non disponibili. Studi che avevano come scopo la conoscenza di informazioni di base, solo apparentemente privi di quelle conseguenze traslazionali che oggi sono enfatizzate anche in modo eccessivo, ma che si sono invece rivelati forieri delle più disparate, quanto forse inattese, ricadute applicative.

Nel corso dei suoi studi, Martin Chalfie sviluppò un interesse per le scienze naturali, specialmente per la chimica, e ottenne un dottorato in Fisiologia ad Harvard nel 1976. Trasferitosi a Cambridge nel laboratorio di Sidney Brenner nel 1977, dal 1982 è

rientrato negli Stati Uniti dove, da allora, è docente alla Columbia University a New York. Già in qualità di borsista post-dottorato, Martin Chalfie con John Sulston ha stabilito il primo modello genetico per la meccanosensazione utilizzando il nematode *Caenorhabditis elegans*. Mediante approcci molecolari, genetici ed elettrofisiologici, Chalfie e i suoi collaboratori hanno successivamente studiato in modo approfondito le basi molecolari della segnalazione meccanosensoriale e la differenziazione dei neuroni dei recettori del tatto in *C. elegans*.

Ma è con l'introduzione dell'uso della *Green Fluorescent Protein* come *marker* di espressione genica alla metà degli anni '90, che Chalfie ha dato il via ad una vera e propria rivoluzione negli studi su cellule e su interi organismi.

Per il suo lavoro, Chalfie ha ricevuto numerose cariche onorifiche, tra le quali, per citarne solo alcune, l'elezione a membro dell'American Academy of Arts and Sciences nel 2003, della National Academy of Sciences nel 2004, dell'American Association for the Advancement of Science nel 2007, della Royal Society of Chemistry nel 2009 e della Royal Society nel 2017. Ha inoltre ricevuto numerosi e prestigiosi premi, tra i quali ovviamente spicca il Premio Nobel per la Chimica nel 2008, condiviso con Osamu Shimomura e Roger Tsien. Ha ricevuto diversi titoli onorifici di laurea e dottorato ed è membro di diverse advisory boards e comitati, tra cui quello per il rispetto dei diritti umani delle National Academies of Sciences, di cui è Presidente. Nella sua produzione scientifica figurano numerosi articoli con oltre 200 citazioni, tra i quali spicca il lavoro del 1994 sulla GFP che ha ricevuto oltre 5000 citazioni.

Per comprendere la portata scientifica del lavoro di Martin Chalfie è bene inquadralo in una prospettiva storica.

Il XX secolo ha visto uno straordinario progresso delle scienze, intimamente interconnesso agli enormi sviluppi metodologici introdotti da nuove tecnologie in continuo progredire, che hanno permesso dirompenti avanzamenti concettuali e

consentito di comprendere la natura a un livello di approfondimento sempre più spinto.

Nel campo delle scienze della vita sono state gettate le basi della biochimica, utilizzate poi per esplorare i principi fondamentali del metabolismo cellulare e delle reazioni enzimatiche. Successivamente, grazie a metodologie sperimentali quali la cristallografia e la risonanza magnetica nucleare, se ne sono comprese le basi molecolari, associandole alle strutture proteiche determinate sperimentalmente con risoluzione atomica.

Nella seconda metà del '900, la genetica classica e la chimica degli acidi nucleici si fusero nella genomica moderna, basata sul sequenziamento dell'intero genoma di un numero sempre crescente di organismi. Questa rivoluzione della genetica, supportata dalla bioinformatica e da altre tecniche ausiliarie, ha avuto un impatto in molte aree delle scienze biologiche, con conseguenze pratiche per la medicina, la farmacia e l'ecologia. Tuttavia, né la rivoluzione biochimica né quella genetica hanno fornito gli strumenti sperimentali che consentono un monitoraggio quantitativo e sperimentalmente ben definito a livello molecolare dei processi spazio-temporali intra- e intercellulari, che definiscono il comportamento dinamico di tutti gli esseri viventi. Fino agli anni '90, infatti, gli scienziati potevano osservare, seppur con elevata risoluzione spaziale, principalmente cellule morte e fissare immagini statiche della vita.

Per superare questa limitazione erano necessari nuovi strumenti sperimentali e concettuali.

Un balzo in avanti

Come spesso accade, il progresso scientifico procede mediante salti concettuali responsabili di vere e proprie rivoluzioni metodologiche in grado di assicurare livelli

di comprensione della natura precedentemente impensabili. Alla metà degli anni '90, l'introduzione negli studi in scienze della vita dell'uso della Green Fluorescent Protein (GFP), proteina estratta dalla medusa *Aequorea victoria*, e di altre proteine fluorescenti ad essa collegate e provenienti da diversi organismi marini è stata una di queste rivoluzioni. L'avvento della GFP ha infatti introdotto una discontinuità nel modo con cui si effettuano gli studi nelle scienze della vita. La portata di questa scoperta è stata riconosciuta con l'assegnazione del Premio Nobel per la Chimica nel 2008 a Osamu Shimomura, Martin Chalfie e Roger Tsien, come si legge nella motivazione per il conferimento del premio: "for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP".

Una storia lunga 50 anni

La scoperta della Green Fluorescent Protein è stata fatta da Osamu Shimomura in uno studio durato oltre 40 anni, teso a comprendere l'origine chimica della bioluminescenza, responsabile dell'emissione di luce verde da parte della medusa *Aequorea victoria*. Con un lavoro che ha richiesto la cattura di un milione di meduse per poter estrarre materiale sufficiente a partire dalle minuscole quantità delle proteine di interesse presenti nei foto-organi, Shimomura dimostrò che *Aequorea victoria* usa due proteine per l'emissione di luce: l'equorina, proteina che ha trovato anch'essa innumerevoli applicazioni biotecnologiche, e la Green Fluorescent Protein (GFP).

Oltre ad isolare e purificare la GFP, alla fine degli anni '70 Shimomura riuscì anche a determinare la struttura del cromoforo, ovvero il composto organico responsabile dell'assorbimento della luce e dell'emissione di fluorescenza verde. Tuttavia, in assenza di esempi noti in altri organismi conosciuti che dimostrassero il contrario, Shimomura assunse che *Aequorea victoria* fosse dotata di enzimi presenti solo in

questo organismo, in grado di trasformare un precursore non fluorescente della GFP nella forma funzionale e fluorescente presente nei foto-organi.

Negli anni '80, Douglas Prasher, allora postdoc presso la University of Georgia, riuscì a identificare il gene dell'equorina, copiarlo e inserirlo all'interno di un batterio in modo da consentire al batterio di produrre direttamente la proteina, che divenne così disponibile più agevolmente e in maggiore quantità, non richiedendo più di essere isolata a partire da migliaia di meduse. Trasferitosi a Woods Hole, Prasher cercò di isolare e copiare anche il gene della GFP, lavoro che all'epoca, quando le moderne tecniche oggi disponibili non erano ancora state sviluppate, risultava particolarmente ostico. Uno dei pochi ricercatori che all'epoca seppero cogliere l'interesse che tale operazione aveva e intuire le potenziali applicazioni della proteina fluorescente fu Martin Chalfie. Come lui stesso ha raccontato, nel 1989 Chalfie venne a conoscenza della GFP durante un seminario sulla bioluminescenza e pensò di utilizzare la proteina per mostrare quando e dove alcune proteine venivano espresse all'interno del corpo trasparente del nematode *Caenorhabditis elegans*, proponendo a Prasher una collaborazione.

Il lavoro di isolamento del gene della GFP si rivelò più difficoltoso del previsto, ma Prasher ottenne infine copie del gene codificante per la GFP, anche se con una sequenza di amminoacidi più lunga ad entrambe le estremità della proteina. A causa di queste sequenze aggiuntive, quando il gene fu inserito in un batterio per l'espressione eterologa, la proteina non mostrò alcuna emissione di fluorescenza, cosa che gli fece concludere che fossero effettivamente necessari enzimi accessori per la maturazione del fluoroforo, come aveva ipotizzato Shimomura.

Dopo alcuni anni, venuto a sapere del progresso del lavoro di Prasher da una sua pubblicazione, Chalfie ottenne il gene della GFP e seguì una procedura differente, utilizzando dei primer in grado di copiare solo la sequenza effettivamente codificante per la proteina.

Luci nella notte

Grazie alla procedura seguita, i batteri, trasformati per esprimere la GFP, divennero fluorescenti, senza la necessità di includere altri enzimi di *Aequorea victoria* per la maturazione del cromoforo. Per dirla con Genesi (1,3), *e la luce fu*.

Chalfie era particolarmente interessato a studiare il modo in cui il nematode *C. elegans* rispondeva al tatto. Nel 1993 riuscì a sostituire il gene di una proteina sensibile al tatto con quello della GFP. Il manoscritto che descrive il lavoro sulla GFP, dal titolo "Green fluorescent protein as a marker for gene expression", fu accettato su *Science* e l'immagine di *C. elegans* modificato geneticamente che accompagnava l'articolo venne pubblicata sull'iconica prima di copertina del numero dell'11 di febbraio 1994, forse una delle copertine più famose della storia della scienza degli ultimi decenni.

Grazie a questo approccio, strutture cellulari che nascondevano intrecci funzionali tra specie molecolari in un buio indistinto, venivano illuminate dalla luce emessa da proteine, in modo da consentire ai ricercatori di ricostruire le loro relazioni molecolari nello spazio e nel tempo. Agli occhi degli scienziati, il mondo intracellulare non era più nell'oscurità, ma era diventato possibile osservare quanto avveniva all'interno di cellule ed organismi vivi, nel preciso momento in cui avveniva, seguendo nel tempo i segnali luminosi emessi dalle proteine fluorescenti. Dalle fotografie istantanee si era passati ai film.

Le immagini delle strutture cellulari che la luce regala sono certamente rivelazione di informazioni altrimenti impossibili da estrarre. Ma non può sfuggire la loro bellezza, che le qualifica come vere e proprie opere d'arte. Lo scienziato che vede per la prima volta un'immagine raccolta con un microscopio a fluorescenza non può non provare un senso di meraviglia di fronte alla bellezza dei motivi spaziali luminosi e della loro evoluzione temporale, che rivelano oggetti e relazioni dinamiche altrimenti invisibili ai nostri occhi.

L'impatto scientifico della GFP

La dimostrazione della possibilità di usare la GFP e altre proteine correlate come precise sonde fluorescenti intramolecolari ha coinciso con una fase di veloce sviluppo metodologico, sia delle tecniche di raccolta delle immagini, sia della loro analisi, portando a una interazione sinergica che ha prodotto impressionanti avanzamenti di conoscenza nelle scienze della vita, per numerosità, portata e velocità.

Metodologie biofisiche sviluppate in precedenza, quali il trasferimento di energia in risonanza alla Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) o la spettroscopia di correlazione della fluorescenza (FCS) sono oggi utilizzate estesamente per monitorare processi intracellulari a partire da segnali provenienti da proteine simili alla GFP.

Più recentemente, le proteine fluorescenti hanno giocato un ruolo fondamentale anche nello sviluppo di metodologie di *imaging* di fluorescenza con risoluzione sub-diffrattiva: la Photo-Activation Localization Microscopy (PALM), la STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) e la STimulated Emission Depletion (STED) microscopy, che, per le loro implicazioni, hanno a loro volta meritato il riconoscimento con il Premio Nobel per la chimica nel 2014 a Eric Betzig, William Moerner e Stefan Hell.

Non è eccessivo affermare che nessuna recente scoperta scientifica abbia avuto un impatto comparabile a quello che la scoperta della GFP ha avuto sulla modalità di svolgimento degli esperimenti nelle scienze biologiche, come testimoniato dalle centinaia di migliaia di lavori scientifici apparsi in letteratura che ne hanno fatto uso, a partire dalla scoperta all'inizio degli anni '90.

La scoperta della GFP e gli sviluppi metodologici che ne sono seguiti sono stati inoltre di stimolo alla identificazione di numerosi altri sistemi fotoattivi, in gran parte fotorecettori, che hanno aperto nuove prospettive e reso più versatili i sistemi di visualizzazione intracellulare.

L'uso di proteine simili alla GFP ha permesso di monitorare nello spazio e nel tempo, mediante tecniche fisiche basate sulla fluorescenza, un numero via via crescente di processi *in vivo*, sia all'interno di singole cellule sia in interi organismi. L'espressione genica, la localizzazione e la dinamica di proteine, le interazioni proteina-proteina, la divisione cellulare, l'organizzazione e la replicazione dei cromosomi, i percorsi di trasporto cellulare, la biogenesi sono solo alcuni dei numerosi esempi di studi biofisici, resi possibili dalla GFP e da altre proteine fluorescenti.

Una menzione a parte meritano i sensori fluorescenti codificati geneticamente, costituiti da proteine chimeriche che possono essere espresse all'interno delle cellule e sono ingegnerizzate in modo da agire come sensori per il monitoraggio di parametri chimico-fisici cellulari. Grazie allo sviluppo di sofisticati sistemi di microscopia, le proprietà di emissione di fluorescenza di questi sensori consentono di visualizzare processi cellulari direttamente in cellule vive, fornendo così dati con risoluzione spazio temporale impensabile per i metodi tradizionali della biochimica.

A trent'anni dalle prime applicazioni della GFP nelle Scienze della vita, possiamo senza ombra di dubbio affermare che queste scoperte hanno segnato il progresso scientifico in maniera indelebile con immense ricadute.

Le potenzialità sono state solo in parte esplorate e la creatività degli scienziati individuerà sicuramente nuove ed inattese strade, ispirate però da quella luce verde che, nel 1994, si è accesa per la prima volta nel laboratorio di Martin Chalfie.

Per la portata degli studi che ha condotto e per la loro influenza sullo sviluppo delle Scienze, in particolare della Biofisica, il Magnifico Rettore e l'Università di Parma sono lieti di conferire a Martin Chalfie la Laurea ad honorem in Fisica.