

# CAPITOLO 19

### Elementi di ingegneria genetica: OGM e varietà transgeniche

«La tecnica del DNA ricombinante ha fatto fare passi da giganti a tutte le bioscienze: dalla realizzazione di farmaci e vaccini all'agricoltura, dalla protezione dell'ambiente alla zootecnia, dalla preparazione di alimenti alla produzione di energia.»

Giorgio Poli (2001)

L'ingegneria genetica può essere definita come un insieme di metodi e di tecniche che permettono di isolare e trasferire geni o di analizzarne la struttura e la funzione. Per lo sviluppo dell'ingegneria genetica è stata determinante l'individuazione di alcune classi di proteine enzimatiche in grado di agire direttamente sul DNA, come le endonucleasi e le ligasi, capaci rispettivamente di tagliare in due una specifica sequenza nucleotidica e di saldare fra loro due sequenze nucleotidiche con estremità complementari. È grazie a questi enzimi che prese avvio la costruzione in vitro di molecole di DNA chimeriche, ottenute unendo insieme sequenze isolate da organismi diversi. La tecnologia del DNA ricombinante, così chiamata perché le molecole provenienti da fonti diverse venivano ricombinate insieme, permise di originare nuove sequenze che potevano essere poi inserite mediante opportuni vettori all'interno di cellule batteriche ospiti al fine di essere riprodotte in un numero elevato di copie. Era il 1972 quando Paul Berg costituì in vitro la prima molecola di DNA ricombinante, mentre l'anno seguente Herb Boyer e Stanley Cohen usarono per la prima volta un plasmide, un elemento genetico circolare autoreplicante presente nei batteri, per il clonaggio di DNA in Escherichia coli. Poco dopo il 1980 si trovò il modo di manipolare anche il genoma degli organismi pluricellulari. La produzione di piante transgeniche prese avvio quando i biologi molecolari scoprirono che Agrobacterium tumefaciens poteva essere impiegato per il trasferimento e l'integrazione di geni esogeni nelle cellule vegetali: fu dimostrato che il plasmide di tale batterio poteva trasmettere un segmento particolare di DNA alle cellule vegetali integrandosi per ricombinazione nel loro DNA cromosomico. Successivamente furono messi a punto altri sistemi per la produzione di piante transgeniche basati sull'assunzione diretta di DNA mediante elettroporazione, microiniezione oppure mediante sistema biolistico. Questo ultimo prevede l'impiego di microparticelle rivestite di DNA e rappresenta ancora oggi il metodo di trasformazione genetica più utilizzato nelle monocotiledoni. Nelle dicotiledoni, invece, il DNA è veicolato mediante plasmidi agrobatterici. Le prime piante transgeniche furono prodotte intorno al 1980-1982 da quattro gruppi di ricerca indipendenti: il gruppo di Jeff Schell e Marc Van Montagu, dell'Università di Gent (Belgio), aveva prodotto piante di tabacco resistenti alla kanamicina, così come quello dell'Università di St. Louis (USA), guidato da Mary-Dell Chilton, mentre Robert Fraley, Stephen Rogers e Robert Horsh della Monsanto Co., produssero piante di pisello resistenti alla kanamicina. Il gruppo dell'Università del Wisconsin, guidato da John

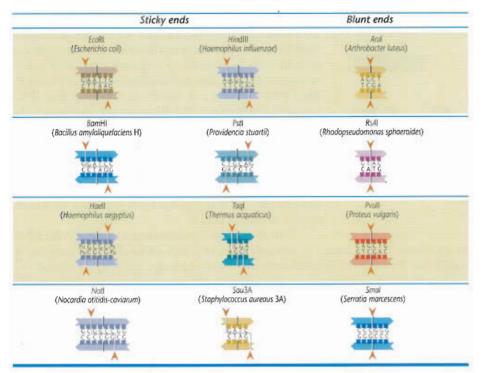
Kemp e Timothy Hall, aveva invece trasferito con successo un gene di fagiolo in una pianta di girasole. In poco più di venti anni la transgenesi è stata applicata con successo alle maggiori specie di interesse agrario, come il mais, la soia, il cotone, il tabacco e il pomodoro. I caratteri agronomici e commerciali che in questo arco di tempo e in laboratori diversi sono stati trasferiti riguardano la resistenza a erbicidi, insetti, virus, batteri e funghi, le caratteristiche qualitative delle produzioni e il controllo dello sviluppo e del sistema riproduttivo della pianta. Attualmente le piante geneticamente modificate (PGM) sono usate anche per la produzione di biofarmaci, anticorpi e vaccini.

#### 19.1 Tecnologia del DNA ricombinante

La possibilità di modificare *in vitro* il DNA al fine di assemblare *ex novo* sequenze nucleotidiche provenienti da organismi diversi, creando così molecole di **DNA ricombinante**, dipende unicamente dalla disponibilità di enzimi capaci di tagliare e congiungere in maniera specifica le molecole di acido nucleico. Gli enzimi che tagliano il DNA sono le **nucleasi** e l'evento di frammentazione di una molecola è chiamato restrizione, mentre quelli che congiungono il DNA sono le **ligasi** e l'evento di congiunzione di due molecole è chiamato ligazione. Le nucleasi sono pertanto enzimi in grado di rompere i legami fosfodiesterici tra nucleotidi adiacenti determinando la formazione di frammenti polinucleotidici di dimensioni variabili. Viceversa, le ligasi sono enzimi in grado di catalizzare la formazione di legami fosfodiesterici tra nucleotidi adiacenti unendo tra loro frammenti polinucleotidici.

Le nucleasi si distinguono in esonucleasi ed endonucleasi, a seconda che siano capaci di tagliare in corrispondenza, rispettivamente, di punti terminali oppure interni di una molecola. Le nucleasi più importanti per l'ingegneria genetica sono le endonucleasi di restrizione, enzimi di origine batterica in grado di intervenire sia su molecole lineari che circolari di DNA. Tali enzimi agiscono unicamente in molecole di acido nucleico a doppio filamento e in punti specifici delle molecole stesse, laddove riconoscono una determinata sequenza di basi, che varia in funzione dell'enzima impiegato.

La scoperta degli enzimi di restrizione risale agli anni 1965-70, quando Werner Arber ed altri ricercatori osservarono la peculiarità posseduta da alcuni batteri relativamente a speciali sistemi di difesa contro l'infezione da parte di virus. Nel 1971 Hamilton Smith e Daniel Nathans chiarirono i meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno: la degradazione del DNA virale riconosciuto come estraneo da un certo ceppo batterico era causata da un enzima prodotto da quest'ultimo. Tali enzimi furono chiamati enzimi di restrizione poiché per mezzo di questi alcuni batteri restringevano il numero di fagi in grado di infettarli. In pochi anni vennero così studiati e caratterizzati moltissimi enzimi di restrizione e fu dimostrato che ognuno di questi era capace di riconoscere e operare un taglio in corrispondenza di una specifica sequenza nucleotidica. Inoltre, fu appurato che questi enzimi non erano in grado di agire sul DNA batterico per la presenza di un altro enzima, la metilasi, capace di modificare i siti di restrizione attraverso eventi di metilazione. Nel 1986 Arber, Smith e Nathans condivisero il premio Nobel per la Medicina e la Fisiologia per la scoperta degli enzimi di restrizione. Attualmente sono noti oltre 400 enzimi di restrizione, ciascuno dei quali prende il nome dal batterio in cui viene isolato. Per convenzione, questi enzimi sono identificati da un sistema a tre lettere in corsivo seguite da un numero romano. Talvolta, sono inserite anche lettere addizionali per indicare un particolare ceppo della specie batterica. Per esempio, EcoRI deriva dal ceppo RY13 di Escherichia coli, mentre HindIII deriva dal ceppo Rd di Haemophilus influenzae. Gli enzimi di restrizione riconoscono una sequenza di lunghezza pari generalmente a 4 o 6 pb, in alcuni casi anche 8 pb, detta "palindromo" poiché caratterizzata da simmetria binaria, nel senso che quando



Tab. 19.1 – Esempi di enzimi di restrizione con indicazioni relative all'organismo di origine e alla sequenza di riconoscimento (la linea nera indica l'asse di simmetria binaria mentre le frecce contraddistinguono i siti di taglio).

viene letta in direzione  $5' \rightarrow 3'$  la sequenza è identica in entrambi i filamenti del DNA. (Tab. 19.1). In molti casi, enzimi di restrizione isolati da specie batteriche diverse riconoscono e tagliano la stessa sequenza di DNA: tali enzimi sono detti **isoschizomeri**. Ad esempio, Sall, HincII e AccII riconoscono tutti la stessa sequenza, così come XmaI e SmaI. In base al modo con cui tagliano il DNA all'interno della sequenza di riconoscimento e quindi al tipo delle estremità prodotte, gli enzimi di restrizione possono essere suddivisi in due classi distinte: blunt ends e sticky ends. La prima classe di endonucleasi può infatti tagliare la sequenza al centro producendo frammenti di restrizione con estremità piatte, mentre la seconda classe può tagliare la sequenza in maniera asimmetrica verso il 5' oppure verso 3' originando pertanto frammenti di restrizione con un'estremità sporgente rispetto all'altra di 2-4 nucleotidi (Fig. 19.1).

Grazie alla loro specificità di substrato, questi enzimi permettono di ottenere la frammentazione di una singola molecola (ad esempio, un plasmide) o di un intero genoma in maniera riproducibile. La frequenza di taglio di una endonucleasi dipende dal numero dei siti di restrizione riconosciuti in una data molecola. Così assumendo che una molecola di DNA sia composta da una uguale quantità di GC e AT, e presenti una distribuzione casuale di coppie di nucleotidi, la probabilità di trovare in una posizione qualsiasi della sequenza uno degli appaiamenti possibili (G≡C, C≡G, A=T e T=A) è pari a 1/4 ciascuno. Inoltre, la probabilità di trovare in una data posizione uno dei quattro appaiamenti di nucleotidi è indipendente dalla probabilità di trovare in una posizione adiacente della molecola di DNA una qualsiasi delle possibili coppie di nucleotidi. Ciò significa che, in accordo con il teorema delle probabilità composte, la probabilità di trovare un sito di restrizione da parte di una qualsiasi endonucleasi può essere calcolata come prodotto delle probabilità singole. Così una endonucleasi che riconosce una sequenza di restrizione di 4 coppie di nucleotidi (4-base cutter) è teoricamente in grado di operare un taglio ogni 256 pb e una endonucleasi che, invece, riconosce una sequenza di restrizione di 6 coppie di nucleotidi (6-base cutter) è teori-

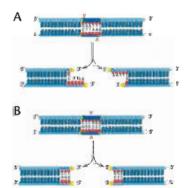


Fig. 19.1 – Meccanismo di azione di EcoRI (endonucleasi sticky end) (A) e Smal (enzima blunt end) (B).

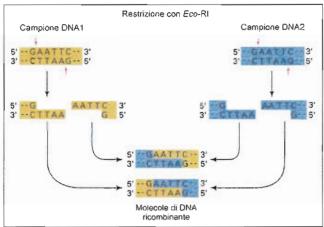


Fig. 19.2 – Produzione di molecole di DNA ricombinante.

camente in grado di operare un taglio ogni 4096 pb. Quindi, maggiore è la lunghezza della sequenza di riconoscimento e minore è la frequenza di restrizione teorica di una endonucleasi. In generale, la frequenza attesa di un sito di restrizione per una certa endonucleasi si calcola con la formula (1/4)<sup>n</sup>, dove n è il numero di coppie di basi della sequenza di riconoscimento. Bisogna comunque notare che il DNA genomico degli organismi viventi non ha una distribuzione casuale di coppie di basi: alcuni sono ricchi in GC, mentre altri sono ricchi in AT. Perciò la scelta dell'enzima più appropriato per le restrizioni può variare in funzione della specie: ad esempio, *Smal* è particolarmente adatto per le specie con DNA genomico caratterizzato da prevalenza di GC.

Tutte le endonucleasi rompono lo scheletro del DNA tra il carbonio in posizione 3' di uno zucchero e il gruppo fosfato legato al carbonio in 5' dello zucchero facente parte del nucleotide adiacente nella catena. Ogni endonucleasi produce frammenti di restrizione con estremità note e complementari, proprietà che consente di impiegare questi enzimi per l'assemblaggio di una molecola di DNA ricombinante. Le endonucleasi che producono estremità appiccicose, sporgenti in 5' oppure in 3', sono quelle maggiormente impiegate per il clonaggio dei frammenti di restrizione. Trattando il DNA isolato da due diversi organismi con la stessa endonucleasi si producono infatti frammenti di restrizione con estremità sporgenti esattamente complementari e quindi predisposte ad essere saldate enzimaticamente (Fig. 19.2). Attraverso l'azione della ligasi è infatti possibile saldare tra loro due frammenti di restrizione con estremità complementari poiché questo enzima catalizza la formazione di un legame fosfodiesterico, saldando tra loro lo zucchero e il gruppo fosfato di ogni filamento e ripristinando così il sito di restrizione nel DNA chimerico. Anche i frammenti di restrizione con estremità piatte possono venire saldate tra loro in modo covalente dalla ligasi, ma usando più alte concentrazioni dell'enzima. La possibilità di tagliare e saldare in vitro sequenze di DNA provenienti da organismi diversi costituisce la base della tecnologia del DNA ricombinante.

#### 19.2 Vettori di clonaggio

La tecnologia del DNA ricombinante ha offerto nuove possibilità di ricerca poiché ha permesso lo sviluppo dell'ingegneria genetica, cioè della modificazione diretta e selettiva della costituzione genetica di cellule attraverso l'inserzione o la delezione di uno o più geni. La tecnologia del DNA ricombinante ha, inoltre, reso fattibile il clonaggio dei geni e lo studio dei genomi.

I genomi possono essere analizzati, così come i geni possono venire caratterizzati, trasferendo frammenti di DNA di un organismo in appropriati vettori di clonaggio. Un vettore di clonaggio è quindi una molecola di DNA a doppia elica costruita artificialmente in cui è possibile inserire un frammento di DNA esogeno e che può replicarsi autonomamente in una cellula ospite. Tutti i vettori di clonaggio devono quindi avere uno o più siti di restrizione (polylinker) per l'inserimento del DNA esogeno, essere in grado di replicarsi in almeno un organismo ospite (batterio o lievito) e possedere uno o più geni marcatori selezionabili per il riconoscimento delle cellule contenenti i vettori. I primi vettori di clonaggio messi a punto sono rappresentati dai plasmidi batterici, tuttora largamente impiegati per il clonaggio di frammenti di DNA di piccole dimensioni (qualche kb). La necessità di lavorare con frammenti più grandi di DNA

ha portato allo sviluppo di vettori di clonaggio basati sul batteriofago λ(lambda) o derivati da questo, come i cosmidi, che consentono il clonaggio di frammenti lunghi fino a 18 kb e 44 kb, rispettivamente. I vettori di clonaggio inventati nel 1987 da D.T. Burke, G.F. Carle e M.V. Olson, nel tentativo di lavorare con frammenti di DNA più lunghi di 100 kb, sono i cromosomi artificiali di lievito o YAC (*Yeast Artificial Chromosomes*) che vengono propagati in *S. cerevisiae*. In anni più recenti, H. Shizuya e collaboratori hanno sviluppato i cromosomi artificiali batterici o BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*), basati sul plasmide *F* di *E. coli* avente una capacità di accettare frammenti di DNA lunghi 300 kb o più.

#### 19.2.1 Plasmidi

Dai plasmidi batterici sono stati derivati i vettori usati più comunemente per il clonaggio del DNA eucariotico. I **plasmidi** sono elementi genetici extracromosomici, rappresentati da molecole circolari di DNA a doppio filamento capaci di replicarsi autonomamente nella cellula batterica, fino a raggiungere qualche centinaio di copie. Infatti, i plasmidi si duplicano in modo indipendente dal cromosoma batterico poiché possiedono la sequenza di origine (*ori*) necessaria per la propria replicazione. Nel loro complesso, i plasmidi rappresentano comunque soltanto una piccola parte del genoma batterico, generalmente compresa tra l'1 e il 2-3%. In questi elementi genetici sono localizzati pochi geni che tuttavia codificano per importanti caratteri accessori. Ad esempio, i plasmidi contengono l'informazione che presiede alla coniugazione dei batteri e sono responsabili di parecchie malattie delle piante.

I plasmidi usati come vettori di clonaggio derivano da quelli naturali, attraverso modificazioni di ingegneria genetica, e presentano dimensioni piuttosto contenute, dell'ordine di poche migliaia di paia di basi (**Fig. 19.3**). In particolare, un vettore di clonaggio moderno derivato da plasmidi di *E. coli* ha dimensioni di circa 2,5-5,0 kb e possiede quattro caratteristiche essenziali: i) contiene molti siti unici di restrizione riconosciuti da endonucleasi specifiche (regione sintetica che costituisce il *polylinker*), indispensabili per linearizzare il plasmide e per inserire il frammento di DNA esogeno mediante la ligasi; ii) presenta una sequenza di origine della replicazione (*ori*) che permette la replicazione autonoma del plasmide nelle cellule ospiti di *E. coli*; iii) include un gene marcatore selezionabile che conferisce resistenza ad un antibiotico, come ad esempio

 $amp^R$  (ampicillina),  $tet^R$  (tetraciclina),  $cm^R$  (cloramfenicolo),  $kan^R$  (kanamicina), al fine di riconoscere le cellule trasformate di  $E.\ coli$ , cioè quelle contenenti il vettore plasmidico; iv) include anche il gene marcatore  $lacZ^+$  codificante per l'enzima β-galattosidasi che consente un saggio colorimetrico per distinguere visivamente le colonie trasformate contenenti il plasmide con inserto (ricombinante) da quelle trasformate ma contenenti il plasmide senza inserto. Come sistema alternativo, attualmente sono impiegati plasmidi pKIL che includono nel polylinker un gene killer, denominato ccdB, sotto il controllo del promotore lacP e codificante un prodotto citotossico. Quando le cellule di  $E.\ coli$  sono trasformate con tali vettori plasmidici, il prodotto genico di ccdB blocca lo sviluppo delle

cellule batteriche. Quando, invece, il gene *ccd*B viene inattivato da un inserto di DNA esogeno, il vettore plasmidico non interferisce più con la vitalità delle cellule batteriche che sono pertanto in grado di svilupparsi regolarmente. In questa situazione risulta agevole la selezione delle colonie trasformate contenenti il plasmide con l'inserto.

In vitro il DNA plasmidico può essere inserito nelle cellule batteriche mediante assunzione diretta dal terreno di coltura, attraverso i pori della membrana plasmatica,

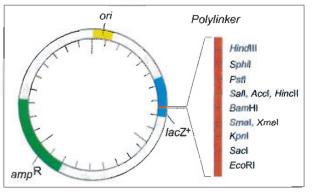


Fig. 19.3 – Mappa di un plasmide modello usato come vettore di clonaggio composto di: sequenza di origine della replicazione (ori), gene per la resistenza all'ampicillina ( $amp^n$ ), gene per la  $\beta$ -galattosidasi ( $lacZ^+$ ) e regione con siti unici di restrizione (polylinker).

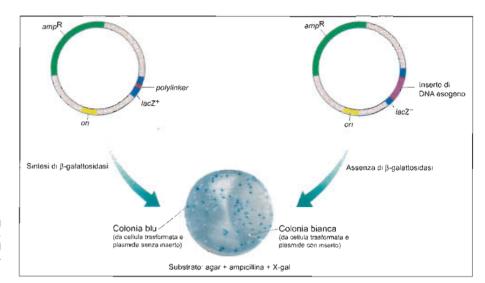


Fig. 19.4 – Saggio colorimetrico per il riconoscimento delle colonie batteriche ottenute da cellule contenenti il plasmide con l'inserto di DNA esogeno.

coadiuvata da trattamenti chimici o fisici per rendere le cellule competenti alla trasformazione. La presenza nel plasmide dei due geni marcatori permette di selezionare le colonie derivanti da cellule batteriche trasformate e tra queste di discriminare quelle contenenti plasmidi con il frammento di DNA esogeno. La trasformazione di E. coli consente, infatti, l'introduzione nel batterio di un plasmide contenente il gene di resistenza ad uno specifico antibiotico in grado quindi di conferire alla cellula ospite la capacità di svilupparsi e formare colonie in un substrato di coltura agarizzato addizionato di tale antibiotico. Ovviamente, le cellule di E. coli non trasformate, non contenendo il gene di resistenza, non sono invece in grado di svilupparsi su un tale substrato. Il gene amp<sup>R</sup> che conferisce resistenza all'ampicillina è il marcatore selettivo più diffuso nei vettori di clonaggio plasmidici. Un saggio colorimetrico molto semplice e rapido che consente il riconoscimento visivo delle colonie derivate da cellule batteriche contenenti il plasmide ricombinante è quello basato sull'attività del gene lacZ\* codificante per la β-galattosidasi (Fig. 19.4). Questo gene è inserito all'interno del polylinker in modo tale che presieda alla sintesi dell'enzima β-galattosidasi quando il plasmide è acquisito da una cellula batterica mancante di questa funzione (lacZ-). Qualora un frammento di DNA esogeno venisse clonato nel polylinker, il gene lacZ+ risulterebbe interrotto e non sarebbe più in grado di produrre l'enzima β-galattosidasi in E. coli. Se la trasformazione di E. coli consente l'introduzione nel batterio di un plasmide, le colonie possono svilupparsi in un substrato di coltura agarizzato addizionato dell'antibiotico selettivo, ma tale plasmide non necessariamente contiene il frammento di DNA esogeno. Le colonie batteriche composte di cellule aventi il plasmide ricombinante possono quindi essere riconosciute da quelle composte di cellule aventi il plasmide senza il frammento di DNA esogeno in base al loro colore. Il gene per la β-galattosidasi è infatti in grado di conferire alla cellula ospite la capacità di metabolizzare uno zucchero disaccaride particolare, simile al lattosio, chiamato X-gal (5-bromo-4-cloro-3indol-β-D-galattopiranoside), presente nel substrato di coltura agarizzato che svilupperà colonie di colore blu. Quando invece il gene per la β-galattosidasi non è funzionale la colonia risulterà di colore bianco poiché lo zucchero non può essere scisso nelle sue due componenti. La presenza del frammento di DNA esogeno nel polylinker interrompe il gene lacZ+, mentre l'assenza del frammento di DNA esogeno nel polylinker mantiene attiva la sintesi di β-galattosidasi. Ciò rende possibile distinguere le colonie contenenti il plasmide ricombinante, con inserto (che rimangono bianche) da quelle contenenti il plasmide senza inserto (che diventano blu).

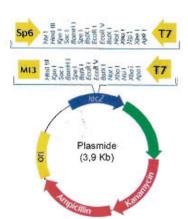


Fig. 19.5 – Mappa di un plasmide usato per trascrivere RNA e per clonare DNA dei prodotti di PCR.

I vettori plasmidici sono attualmente disponibili con molteplici varianti delle caratteristiche principali, riguardanti ad esempio la composizione dei siti unici di restrizione nel *polylinker* e l'introduzione di sequenze corrispondenti a promotori fagici adiacenti alla regione *polylinker* (**Fig. 19.5**). Gli enzimi di restrizione più comunemente rappresentati sono *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *SamI*, *HindIII*, *SphI* e *SalI*, mentre i promotori fagici solitamente corrispondono alle sequenze di T7, T3 e SP6 riconosciute dalle RNA polimerasi DNA-dipendenti usate per sintetizzare *in vitro* copie di RNA dai frammenti di DNA clonati oppure alla sequenza di M13 sfruttata per amplificare *in vitro* frammenti di DNA clonati mediante PCR con DNA polimerasi.

I plasmidi si replicano efficientemente in cellule batteriche (*E. coli*), mentre negli eucarioti non sono comuni, benché *Saccharomyces cerevisiae* possieda in realtà un plasmide che talvolta viene utilizzato per il clonaggio. La maggior parte dei vettori di clonaggio eucariotici sono quindi basati sui virus.

#### 19.2.2 Vettori derivati dai batteriofagi e cosmidi

I plasmidi consentono di clonare efficientemente frammenti di DNA di poche chilobasi. Benché possano essere caricati di frammenti di DNA esogeno compresi fra 5 e 10 kb, i plasmidi portanti frammenti eccessivamente lunghi sono spesso instabili, vanno in-

contro a riarrangiamenti e tendono a perdere l'inserto durante la fase di replicazione. Al fine di clonare frammenti di DNA più lunghi sono stati quindi sviluppati vettori basati sul **batteriofago**  $\lambda$ . Il genoma di  $\lambda$ è composto da una molecola lineare di DNA a doppio filamento lunga 48,5 kb, ma una parte consistente della sua sequenza, pari a circa 15 kb, può essere rimossa in quanto contiene soltanto geni necessari all'integrazione del fago nel cromosoma di E. coli. Questa regione può quindi es-

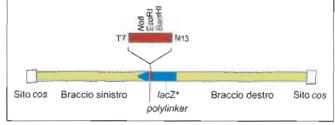


Fig. 19.6 – Vettore di clonaggio derivato dal batteriofago  $\lambda$ .

sere deleta senza compromettere la capacità di λ di infettare le cellule batteriche e di dirigere la sintesi di nuove particelle fagiche tramite il ciclo litico (Fig. 19.6). Poiché il DNA di λè lineare, rimuovendo la parte centrale il vettore fagico risulta in due braccia laterali, un braccio sinistro e un braccio destro, tra le quali può essere inserito il DNA esogeno. Affinché il clonaggio sia possibile, anche i vettori fagici devono però includere una regione polylinker con siti unici di restrizione. Inoltre, entrambe le braccia del vettore fagico terminano con sequenze coesive (siti cos) di 12 nucleotidi a filamento singolo che sono tra loro complementari in modo che la molecola di DNA fagico possa assumere la forma circolare. Infatti, durante la prima fase dell'infezione, cioè subito dopo avvenuto l'ingresso del fago nel batterio, il genoma lineare del vettore λ viene circolarizzato. I vettori λ comunemente utilizzati per il clonaggio genico sono stati manipolati in modo che non sia possibile il ciclo lisogenico, ma solo quello litico. Con il ciclo litico, il DNA fagico viene replicato e le nuove particelle sono assemblate a spese della cellula batterica che va quindi incontro a lisi, visualizzando l'infezione nel substrato agarizzato sotto forma di placche (Fig. 19.6). Dato che una particella fagica può ospitare complessivamente fino a 52 kb e le due braccia fagiche insieme sono lunghe 33,5 kb, la dimensione massima dei frammenti di DNA esogeno che possono essere clonati in un vettore λè di circa 18 kb.

In realtà sono stati sviluppati due tipi di vettori derivati dal batteriofago l: i **vettori** di inserzione e i **vettori di sostituzione**. I primi sono costituiti dalle due braccia laterali separate dal sito di restrizione utilizzato per l'inserimento del DNA esogeno, mentre nei secondi tra il braccio destro e il braccio sinistro contengono anche un frammento di riempimento che viene rimosso e sostituito con l'inserimento del DNA esogeno. In entrambi i casi, il clonaggio di frammenti di DNA all'interno di un vettore  $\lambda$  implica la

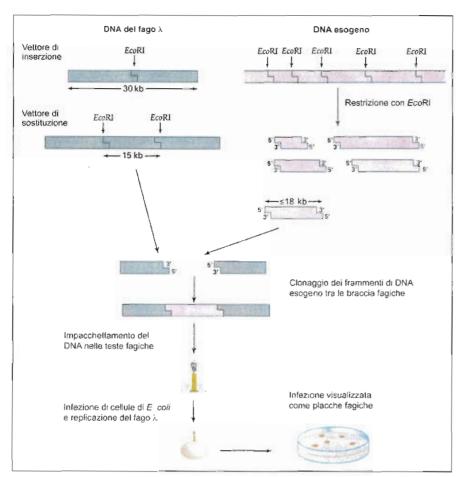


Fig. 19.7 – Clonaggio di DNA esogeno in vettori di inserzione e di sostituzione.

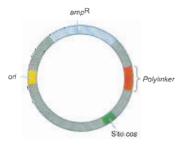


Fig. 19.8 – Vettore di clonaggio cosmidico.

vettore stesso al fine di predisporre sia i frammenti di restrizione che le braccia fagiche alla ligazione. È evidente che quando il vettore  $\lambda$  è di inserzione, il sito di restrizione tra le braccia è unico, mentre quando il vettore λ è di sostituzione, il sito di restrizione è doppio poiché soltanto in questo modo è possibile rimuovere la parte centrale di riempimento ed esporre entrambe le braccia alla ligazione dei frammenti di DNA esogeno (Fig. 19.7). I soli eventi di ricombinazione che originano cromosomi di λ funzionali sono quelli che prevedono l'inserimento del DNA esogeno tra il braccio sinistro e il braccio destro e che risultano in molecole di lunghezza totale compresa tra 37 e 52 kb poiché soltanto queste possono essere impacchettate nelle nuove particelle fagiche. Il sistema più utilizzato per distinguere le placche ricombinanti dalle placche non ricombinanti è quello basato sul gene lacZ+ codificante per la β-galattosidasi, analogo a quello impiegato per i vettori plasmidici.

digestione con una data endonucleasi

del DNA esogeno e del DNA del

La dimensione dei frammenti di DNA da clonare può essere ulteriormente aumentata rispetto alle 18 kb consentite dai normali vettori λ usando particolari vettori derivati dal batteriofago λ, chiamati cosmidi. A differenza dei plasmidi e dei fagi, i cosmidi non si ritrovano in natura e combinano le caratteristiche di un plasmide con quelle di un fago. Un **cosmide** è sostanzialmente un vettore plasmidico modificato che include: i) una sequenza di origine (*ori*) per la sua replicazione in *E. coli*; ii) un gene marcatore selezionabile (ad esempio, *amp*<sup>R</sup>) che conferisce resistenza ad un antibiotico; iii) un sito *cos* derivato dal batteriofago λ necessario per la circolarizzazione della molecola; iv) una regione *polylinker* con siti unici di restrizione per l'inserimento dei frammenti di DNA esogeno (**Fig. 19.8**). I cosmidi sono quindi vettori di clonaggio molto utili poiché combinano la capacità del batteriofago di accettare lunghi frammenti di DNA con la possibilità di potersi replicare indipendentemente dal cromosoma dell'ospite propria di un plasmide.

Per l'impacchettamento del DNA nelle teste fagiche sono necessari due siti  $\cos$  distanziati tra loro in modo da dare una molecola lineare di 48 kb oppure un sito  $\cos$  in una molecola circolare di dimensioni appropriate. In questo caso, il taglio del sito  $\cos$  produce estremità coesive, a singoli filamenti tra loro complementari. La ligazione dell'inserto di DNA esogeno in un vettore cosmidico avviene in modo tale che le molecole ricombinanti possano saldarsi tra loro producendo lunghe catene lineari. I cosmidi ricombinanti contenuti in queste catene sono riconosciuti come genomi  $\lambda$  da parte di una miscela di impacchettamento composta di proteine che possono assemblarsi spontaneamente *in vitro* producendo nuove particelle fagiche. Benché i cosmidi non includano i geni di  $\lambda$ , la reazione di impacchettamento avviene ugualmente poiché dipende unicamente dalla presen-

za dei siti cos. Dal momento che un cosmide può avere dimensioni di 8 kb o meno, in questi vettori di clonaggio si possono inserire frammenti di DNA esogeno lunghi da 35 kb fino a 44 kb prima di raggiungere il limite di impacchettamento della particella fagica. Tale evento è d'altronde indispensabile poiché il DNA del vettore ricombinante deve essere impacchettato nei fagi  $\lambda$  per essere successivamente trasferito ed amplificato in  $E.\ coli.$ 

Nel 1992, U.J. Kim e collaboratori hanno messo a punto vettori di clonaggio simili ai cosmidi, chiamati **fosmidi**, che contengono l'origine di replicazione del plasmide F e un sito  $\cos$  di  $\lambda$ . Inoltre, tali vettori rispetto ai plasmidi sono caratterizzati da un più basso numero di copie in E. coli e quindi da minori problemi di instabilità. La capacità di un vettore di clonaggio derivato da un batteriofago è comunque determinata dalla dimensione del tratto genomico che può essere deleto e dallo spazio disponibile all'interno della testa fagica. Poiché il **batteriofago P1** ha un genoma più grande di quello di  $\lambda$  e lo spazio disponibile all'interno della particella è maggiore, in un vettore P1 possono essere clonati frammenti più lunghi (fino a 125 kb) rispetto a quelli consentiti da un vettore  $\lambda$ .

#### 19.2.3 Cromosomi artificiali di lievito (YAC) e di batteri (BAC)

La capacità massima relativa alla dimensione dei frammenti clonabili con vettori cosmidici è stabilita dallo spazio disponibile nella testa delle particelle fagiche, cosicché il limite di 44 kb non può essere ulteriormente migliorato. Inoltre, è possibile ovviare alla necessità di replicare il vettore plasmidico o fagico inserendo il DNA esogeno direttamente all'interno di un cromosoma della cellula ospite, sia di lievito che di batterio. È proprio sulla base di tale considerazione che sono stati sviluppati i cromo-

somi artificiali di lievito o YAC (Yeast Artificial Chromosomes), vettori che permettono di clonare frammenti di DNA lunghi oltre 100 kb e che vengono propagati in S. cerevisiae. In seguito sono stati sviluppati anche i cromosomi artificiali batterici o BAC (Bacterial Artificial Chromosomes), vettori basati sul plasmide F di E. coli che consentono di clonare frammenti di DNA lunghi fino a 300 kb.

I vettori di clonaggio YAC non possono moltiplicarsi in *E. coli*, ma unicamente in *S. cerevisiae* ed, inoltre, non sono basati su plasmidi o virus, ma su cromosomi artificiali (**Fig. 19.9**). Le unità funzionali principali di questi vettori sono: i) un centromero, o sequenza centromerica (*CEN*), che svolge un ruolo fondamentale durante la divisione nucleare; ii) i telomeri, cioè le sequenze terminali (*TEL*), che marcano le due estremità del DNA cromosomico; iii) una o più sequenze di origine della replicazione, o sequenze con replicazione autonoma (*ARS*), per la sintesi del DNA

cromosomico in cellule di lievito. A queste tre componenti cromosomiche sono associati siti unici di restrizione da usare per l'inserimento del DNA esogeno ed almeno un gene marcatore selezionabile per visualizzare le cellule contenenti i vettori YAC caricatati del frammento di DNA esogeno. Ad esempio, i geni *TRP1* e *URA3*, che conferiscono indipendenza rispettivamente da triptofano e uracile, oppure il gene *SUP4* che, invece, consente un saggio colorimetrico. Tutte le sequenze essenziali che compongono un vettore YAC possono essere contenute in una molecola di DNA lunga 10-15 kb.

Il vettore di clonaggio deve essere linearizzato usando la endonucleasi che rimuove il frammento di riempimento compreso tra i due telomeri della molecola circolare

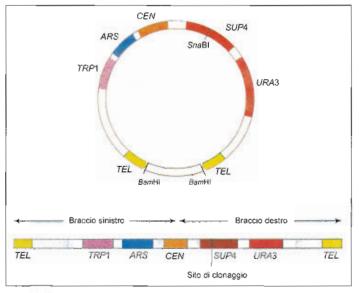


Fig. 19.9 – Vettore di clonaggio YAC circolarizzato unendo i telomeri con una regione di riempimento e linearizzato dopo restrizione con BamHI al fine di rimuovere la regione di riempimento: i siti unici di restrizione del polylinker possono essere impiegati per inserire frammenti di DNA esogeno.

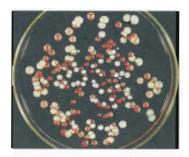


Fig. 19.10 – Colonie di lievito contenenti vettori di clonaggio ricombinanti (bianche) e senza inserto di DNA esogeno (rosse).

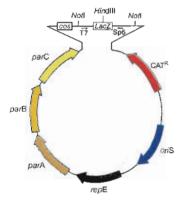


Fig. 19.11 – Organizzazione di un vettore BAC.

e contemporaneamente deve essere caricato del frammento di DNA esogeno da clonare. A tale scopo, generalmente è possibile utilizzare il sito di restrizione all'interno del gene marcatore selezionabile in base al saggio colorimetrico. Dopo la trasformazione, i marcatori selezionabili consentono di verificare la presenza e la struttura dei vettori YAC. Poiché i geni TRP1 e URA3 sono ubicati in posizioni diverse, quando le cellule di lievito sono in grado di accrescersi su un substrato di coltura minimo, privo di triptofano e uracile, significa che il vettore comprende sia il braccio sinistro che il braccio destro. La presenza dell'inserto viene, invece, accertata verificando l'inattivazione del gene SUP4: piastrate su un substrato di coltura appropriato, le colonie contenenti i vettori ricombinanti sono bianche, mentre quelle contenenti il vettore senza inserto sono rosse (Fig. 19.10).

I vettori YAC consentono il clonaggio di frammenti lunghi centinaia di chilobasi. Dal momento, infatti, che i cromosomi naturali di lievito hanno una dimensione compresa tra 230 kb e più di 1700 kb, uno YAC potrebbe, in teoria, essere caricato con frammenti di DNA lunghi fino a 1 Mb. L'osservazione che alcuni tipi di YAC possano risultare instabili e condurre a perdite o riarrangiamenti del DNA esogeno, in pratica, ha ridotto la lunghezza dei frammenti inseriti a non più di 100 kb e ha promosso lo sviluppo di nuovi vettori. Tra questi sono da includersi, ad esempio, i cromosomi artificiali batterici (BAC), basati sul plasmide della fertilità (F) di E. coli. Questo tipo di plasmide, che dirige il trasferimento di DNA tra cellule batteriche mediante coniugazione, è relativamente grande ed è stato sfruttato per mettere a punto dei vettori aventi una maggiore stabilità e una capacità di accettare inserti di DNA più lunghi rispetto ai normali plasmidi.

I vettori BAC basati sul plasmide F contengono: i) una sequenza di origine della replicazione (oriS); ii) i geni che controllano la replicazione (repE) ed il numero di copie del plasmide F (parA, parB e parC); iii) il gene marcatore selezionabile codificante per l'enzima cloramfenicolo acetil-transferasi (CAT) indispensabile per verificare gli eventi di trasformazione; iv) il gene lacZ codificante per la β-galattosidasi utile per saggiare la presenza nel plasmide dell'inserto di DNA esogeno; v) una regione polylinker con un sito unico di restrizione (ad esempio, HindIII), per il clonaggio dei frammenti di DNA esogeno, e con una sequenza di riconoscimento rara, come NotI, per l'excisione degli inserti. Talvolta, la regione polylinker può inoltre includere un sito cos, per linearizzare e facilitare la marcatura terminale del plasmide, e sequenze corrispondenti a promotori del fago λ, quali T7 ed SP6, per sintetizzare copie di RNA da usare come sonde (Fig. 19.11). Una volta linearizzato il vettore con lo specifico enzima di restrizione, i frammenti di DNA esogeno ottenuti con lo stesso enzima di restrizione possono essere inseriti attraverso una reazione di ligazione. Tali plasmidi sono infine impiegati per trasformare cellule competenti di E. coli. Le cellule batteriche trasformate possono quindi essere selezionate in base alla resistenza al cloramfenicolo, quando piastrate su un substrato di coltura minimo addizionato di questo antibiotico. Inoltre, le colonie composte di cellule contenenti plasmidi ricombinanti risulteranno bianche perché la presenza dell'inserto nel gene lacZ non consente loro di metabolizzare il disaccaride X-gal, mentre quelle con plasmidi privi dell'inserto saranno blu in quanto il gene lacZ non è interrotto e può presiedere la sintesi del relativo enzima. I vettori BAC sono attualmente utilizzati per il clonaggio di frammenti di lunghezza compresa tra 50 e 300 kb o più e risultano pertanto quelli più adatti per costruire librerie genetiche e mappe fisiche dei genomi di grandi dimensioni, come ad esempio il mais. I principali vantaggi di questi vettori di clonaggio, oltre alle dimensioni dei frammenti che consentono di clonare, sono connessi alla loro stabilità durante la replicazione e alla elevata efficienza di trasformazione in E. coli.

Attualmente la ricerca in questo settore è rivolta allo sviluppo di nuovi vettori di clonaggio dotati di maggiore stabilità combinata con la capacità di caricarsi di inserti

sempre più lunghi. Nel 1994, P.A. Ioannou e collaboratori hanno messo a punto cromosomi artificiali derivati dal batteriofago P1, chiamati PAC (P1 Artificial Chromosomes), vettori di clonaggio che possiedono alcune caratteristiche del genoma fagico naturale combinate con altre dei cromosomi artificiali batterici.

# 19.3 Genoteche: librerie di DNA genomico (gDNA) e di DNA complementare (cDNA)

La ricerca genetica è basata sul clonaggio dei geni di una specie al fine di poterne studiare la composizione, l'espressione e la funzione. La prima fase di caratterizzazione di un dato genoma quindi prevede la costruzione di genoteche.

Una genoteca, in gergo chiamata anche libreria genetica, equivale ad una collezione di moltissimi vettori di clonaggio, ciascuno dei quali contiene un particolare frammento di DNA genomico (gDNA) o di DNA complementare (cDNA) derivato dal genoma o dal trascrittoma di un determinato organismo. In particolare, una **libreria** 

genomica è costituita da una collezione di vettori di clonaggio (plasmidi, batteriofagi λ, cosmidi, BAC, ecc.) mantenuti in E. coli o in S. cerevisiae (YAC) e contenenti frammenti di restrizione di DNA genomico che nel loro insieme sono rappresentativi dell'intero genoma di un organismo. Ciò significa che le librerie genomiche contengono, oltre alle sequenze esoniche, anche le sequenze introniche, le sequenze di regolazione e le sequenze ripetute. Una libreria trascrittomica è ugualmente costituita da una collezione di vettori di clonaggio, ma contenenti frammenti di cDNA ottenuti per retrotrascrizione degli mRNA che nel loro complesso sono rappresentativi del solo trascrittoma di un organismo o di un suo specifico organo o tessuto. Le librerie di cDNA non contengono tutti i geni, ma unicamente le sequenze espresse nel tipo cellulare da cui sono stati isolati i messaggeri maturi. Tali collezioni si ottengono innanzitutto digerendo il DNA genomico con specifiche endonucleasi, il cDNA sintetizzato viene invece lasciato intatto, clonando i frammenti di restrizione o complementari ottenuti in vettori appropriati e trasformando infine le cellule batteriche per ottenere la moltiplicazione di tutti i frammenti.

Per la costruzione di librerie genomiche è possibile utilizzare il DNA genomico totale oppure il DNA nucleare purificato dalle componenti citoplasmatiche. Ad esempio, nelle piante il DNA mitocondriale e il DNA plastidiale possono rappresentare fino al 35% del DNA genomico totale. L'estrazione del DNA richiede l'omogeneizzazione del materiale vegetale, la rottura delle pareti e delle membrane cellulari in presenza di agenti stabilizzanti, la precipitazione del DNA genomico con etanolo o isopropanolo oppure l'isolamento del DNA nucleare mediante centrifugazione differenziale, la purificazione dall'RNA totale mediante trattamenti enzimatici (RNasi A) e dalle componenti polisaccaridiche e proteiche mediante l'uso di tamponi appropriati (ad esempio, fenolo-cloroformio) ed infine la valutazione della concentrazione e della purezza dei campioni mediante analisi spettrofotometrica o elettroforetica. Una volta isolato, purificato e quantificato il DNA genomico ad alto peso molecolare dalle cellule di un dato organismo – generalmente le estrazioni vengono fatte a

partire da giovani foglie – una determinata aliquota del campione è digerita con un enzima di restrizione, opportunamente scelto in funzione della specie, e i frammenti

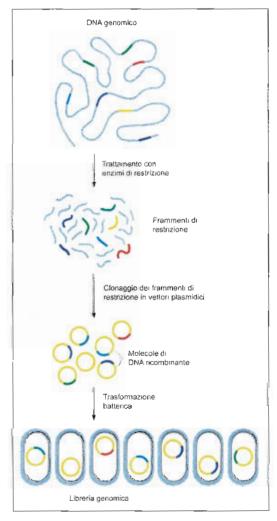


Fig. 19.12 – Costruzione di una libreria genomica.

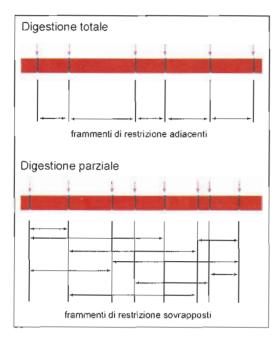


Fig. 19.13 - Digestione totale e parziale di DNA genomico.

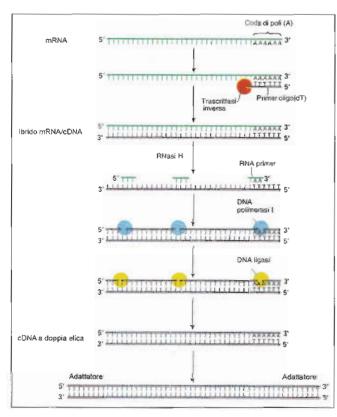


Fig. 19.14 – Sintesi di DNA complementare (cDNA) a doppia elica.

di DNA risultanti sono inseriti in vettori di clonaggio e mantenuti in E. coli (Fig. 19.12). Il tipo di endonucleasi usata per la restrizione del DNA genomico è fondamentale. Al fine di generare frammenti di restrizione di dimensioni adeguate per il clonaggio possono essere seguite due strategie: digestione del DNA con enzimi di restrizione che riconoscono sei coppie di basi (EcoRI, HindIII, BamHI, ecc.) oppure quattro coppie di basi (Sau3A, HaeIII, ecc.), usando quantità di enzima e modalità di reazione che consentano il taglio di tutte (digestione totale) o di una parte (digestione parziale) delle sequenze di riconoscimento. Rispetto a quella totale, la digestione parziale ha il vantaggio di generare una serie di frammenti sovrapposti di ogni regione cromosomica evitando così che un dato gene possa venire clonato in due o più parti senza frammenti sovrapposti (Fig. 19.13). I frammenti di restrizione vengono quindi clonati in vettori plasmidici appropriati e le molecole di DNA ricombinante prodotte sono infine usate per trasformare cellule di E. coli. Piastrando i batteri su un substrato di coltura selettivo è possibile selezionare quelli contenenti i plasmidi ricombinanti che produrranno colonie composte di milioni di cellule derivate da un'unica cellula trasformata. Ogni colonia ottenuta rappresenta una diversa sequenza genomica clonata poiché ogni batterio che ha dato origine ad una colonia conteneva probabilmente una diversa molecola di DNA ricombinante.

Per la costruzione di librerie di cDNA è necessario innanzitutto

isolare l'RNA totale da utilizzare successivamente per separare l'mRNA dagli altri tipi di RNA (rRNA e tRNA). Anche l'ottenimento dell'RNA totale richiede l'omogeneizzazione del materiale vegetale, la rottura delle pareti e delle membrane cellulari in presenza di agenti stabilizzanti, e l'estrazione degli acidi nucleici. La procedura sperimentale prevede quindi la digestione dal DNA mediante trattamenti nucleasici (DNasi), la precipitazione dell'RNA mediante cloruro di litio (LiC1), la purificazione dai contaminanti proteici e polisaccaridici mediante l'uso di tamponi appropriati (ad esempio, fenolo-cloroformio) ed infine la valutazione della concentrazione e della purezza dei campioni mediante analisi spettrofotometrica o elettroforetica (→ Cap. 17). Una volta isolato e purificato, l'RNA totale può essere impiegato per separare la frazione corrispondente all'mRNA sfruttando la presenza delle code poli(A) presenti nelle terminazioni 3' dei messaggeri maturi: quando un campione di RNA totale viene filtrato utilizzando una colonna con una membrana di cellulosa contenente brevi catene oligo-d(T), le molecole di mRNA vengono trattenute dalla membrana poiché i residui poliadenilici formano legami con le catene di acido deossitimidilico, mentre le molecole di rRNA e tRNA non sono trattenute e vengono perdute. Gli mRNA trattenuti possono essere rimossi dalla cellulosa e raccolti separatamente aumentando la forza ionica del tampone che passa all'interno della colonna, in modo da rompere i ponti idrogeno tra adenine e

timine. Una volta isolato l'mRNA dalle cellule di un particolare tessuto o organo (ad esempio, radici, fusto, foglie, fiori, frutti) ad uno specifico stadio di sviluppo, è possibi-

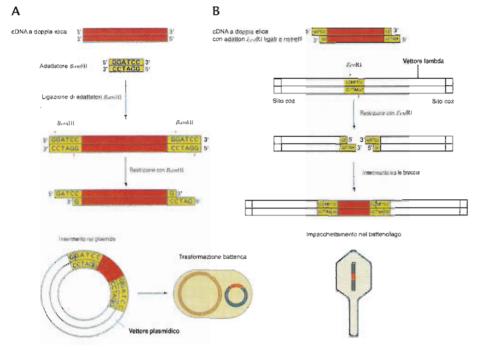


Fig. 19.15 – Clonaggio di cDNA in vettori plasmidici (A) e vettori derivati dal batteriofago  $\lambda$  (B).

le sintetizzare *in vitro* copie di DNA complementare (cDNA) mediante una DNA polimerasi RNA-dipendente chiamata trascrittasi inversa (Fig. 19.14). Questo enzima è infatti in grado di catalizzare la retrotrascrizione di una molecola di mRNA a partire dalla sua coda di poli(A) usando come innesco un primer oligo-d(T) in presenza di deossiribonucleosidi trifosfati (dNTP), producendo così una copia di DNA a singolo filamento. Successivamente, da ciascuna delle molecole ibride mRNA/cDNA è allontanato il filamento corrispondente al messaggero mediante idrolisi enzimatica usando l'RNasi H. Per la sintesi del secondo filamento di DNA può essere impiegata la DNA polimerasi I, che è in grado di produrre nuovi frammenti di DNA utilizzando come primer i residui parzialmente degradati di mRNA, in combinazione con la DNA ligasi, che invece unisce in modo covalente i nuovi frammenti fino a produrre un filamento completo di DNA. Il risultato finale è un insieme di molecole a doppia elica di DNA complementare o ds-cDNA (*double stranded* cDNA), le cui sequenze nel loro complesso sono rappresentative del trascrittoma del tipo cellulare di origine degli mRNA.

Una volta ottenuti i cDNA a doppia elica, è necessario ligare alle estremità di ogni singola molecola particolari adattatori (linker), cioè frammenti a doppia elica piuttosto brevi (8-12 pb) contenenti un sito di restrizione, in quanto sono indispensabili per l'inserzione dei frammenti di cDNA all'interno dei vettori di clonaggio. A questo punto, una determinata aliquota del campione di cDNA è digerita con l'enzima di restrizione specifico per l'adattatore usato in modo che i frammenti di cDNA risultanti possano venire successivamente clonati in vettori (plasmidi, batteriofagi  $\lambda$ , cosmidi, BAC) trattati con lo stesso enzima (**Fig. 19.15**). Le molecole di DNA ricombinante prodotte sono infine usate per trasformare  $in\ vitro$  cellule ospiti di  $E.\ coli$  oppure possono essere impacchettate nel batteriofago  $\lambda$  per infettare cellule di  $E.\ coli$ . Anche in questo caso, piastrando i batteri su un substrato di coltura selettivo è possibile selezionare le colonie o le placche prodotte da quelli contenenti i vettori plasmidici o fagici che portano l'inserto.

In pratica, una libreria di gDNA o di cDNA può essere considerata una collezione di vettori le cui unità risultano caricate ciascuna di una singola e diversa molecola ricombinante: il complesso delle molecole dovrebbe coprire tutta l'informazione ge-

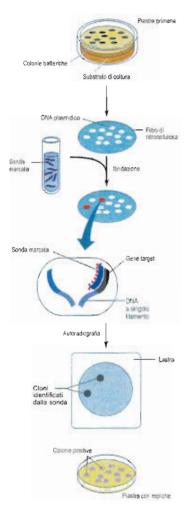


Fig. 19.16 – Screening di una libreria plasmidica.

netica contenuta nel genoma o nel trascrittoma di un dato organismo o di uno specifico organo. I geni e i prodotti genici di interesse potranno essere identificati ed isolati mediante uno *screening* dei cloni presenti in queste librerie impiegando procedure appropriate che variano a seconda delle informazioni disponibili e del tipo di libreria.

#### 19.4 Identificazione di geni nelle librerie genetiche

Singoli geni e sequenze nucleotidiche specifiche possono essere identificate ed isolate in librerie di DNA genomico o di cDNA usando metodi basati sull'impiego di sonde nucleotidiche opportunamente marcate. Una **sonda** è rappresentata da una sequenza nucleotidica, corrispondente ad una molecola di DNA genomico o ad una molecola di cDNA, che può essere impiegata per identificare singoli cloni a sequenza complementare presenti in una libreria genetica mediante esperimenti di ibridazione. Le sonde genomiche più utili per identificare geni in una libreria di un dato organismo sono quelle prodotte a partire da geni già identificati e caratterizzati in altri organismi (sonde eterologhe). Molto utili sono anche le sonde di cDNA sintetizzate a partire da un mRNA isolato nello stesso organismo (sonde omologhe) con analisi di espressione genica (ibridazione sottrattiva o amplificazione differenziale).

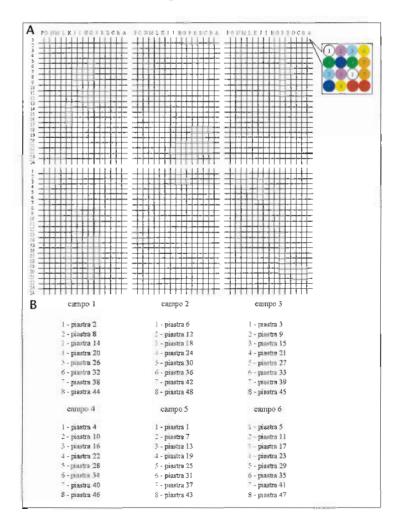


Fig. 19.17 – (A) Rappresentazione schematica di una membrana BAC. (B) Elenco ordinato delle piastre contenute in ogni campo.

La sonda genomica o di cDNA di un gene clonato in una data specie può essere impiegata per identificare un gene strutturalmente simile e funzionalmente omologo in piante appartenenti ad altre specie. Le sonde di interesse possono infatti essere clonate in vettori adatti, amplificate, eventualmente sequenziate e marcate radioattivamente al fine di poterle impiegare per lo *screening* di librerie. Qualora una data libreria contenga un clone con sequenza complementare alla sonda sarà possibile identificare tale clone ed isolare dal suo vettore il gene di interesse. Nei cereali, come ad esempio, riso, frumento, orzo e mais, molti geni sono stati clonati ricorrendo a sonde eterologhe. Il successo di questo approccio dipende dal grado di omologia nucleotidica tra geni di specie diverse aventi la stessa funzione. L'uso di sonde eterologhe è pertanto particolarmente adatto per geni altamente conservati.

Le analisi di librerie genetiche basate su vettori plasmidici e fagici sono sostanzialmente molto simili.

Lo screening di una libreria plasmidica secondo la procedura tradizionale prevede innanzitutto che le cellule batteriche vengano piastrate su un substrato di coltura selettivo e che le colonie risultanti possano svilupparsi e trasferirsi su un filtro di nitrocellulosa (Fig. 19.16). Ponendo il filtro a contatto con la piastra è possibile ottenere su questo una esatta replica delle colonie: tutte le colonie conserveranno la stessa posizione reciproca che avevano nel substrato di coltura. Successivamente il filtro è rimosso dalla piastra di coltura, trattato con diverse soluzioni per lisare i batteri (detergente SDS) e per denaturare il DNA dei cloni (idrossido di sodio NaOH). I singoli filamenti del DNA sono infine legati stabilmente al filtro di nitrocellulosa mediante trattamento termico o esposizione ai raggi UV. A questo punto il filtro con la collezione di cloni plasmidici della libreria può essere incubato con la soluzione contenente la sonda denaturata e marcata (in genere con radioisotopi) affinché le sequenze complementari possano ibridarsi. A seconda del tipo di libreria e di sonda usata si formeranno molecole ibride DNA/DNA, cDNA/cDNA o DNA/cDNA. Al termine dell'ibridazione, il filtro dovrà essere lavato per eliminare la sonda in eccesso e per rimuovere la sonda ibridatasi in maniera aspecifica, asciugato e quindi sottoposto ad autoradiografia per evidenziare il clone identificato dalla sonda. In base alla posizione del segnale sulla lastra sarà possibile risalire alla colonia batterica corrispondente sulla piastra così che si possa procedere all'isolamento e alla caratterizzazione del clone.

Attualmente, la procedura impiegata può contare sull'ausilio delle molteplici innovazioni tecnologiche introdotte. In particolare, le cellule batteriche trasformate vengono fatte crescere per circa un giorno in un substrato di coltura selettivo di consistenza solida. Quindi, per ciascuna colonia bianca sviluppatasi senza punti di contiguità con quelle circostanti alcune cellule batteriche vengono traferite, mediante un sistema completamente automatizzato, in un terreno di coltura liquido contenenuto entro un pozzetto di apposite piastre. In genere, ciascuna piastra presenta 384 pozzetti (16 × 24) ciascuno dei quali è identificato dalle sue coordinate: una lettera ed un numero progessivi, rispettivamente, per la riga e per la colonna. Pertanto, ogni piastra contiene 384 diversi cloni, ognuno individuato con il numero o codice della piatra stessa e le coordinate del pozzetto. Dopo averle trasferite in tali piastre, le cellule batteriche vengono fatte sviluppare per circa un giorno e quindi conservate a -80°C. La libreria genomica è quindi costituita dall'insieme delle piastre. Ricorrendo allo stesso robot, ogni singolo clone viene poi trasferito in membrane di nitrocellulosa organizzate secondo un preciso modello. Ad esempio, una membrana con un modello 4 × 4 è suddivisa in sei campi ciascuno dei quali è a sua volta suddiviso in 384 (16 × 24) quadrati di 4 mm di lato: ogni quadrato contiene gli otto cloni della stessa coordinata di altrettante piastre replicati secondo un determinato schema (Fig. 19.17). Pertanto, in un campo sono contenuti tutti i cloni di otto piastre e in una membrana così organizzata tutti quelli di quarantotto piastre. Nelle membrane i cloni sono presenti in duplice copia



Fig. 19.18 – Film autoradiografico ottenuto ibridando una membrana di una libreria BAC con una sonda RFLP (le frecce indicano i possibili cloni BAC contenenti l'allele marcatore).

per facilitare l'interretazione dei risultati degli esperimenti di ibridazione. Infatti, solo quando la posizione sul film autoradiografico di due segnali di ibridazione corrisponde ad uno degli otto modelli riportati in Fig. 19.17 è probabile che il clone corrispondente contenga una sequenza complementare a quella della sonda impiegata. Il sistema a doppio spot consente quindi di scartare i segnali derivanti da ibridazioni aspecifiche (falsi positivi). Inoltre, a ciascuno degli otto modelli di ibridazione in ogni campo della membrana corrisponde una determinata piastra (Fig. 19.17). Questo permette di identificare in maniera univoca il clone individuato in una ibridazione. Infatti, il numero della piastra è quello riportato nell'elenco per quel dato campo della membrana e modello di ibridazione, mentre le coordinate del pozzetto contenente il clone corrispondono a quelle del quadrato della membrana con i due segnali di ibridazione. Così se nel film autoradiografico si notano nel quadrato di coordinate A1 del campo 3 segnali corrispondenti al modello 5 significa che il clone del pozzetto A1 della piastra numero 27 della libreria genomica contiene il frammento di DNA ricercato. In Fig. 19.18 è riportato il risultato di una autoradiografia riguardante l'ibridazione di una membrana di una libreria BAC con una sonda derivante da un marcatore RFLP.

#### Quadro 19.1 - Nota tecnica sul genome coverage di una libreria

Per una qualsiasi libreria genomica, un parametro molto importante al fine di stabilime l'informatività è rappresentato dalla sua copertura genomica (genome coverage). Questo parametro può essere calcolato applicando la seguente formula: W=NI/G, dove W = copertura genomica, N = numero totale di cloni che costituiscono la libreria, I = lunghezza media dell'inserto di DNA espressa in pb e G = quantità totale di DNA del genoma aploide (valore C) della specie oggetto di studio espressa in pb. Prendendo, ad esempio, in considerazione una libreria genomica di soia (Glycine max) e tenendo conto che il valore C di questa specie è approssimativamente pari a 1,115x10° pb, qualora la libreria contenga 100.000 cloni con una dimensione media dell'inserto di 120.000

pb la copertura genomica della libreria stessa è teoricamente uguale a: W = (100.000 cloni x 120.000 pb)/1,115x10³ pb = 10,8. Tale libreria dovrebbe pertanto contenere 10,8 valori C di DNA di soia, ciò equivale a dire 10,8 volte (10,8X) il DNA nucleare totale di un gamete di questa specie. Con una copertura di 3X, la probabilità di trovare una particolare sequenza genomica in una libreria è approssimativamente del 95%. Aumentando la copertura a 5X, la probabilità che una libreria contenga tutte le sequenze genomiche della specie di interesse aumenta al 99%. Naturalmente, aumentando ancora il grado di copertura genomica possono aversi livelli di probabilità ancora maggiori. In Tab. 19.2 è riportata la copertura genomica di librerie BAC di A. thaliana e di alcune delle principali specie di interesse agrario. Qualora si intraprenda la costruzione di una libreria genomica, il

Tab. 19.2 – Copertura genomica di librerie BAC di A. thaliana e di alcune delle principali specie di interesse agrario.

Specie	Dimensione media degli inserti (kb)	No. di cloni	Genoma equivalenti	Enzima di restrizione
Arabidopsis	100	4.608	3,6X	Hinatu
	130	6.144	6,0X	BamHI
	182	7.680	10,0X	EcoRI
Cotone	148	38.400	2,5X	HindIII
	130	61.440	3,6X	BamHI
	142	38.400	2,4X	EcoRI
Riso (ssp. indica)	130	14.208	4,4X	HindUI
	150	7.680	2,7X	BarnHI
	147	9.600	3,3X	EcoRI
Riso (ssp. <i>japonica</i> )	150	7.296	2,6X	Hind\ II
	170	23.040	9,1X	BamHI
	156	23.040	8,3X	EcoRI
Mais (inbred B73)	147	60.288	3,4X	HindIII
	119	100.224	4,8X	BarriHI
	140	92.160	5,2X	EcoRI
Soia (var. Forrest)	125	35.328	4,8X	Hindill
	125	35.328	4,8X	BamHl
	157	38.400	5,4X	EcoRl
Pomodora	240	23.040	5,8X	Hindll
	125	36.864	4,8X	BamHI
Frumento	210	4.608		HindIII

Tab. 19.3 – Numero (N) teorico di cloni richiesti per avere una probabilità pari al 99% che un determinato clone sia rappresentato nella libreria considerando inserti di 40 kb (cosmidi), 150 kb (BAC) e 500 kb (YAC) di lunghezza e con riferimento a diverse specie di interesse agrario.

Specie	Nome comune	Genoma (Mb/1C)	Cosmidi (40 kb)	BAC (150 kb)	YAC (500 kb
Allium cepa	Aglio	15.290	1,8×10 <sup>6</sup>	4,7 × 10 <sup>5</sup>	1,4 × 10 <sup>5</sup>
Arabidopsis thaliana	Arabidopsis	145	1,7×10 <sup>4</sup>	$4.5 \times 10^{3}$	$1.3 \times 10^{3}$
Avena sativa	Avena	11.315	1,3×10°	3,5 × 10 <sup>5</sup>	1,0 × 10 <sup>5</sup>
Beta vulgaris ssp. esculenta	Barbabietola	758	8,7 × 10 <sup>4</sup>	2,3 × 10 <sup>4</sup>	$7.0 \times 10^{3}$
Brassica napus	Colza	1.182	1,4×10 <sup>5</sup>	3,2×104	1,1 × 10 <sup>4</sup>
Capsicum annuum	Peperone	2.702	$3.5 \times 10^{5}$	$9.4 \times 10^{4}$	$3.5 \times 10^{3}$
Citrus sinensis	Agrumi	382	4,4×10 <sup>4</sup>	1,2 × 10 <sup>4</sup>	3,5 × 10 <sup>3</sup>
Glycine max	Soia	1.115	$1.3 \times 10^{5}$	3,4 × 10 <sup>4</sup>	$1.0 \times 10^{4}$
Gossypium hirsutum	Cotone	2.246	1,8 × 10 <sup>5</sup>	6,9 × 10 <sup>4</sup>	2,1 × 10 <sup>4</sup>
Hordeum vulgare	Orzo	4.873	$5,6 \times 10^{5}$	$1.5 \times 10^{5}$	$4.5 \times 10^{4}$
Lactuca sativa	Lattuga	2.639	3,0 × 10 <sup>5</sup>	8,1×10 <sup>4</sup>	2,4 × 10 <sup>4</sup>
Lycopersicon esculentum	Pomodoro	953	$1.1 \times 10^{5}$	2,9 × 10 <sup>4</sup>	$8.8 \times 10^{3}$
Malus domestica	Melo	769	8,9 × 10 <sup>4</sup>	2,4×10 <sup>4</sup>	7,1 × 10 <sup>3</sup>
Manihot esculenta	Cassava	760	$8,7 \times 10^4$	$2.3 \times 10^{4}$	$1.0 \times 10^{3}$
Musa spp.	Banano	873	1,0 × 10 <sup>5</sup>	2,7 × 10 <sup>4</sup>	$8.0 \times 10^{3}$
Nicotiana tabacum	Tabacco	4.434	$5,1 \times 10^{5}$	$1.4 \times 10^{5}$	$4,1 \times 10^4$
Oryza sativa	Riso	431	5,0 × 10 <sup>4</sup>	1,3 × 10 <sup>4</sup>	4,0 × 10 <sup>3</sup>
Phaseolus vulgaris	Fagiolo comune	637	$7.4 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$	$5,9 \times 10^{3}$
Saccharum spp.	Canna da zucchero	3.000	$3.5 \times 10^{3}$	9,2 × 10 <sup>4</sup>	2,8 × 10 <sup>4</sup>
Sorghum bicolor	Sorgo	760	8,7 × 10 <sup>4</sup>	$2.3 \times 10^{4}$	$7.0 \times 10^3$
Triticum aestivum	Frumento tenero	15.966	1,8 × 10°	4,9 × 10 <sup>3</sup>	1,5 × 105
Zea mays	Mais	2.504	$2.9 \times 10^{5}$	7,7 × 104	2,3 × 10 <sup>4</sup>

primo parametro da stabilre corrisponde al numero di cloni necessari affinché questa possa includere, con una determinata percentuale di probabilità, tutte le sequenze genomiche. A tale scopo è possibile impiegare la precedente formula nella quale però, ovviamente, l'incognita è N, mentre W è dato dal livello di probabilità desiderato. Comunque, il numero totale di cloni (N) necessari può essere calcolato con maggiore accuratezza applicando una seconda formula: N=ln(1-P)/ln(1-I/G), dove P=livello di probabilità, <math>I=lunghezza media dell'inserto di DNA espressa in pb e G=quantità totale di DNA del genoma aploide (valore <math>C) della specie oggetto di studio espressa in pb.

Applicando questa formula, il numero di cloni richiesti per avere una probabilità del 99% che una particolare seguenza sia inclusa in diversi tipi librerie di A. thaliana ed alcune delle principali specie di interesse agrario sono riportati in Tab. 19.3. Comunque, entrambe queste formule presuppongono una distribuzione uniforme dei siti di restrizione lungo il genoma. In realtà, ciò non si verifica per nessuno degli enzimi di restrizione solitamente impiegati. Pertanto, lo studio dettagliato del genoma di una determinata specie dovrebbe essere basato sulla costruzione e sullo screening di due o tre librerie impiegando altrettanti enzimi di restrizione. Così regioni cromosomiche prive di siti riconosciuti dall'endonucleasi impiegata per costruire la prima libreria possono essere rappresentate nella seconda o nella terza ottenute con altre endonucleasi.

I plasmidi, così come i cosmidi e i cromosomi artificiali sono clonati nei batteri di E. coli che piastrati su substrato di coltura si moltiplicano formando colonie. Benché anche i fagi vengano clonati in E. coli, in questo caso i batteri sono infettati e lisati producendo placche. Lo screening di una libreria fagica prevede che la collezione di batteriofagi λ in sospensione venga disposta sopra uno strato batterico in una piastra di coltura affinché possano formarsi le placche (Fig. 19.19). Ogni placca è composta delle particelle fagiche prodotte attraverso cicli successivi di moltiplicazione e lisi di singole cellule batteriche inizialmente infettate. Quando le cellule batteriche vengono lisate, oltre alle nuove particelle fagiche vengono rilasciate anche numerose copie di DNA del vettore  $\lambda$  che non sono state impacchettate e che sono localizzate in corrispondenza delle singole placche. Ponendo un filtro di nitrocellulosa sopra la piastra di placche fagiche è possibile prelevare e trasferire sul filtro i DNA fagici presenti sulle singole placche. Successivamente il filtro è rimosso dalla piastra di coltura e trattato con soluzioni alcaline per denaturare il DNA dei cloni. I singoli filamenti del DNA sono infine legati stabilmente al filtro di nitrocellulosa. A questo punto il filtro con la collezione di cloni  $\lambda$  della libreria può essere incubato con la soluzione contenente la

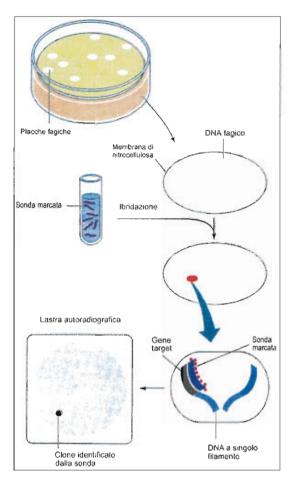


Fig. 19.19 – Screening di una libreria fagica per la ricerca di uno specifico clone.

sonda denaturata e marcata affinché le sequenze complementari possano ibridarsi, così come avviene per le librerie plasmidiche. Dopo l'analisi autoradiografica, la posizione del segnale di ibridazione evidenziato sulla lastra consentirà di risalire alla placca fagica corrispondente sulla piastra così che si possa procedere all'isolamento e alla caratterizzazione del clone.

Per un dato organismo, lo screening di librerie genomiche e trascrittomiche può essere condotto secondo strategie differenti di ibridazione delle colonie in funzione delle informazioni disponibili sul gene di interesse. Qualora il gene sia, infatti, già stato clonato in parte, si può usare il frammento noto come sonda omologa al fine di isolare il gene completo o un suo paralogo (gene omologo dello stesso organismo, derivante da duplicazione). Qualora il gene sia, invece, già stato clonato in un altro organismo, è possibile sintetizzare una sonda eterologa per tentare di isolare il gene corrispondente, con una sequenza presumibilmente simile, nell'organismo in esame, cioè di individuare il clone contenente il gene ortologo (gene omologo di un organismo diverso, risultato della speciazione). In entrambi casi, le sonde usate possono essere di DNA oppure di cDNA. La possibilità di successo con sonde derivanti dalla stessa specie di quella in esame (omologhe) è generalmente molto elevata, mentre nel caso di sonde eterologhe essa dipende dal grado di affinità tra la specie in cui il gene è stato clonato e quella in cui si intende clonare il gene. Quando invece il gene che codifica per il carattere di interesse non è mai stato clonato prima in nessuna specie, un approccio alternativo può essere basato sull'individuazione, ad esempio, di trascritti (mRNA) differenzialmente espressi tra tessuti o organi di uno stesso individuo, o specificatamente espressi in particolari cellule, oppure di DNA genomici polimorfici tra genotipi antagonisti per la manifestazione del carattere studiato. Sia i cDNA derivati dai trascritti che i DNA

genomici così isolati possono essere impiegati come sonde per analizzare librerie.

Lo screening di librerie trascrittomiche può essere condotto anche utilizzando vettori di espressione ed anticorpi specifici. In questo caso si evidenzia il clone di cDNA corrispondente all'mRNA che codifica per la catena polipeptidica riconosciuta dall'anticorpo. Tale approccio può essere attuato soltanto quando il prodotto genico è noto: la sequenza aminoacidica consente di selezionare una particolare regione corrispondente al determinante dell'antigene (epitopo) la cui struttura molecolare potrà venire riconosciuta da uno specifico anticorpo (→ Cap. 18). Poiché la sequenza aminoacidica è diversa in funzione del tipo di proteina, un determinato anticorpo è in grado di riconoscere specificatamente un sito molecolare di una particolare proteina. Così grazie al legame specifico tra antigene (prodotto genico) e anticorpo è possibile risalire al clone codificante per la catena polipeptidica nota. In questo caso, la procedura sperimentale per l'analisi dei prodotti genici richiede che i cloni vengano inseriti in vettori di espressione contenenti un promotore e i segnali di inizio e di fine della traduzione affinché all'interno di E. coli ogni DNA possa essere trascritto nel corrispondente mRNA e questo presieda alla sintesi della proteina codificata dal gene. Una volta costruita la libreria di cDNA con i vettori di clonaggio appropriati, le cellule di E. coli trasformate vengono piastrate su un substrato di coltura selettivo che lascia sviluppare soltanto le cellule batteriche trasformate e permette di riconoscere quelle contenenti il vettore con il cDNA. Tali colonie batteriche sono, quindi, trasferite su un filtro di nitrocellulosa posizionato sopra la piastra. Il filtro, con la replica delle colonie presenti sulla piastra, viene prima trattato per lisare le cellule e per immobilizzare sul filtro stesso le proteine fuoriuscite, e successivamente incubato con uno specifico anticorpo marcato con un isotopo radioattivo. Attraverso il procedimento autoradiografico sarà possibile visualizzare sulla lastra uno o più segnali dovuti alla reazione immunologica della proteina con l'anticorpo (**Fig. 19.20**). In base alla posizione del segnale può essere identificata la colonia, isolato il plasmide e sequenziato il clone di cDNA. Tale informazione può essere impiegata per eseguire analisi bioinformatiche allo scopo di individuare sequenze omologhe, cioè strutturalmente simili, nello stesso o in altri organismi nel tentativo di attribuire una funzione al trascritto. In alternativa, il clone di cDNA può essere usato come sonda per isolare il gene nucleare da una libreria di DNA genomico.

Quando il prodotto genico non è noto, un approccio che può essere usato per l'isolamento di geni prevede la marcatura molecolare secondo una metodologia definita *gene tagging*. In questo caso, la ricerca di geni è connessa a fenomeni di mutagenesi inserzionale che determinano una manifestazione evidente a livello fenotipico. Gli elementi trasponibili o trasposoni ( $\rightarrow$  Cap. 7) delle piante e i T-DNA plasmidici di agrobatterio rappresentano le sequenze genetiche più utilizzate per la marcatura molecolare dei geni.

Gli elementi trasponibili, spesso indicati con l'acronimo TE (transposable elements), sono porzioni di DNA capaci di liberarsi e trasferirsi in molteplici posizioni all'interno del DNA cromosomico del genoma ospite. In alcune piante, come mais ed Antirrhinum majus, sono stati individuati sistemi endogeni e studiati in modo approfondito elementi genetici in grado di trasporre con una certa frequenza, mentre in altre piante, come pomodoro, riso e Arabidopsis, sono stati introdotti mediante trasformazione genetica trasposoni eterologhi che hanno conservato la capacità di trasporre nel genoma. La trasposizione di un tratto di DNA entro la sequenza codificante di un gene, o in corrispondenza delle sue sequenze di regolazione, può modificare l'espressione del gene stesso, risultando nella manifestazione alterata di un particolare carattere. Analogamente, anche l'inserzione di una parte di DNA plasmidico, il T-DNA (transferred DNA), nel genoma di una pianta mediante infezione con Agrobacterium può interessare il locus di un dato gene modificando l'espressione del gene stesso e conseguentemente del carattere da questo controllato. Pertanto, la mutagenesi inserzionale come strategia di clonaggio genico richiede, da un lato, la generazione di nuovi mutanti promuovendo la trasposizione attraverso la riproduzione sessuale e, dall'altro, la produzione di mutanti per inserzione di T-DNA mediante la trasformazione genetica. Una volta trasposto in vivo il DNA dell'elemento trasponibile oppure trasferito in vitro il T-DNA plasmidico, è possibile disporre di popolazioni di individui mutati in cui l'avvenuta inserzione della sequenza esogena in corrispondenza di una sequenza genica è rivelata dal cambiamento del fenotipo. L'analisi di librerie genetiche, costituite a partire dagli individui mutati, prevede in questo caso l'impiego di sonde rappresentate da sequenze capaci di ibridarsi con l'elemento trasponibile o con il T-DNA plasmidico. Il clone della libreria identificato attraverso questa procedura può permettere l'isolamento della regione cromosomica fiancheggiante il DNA trasposto o trasferito e la sua caratterizzazione, consentendo così il clonaggio dei geni. Le caratteristiche insolite quanto peculiari degli elementi trasponibili e dei plasmidi agrobatterici hanno reso questi strumenti fondamentali per la ricerca genetica molecolare.

La strategia di clonaggio genico nota come *forward genetics* (dal fenotipo o dalla funzione al gene) è basata sull'isolamento di geni che determinano particolari fenotipi. La disponibilità di genotipi mutanti e selvatici per un particolare carattere nell'ambito di una data specie consente di ricercare il prodotto genico (mRNA) espresso in maniera differenziale tra questi e di isolare sonde specifiche per analizzare una qualsiasi libreria genetica rappresentativa dell'organismo in esame. In questo modo è possibile identificare e caratterizzare il gene corrispondente. Qualora la sequenza del gene sia invece nota o possa essere facilmente marcata, mentre il fenotipo a questo associato sia scono-

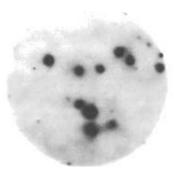


Fig. 19.20 – Risultato di una analisi autoradiografica di un filtro ibridato con uno specifico anticorpo marcato per l'identificazione di colonie di una libreria esprimenti una determinata proteina.

sciuto, la creazione di tipi difettivi mediante mutagenesi inserzionale può consentire di risalire alla funzione del gene. Questo secondo tipo di strategia è quindi detta *reverse genetics* (dal gene al fenotipo o alla funzione). Sia gli elementi trasponibili che i T-DNA plasmidici rappresentano al momento gli strumenti più efficaci di clonaggio genico poiché consentono di produrre larghe collezioni di fenotipi mutanti e di identificare rapidamente i geni corrispondenti in librerie genetiche appositamente costituite per questi organismi. Una strategia alternativa alla transgenesi messa a punto più recentemente è rappresentata dal TILLING: si tratta di una tecnica di genetica inversa per lo studio della funzione che prevede la disattivazione mirata di geni identificati mediante l'analisi di sequenza (→ Cap. 18).

#### 19.5 Sequenziamento dei geni

Le prime procedure per il sequenziamento del DNA vennero messe a punto nel 1977 quando A.M. Maxam e W. Gilbert idearono un metodo di sequenziamento basato sul trattamento con reagenti chimici capaci di degradare una molecola di DNA in corrispondenza di specifici nucleotidi. Qualche anno dopo, nel 1981, F. Sanger e collaboratori svilupparono un altro metodo di sequenziamento basato, invece, sulla sintesi enzimatica di molecole di DNA complementari che terminano in corrispondenza di specifici nucleotidi. Con entrambi i metodi, la visualizzazione della sequenza mediante autoradiografia richiedeva la separazione elettroforetica dei frammenti marcati, tagliati o amplificati, in un gel di poliacrilammide altamente selettivo. In principio questi due metodi furono ugualmente utilizzati, ma in anni recenti il metodo di Sanger è divenuto quello più diffuso, principalmente perché è stato più facilmente automatizzato, mentre quello di Maxam e Gilbert è stato in pratica abbandonato.

Il materiale di partenza per il metodo di sequenziamneto ideato da Sanger, chiamato anche metodo dideossi, è rappresentato da una popolazione numerosa di molecole di DNA identiche ottenute attraverso amplificazione enzimatica oppure batterica (E. coli). Il sequenziamento prevede l'impiego di un primer oligonucleotidico complementare ad una sequenza terminale del frammento prodotto per PCR o ad una sequenza del DNA plasmidico adiacente al frammento clonato da sequenziare (Fig. 19.21). In entrambi i casi il primer usato presenta l'estremità 3' verso la parte interna del frammento di DNA da sequenziare ed agisce come innesco per la sintesi di un nuovo filamento di DNA complementare allo stampo. La reazione di sintesi è catalizzata dall'enzima DNA polimerasi, avviene in direzione 5'  $\rightarrow$  3' a partire dall'ossidrile contenuto nel primer oligonucleotidico e richiede i quattro deossiribonucleosidi trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) come precursori del DNA. Il sequenziamento di un clone richiede quindi uno stampo di DNA a singolo filamento e prevede quattro differenti reazioni di sintesi: ognuna avviene in presenza dello stesso DNA stampo, della DNA polimerasi e dei quattro dNTP precursori, opportunamente marcati con 32P al fine di evidenziare i frammenti di DNA copiati. In ciascuna delle quattro reazioni viene, inoltre, aggiunto uno specifico dideossiribonucleoside trifosfato (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP). Siccome la DNA polimerasi non è in grado di discriminare tra il ddNTP e il corrispondente dNTP, ognuno dei possibili dideossiribonucleotidi può essere incorporato nella catena di DNA in allungamento. In queste condizioni la sintesi di nuovi filamenti non può comunque proseguire ininterrottamente poiché il dideossiribosio all'estremità 3' possiede un H, anziché un OH come il deossiribosio. Pertanto, quando i ddNTP vengono inseriti determinano automaticamente il blocco della reazione di sintesi in quanto non può formarsi il legame fosfodiesterico con il nucleotide successivo. Affinché la sintesi del nuovo filamento non venga sempre interrotta, il precursore dideossi è aggiunto in quantità pari a circa 1/100 di quella del precursore normale. Ciò significa che durante la fase di

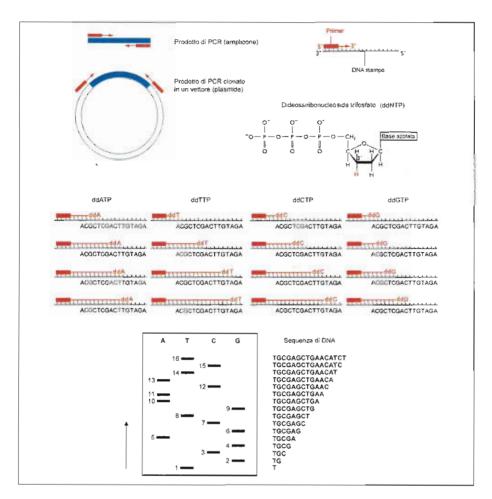


Fig. 19.21 – Metodo di sequenziamento a terminazione di catena ideato da Sanger, chiamato anche metodo dideossi.

allungamento del nuovo filamento, quando il filamento stampo prevede l'inserimento di un particolare nucleotide sul filamento nuovo, la probabilità che possa essere incorporato un precursore ddNTP, anziché il corrispondente precursore dNTP, è pari a circa l'1%. Ad esempio, in presenza di ddGTP, la terminazione della catena potrà avvenire nelle posizioni corrispondenti alle citosine del DNA stampo, qualora tale precursore venga incorporato al posto del precursore dGTP. Tuttavia, nella maggioranza dei casi sarà incorporato il nucleotide normale e questo implica che le catene seguiteranno ad allungarsi fino a quando casualmente non verrà ancora inserito lo specifico nucleotide dideossi. Il risultato di questa reazione è quindi un insieme di nuovi filamenti di DNA di diversa lunghezza, tutti terminanti però con un ddGTP. Analogamente, anche in presenza di ddCTP, ddATP o ddTTP, la terminazione della catena potrà avvenire nelle posizioni corrispondenti, rispettivamente, alle guanine, timine o adenine del DNA stampo, qualora ognuno di questi precursori venga incorporato al posto del precursore normale. Il risultato delle reazioni è pertanto un insieme di nuovi filamenti di DNA di diversa lunghezza, tutti terminanti con un ddCTP, ddATP o ddTTP. I prodotti di sintesi delle quattro reazioni condotte in presenza dei singoli ddNTP devono essere infine separati mediante elettroforesi in un gel di poliacrilammide caricando quattro pozzetti adiacenti: in ogni corsia saranno pertanto presenti i frammenti terminanti con una determinata base azotata. Poiché la mobilità dei frammenti è inversamente proporzionale al logaritmo della loro lunghezza, al termine della corsa elettroforetica i frammenti più grandi in assoluto occupano le posizioni prossime ai pozzetti di caricamento, mentre i frammenti

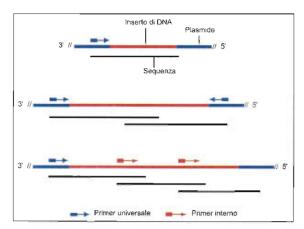


Fig. 19.22 – Diversi tipi approccio per il sequenziamento con primer universali (disegnati sulle braccia del vettore) e primer interni (disegnati sull'inserto clonato nel vettore).



Fig. 19.23 – Lastra autoradiografica di una sequenza nucleotidica ottenuta con sistema manuale seguendo il metodo dideossi.

più piccoli migrando più velocemente sono localizzati nella parte più bassa del gel. I frammenti possono essere quindi visualizzati come bande discrete su una lastra mediante tecnica autoradiografica dato che le reazioni di sintesi vengono condotte usando nucleotidi marcati con <sup>32</sup>P. La sequenza del DNA, nella direzione 5' → 3', può essere letta direttamente sulla lastra a partire dalla banda che occupa la posizione più bassa, seguendo contemporaneamente le quattro corsie e muovendosi verso la banda nella posizione più alta, sapendo che due bande successive differiscono per un singolo nucleotide (Fig. 19.21). Il frammento di DNA che ha migrato di più (banda più bassa) corrisponde quindi al filamento la cui sintesi è stata interrotta con l'incorporazione di un ddNTP nella prima posizione del filamento stampo e quindi indica il nucleotide iniziale della sequenza, mentre il frammento di DNA che ha migrato di

meno (banda più alta) corrisponde al filamento la cui sintesi è stata interrotta con l'incorporazione di un ddNTP nell'ultima posizione del filamento stampo e quindi indica il nucleotide finale della sequenza.

Il metodo di sequenziamento a terminazione di catena messo a punto da Sanger richiede pertanto uno stampo di DNA a singolo filamento e un primer oligonucleotidico, capace di appaiarsi specificatamente al DNA stampo, innescando l'attività di sintesi della DNA polimerasi e stabilendo anche la regione del DNA stampo che verrà sequenziata. Nel caso delle analisi di sequenziamento di frammenti di DNA clonati in plasmidi viene usato un primer universale, complementare al DNA del vettore nella regione immediatamente adiacente al sito di inserzione del DNA esogeno. I vettori di clonaggio comunemente usati per il sequenziamento di prodotti di PCR includono specifiche regioni sia a monte che a valle rispetto ai siti di clonaggio del polylinker riconosciute dai primer forward e reverse. Qualora l'inserto da sequenziare sia piuttosto breve è sufficiente utilizzare un primer ad una o all'altra estremità del plasmide per avere l'intera sequenza, mentre nel caso di inserti particolarmente lunghi (>600 pb) può essere necessario effettuare due distinte analisi di sequenziamento, a partire da entrambe le estremità del plasmide, in modo da ottenere sequenze parzialmente sovrapponibili nella regione centrale. In alternativa, è possibile estendere la sequenza in una direzione, sintetizzando un primer interno disegnato in una posizione corrispondente all'estremità della sequenza ottenuta. Tale primer consentirà l'ottenimento di una seconda sequenza parzialmente sovrapponibile a quella precedente (Fig. 19.22).

In seguito alla scoperta della reazione a catena della polimerasi (PCR) è stato possibile mettere a punto nuovi protocolli per il sequenziamento a terminazione di catena. In particolare, nel 1992 L.E. Sears e collaboratori hanno sviluppato un metodo di sequenziamento a ciclo termico, basato sulla PCR, che prevede l'impiego di una molecola stampo di DNA a doppio filamento, una DNA polimerasi termostabile (Taq DNA polimerasi), un singolo primer oligonucleotidico e uno solo dei quattro ddNTP in ogni miscela di reazione contenente anche i precursori normali (dNTP). La presenza di un solo primer non rende possibile l'amplificazione, ma può unicamente innescare la copiatura di uno dei due filamenti del DNA stampo, così come la presenza del precursore dideossi può provocare l'arresto dell'allungamento quando sul filamento che funge da stampo è presente un nucleotide con base azotata complementare. A differenza di una PCR vera e propria, i prodotti di sintesi non sono quindi accumulati in modo esponenziale, ma aumentano in modo lineare ad ogni ciclo di reazione. L'insieme dei prodotti di sintesi delle quattro reazioni così condotte in presenza di ddGTP, ddCTP, ddATP e ddTTP può essere analizzato mediante elettroforesi in un gel di poliacrilammide e la sequenza del DNA può essere letta secondo il modo usuale (Fig. 19.23). Pertanto, affinché i frammenti di DNA di nuova sintesi possano venire

visualizzati come bande discrete sulla lastra autoradiografica è necessario che la reazione di sequenziamento venga condotta con un nucleotide marcato con <sup>32</sup>P.

In anni recenti, l'introduzione dei metodi di marcatura fluorescenti al posto di quelli radioattivi e delle tecniche di elettroforesi capillare ha consentito la messa a punto di sistemi automatizzati per il sequenziamento dei genomi. A ciascuno dei quattro precursori dideossi (ddNTP) può essere associato un diverso marcatore fluorescente. Ciò significa che le quattro reazioni di terminazione di catena possono essere effettuate in una sola provetta contemporaneamente, con ciascuno dei dideossiribonucleosidi trifosfato marcato con una diversa sostanza fluorescente, cosicché i frammenti di DNA di nuova sintesi che terminano con una G, C, A o T siano tra loro riconoscibili in base alla fluorescenza emessa. Con i sequenziatori automatici, i prodotti delle reazioni di terminazione sono separati mediante un gel di poliacrilammide come nel metodo originario oppure più frequentemente attraverso un capillare contenente uno speciale polimero ed i segnali fluorescenti di ogni prodotto di terminazione sono captati da un rilevatore di fluorescenza che è in grado di discriminare i quattro diversi marcatori. In questo modo la sequenza può essere letta direttamente non appena le bande fluorescenti passano davanti al rilevatore e visualizzata sotto forma di

elettroferogramma (Fig. 19.24). La sequenza è rappresentata graficamente da una serie di picchi di colore diverso, solitamente nero per G, blu per C, verde per A e rosso per T. Attraverso queste tecniche automatizzate è stato possibile e sarà possibile in futuro generare dati di sequenze in modo sufficientemente veloce da poter realizzare progetti di sequenziamento di interi genomi. Tra gli organismi ritenuti importanti per la ricerca agraria che sono stati sequenziati interamente o in larga parte è possibile citare: S. cerevisiae (lievito), C. elegans (nematode) e piante ritenute modello come Arabidopsis thaliana, Oryza sativa e Medicago truncatula.

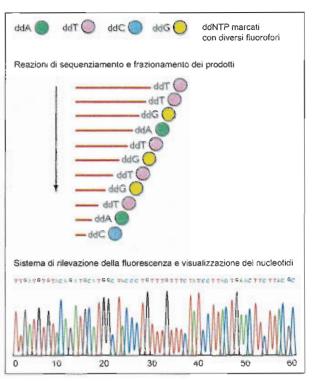


Fig. 19.24 – Sequenziamento automa-

#### Quadro 19.2 - Sequenziamento dei genomi

Il sequenziamento del genoma di una data specie si ottiene analizzando la sequenza dei singoli cromosomi del corredo di base. Le sequenze dei cromosomi interi sono ricostruite a partire dalle sequenze di centinaia di migliaia di frammenti di DNA. Si possono seguire due diverse strategie tra loro complementari: il sequenziamento di tipo gerarchico e il sequenziamento col metodo shotgun. La differenza sta nel fatto che il metodo gerarchico prevede la definizione preliminare di un sentiero di riferimento attraverso la generazione e l'allineamento di cloni lunghi fino a 200 kb, in modo che la sequenza sia ricostruibile ordinando tra loro questi grandi frammenti cromosomici, mentre il metodo shotgun implica una frammentazione diretta del genoma in piccoli frammenti cromosomici direttamente seguenziabili, affidandosi poi ad algoritmi per ricostruire l'ordine dei cloni, generalmente lunghi tra 500 e 800 pb (Fig. 19.25). Pertanto, nel primo caso, i cloni sono prima messi fisicamente in ordine e un sottogruppo di questi cloni, aventi una sovrapposizione tale da garantire la copertura dell'intero genoma, viene scelto per il sequenziamento di tipo shotgun. Nel secondo caso, invece, non viene perseguito alcun tentativo di mettere fisicamente in ordine i cloni, ma si procede direttamente col sequenziamento dei frammenti dell'intero genoma, usando algoritmi che allineano i cloni sulla base delle loro regioni di sovrapposizione. Le procedure di sequenziamento genomico adottano a un certo livello il metodo shotgun, mentre le strategie di tipo gerarchico si usano per ottenere una maggiore corrispondenza tra le ricostruzioni ottenute dal sequenziamento shotgun dell'intero genoma

Le strategie gerarchiche sono state ideate alla fine degli anni '80 del secolo scorso, quando le procedure di sequenziamento automatico ad alta intensità non erano ancora state sviluppate e i computer non erano ancora abbastanza potenti per elaborare sequenze di interi genomi ottenute tramite shotgun. Le tecniche per clonare lunghi frammenti di genomi e mantenerli in condizioni stabili sono progredite rapidamente negli anni 1990-2000: il risultato è stato che i progetti genoma di E. coli, S. cerevisiae, C. elegans e A. thaliana si sono avvalsi di metodi ancora più efficienti di sequenziamento gerarchico. La strategia fondamentale del sequenziamento gerarchico è ancora applicabile a qualunque or-

ganismo ed è stata alla base del Progetto Genoma Umano. La prima fase del sequenziamento gerarchico è quella di costruire librerie genomiche mediante digestione parziale del DNA con enzimi di restrizione o frammentazione del DNA con sonicazione al fine di avere cloni di dimensioni comprese tra 50 e 200 kb. I vettori in cui è possibile inserire frammenti di DNA di tali lunghezze comprendono i cromosomi artificiali di lievito (BAC, bacterial artificial chromosomes) e i vettori derivati dal fago P1 (PAC, P1 artificial clones). È determinante ottenere una ridondanza compresa tra cinque e dieci volte: ciò significa che ogni parte del genoma dovrebbe essere rappresentata almeno cinque volte nella libreria dei cloni. Dal momento che ogni clone risulta caratterizzato da estremità diverse, in teoria è possibile selezionare una impalcatura di cloni che formino una sequenza contigua comprendente l'intero cromosoma, tramite allineamento delle regioni di sovrapposizione dei cloni (contig). La ricostruzione gerarchica dell'impalcatura di una sequenza di "contig" è effettuata mediante una combinazione di tre metodi: i) ibridazione con sonde specifiche (procedura di chromosome walking); ii) analisi delle mappe di restrizione (procedura di fingerprinting); iii) sequenziamento di una estremità (procedura di end-sequencing). Una volta scelto il percorso minimo sovrapposto (tiling path) combinando le sequenze dei contig, i singoli cloni genomici di grosse dimensioni sono ulteriormente suddivisi in piccoli frammenti che saranno utilizzati per il sequenziamento automatico. L'assemblaggio della stesura preliminare di un genoma a partire da cloni sequenziati singolarmente si ottiene allineando i cloni adiacenti aventi sequenze sovrapposte alle estremità (merging). Le risultanti impalcature di sequenze contig costituiscono la stesura preliminare del genoma, che in seguito è completata colmando tutte le lacune rimanenti, risolvendo tutte le ambiguità e aumentando la qualità della sequenza fino a un valore di errore stimato a meno di 1 su 10.000 basi.

La fase cruciale del sequenziamento shotgun è quella di usare algoritmi per ricostruire al computer la sequenza di contig derivati da migliaia di cloni sovrapposti. In questo caso, i contig sono isolati direttamente a partire da una libreria plasmidica costruita per un intero genoma. L'assemblaggio delle sequenze contique serve ad ottenere un allineamento dei cloni, ma anche a migliorare l'accuratezza della sequenza ricostruita combinando i vari cloni, tramite la produzione di una sequenza consenso.

Infine, le impalcature di sequenze contig sono assegnate a posizioni precise sui cromosomi. Questo si può realizzare appaiando il tratto assemblato con sequenze geniche precedentemente

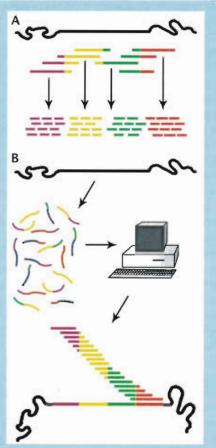


Fig. 19.25 - Sequenziamento dei cromosomi in ordine gerarchico (A) e col metodo shotgun (B).

clonate e posizionate su mappe genetiche mediante analisi di segregazione (marcatori STS) oppure localizzate su mappe fisiche mediante ibridazione in situ (analisi FISH).

#### 19.6 Piante geneticamente modificate (PGM): metodi di trasformazione genetica

Geni di origine diversa, non solo vegetale, ma anche animale, batterica e virale, possono essere isolati, clonati in adeguati vettori, caratterizzati, eventualmente modificati con tecniche di ingegneria genetica, ed infine trasferiti nella cellula vegetale secondo diversi metodi di trasformazione genetica. La trasformazione genetica nelle specie vegetali prevede generalmente l'inserimento di geni nel genoma di una cellula che successivamente deve potersi evolvere in modo da rigenerare una pianta completa. Le piante ottenute in questo modo sono dette transgeniche poiché nel loro genoma sono stati incorporati geni esogeni (transgeni) senza la mediazione del processo sessuale. La transgenesi finalizzata all'ottenimento di piante geneticamente modificate (PGM) è quindi basata sulla tecnologia del DNA ricombinante, richiedendo la costruzione in vitro di molecole di DNA chimeriche e l'utilizzazione di vettori di clonaggio e di trasferimento di DNA esogeno, nonché sulle tecniche proprie delle colture in vitro di espianti cellulari al fine di rigenerare piante complete grazie alla totipotenza delle cellule vegetali.

La produzione di piante transgeniche prese avvio quando i biologi molecolari scoprirono che *Agrobacterium tumefaciens* poteva essere impiegato per il trasferimento e l'integrazione di geni esogeni nelle cellule vegetali. Fu provato che tale batterio, che in natura infetta le cellule vegetali provocando la malattia, nota come cancro del colletto o anche galla del colletto (*crown gall*), presenta un **plasmide Ti** (*tumor inducing plasmid*) con un segmento particolare detto T-DNA che è trasmesso dal batterio alle cellule vegetali, inducendo la formazione del tumore (**Quadro 19.3**). Una volta dimostrato che tale segmento plasmidico, il T-DNA batterico, era in grado di integrarsi per ricombinazione nel DNA cromosomico della cel·lula vegetale, si riuscì a modificare il plasmide Ti in modo da rendere efficiente questo processo senza l'inconveniente della proliferazione cellulare incontrollata dovuta ai geni per la tumorogenesi.

Le prime piante transgeniche furono prodotte intorno al 1980-1982 da quattro gruppi di ricerca indipendenti (Washington University di St. Louis, Missouri, USA; Rijksuniversiteit di Gent, Belgio; Monsanto Co. di St. Louis, Missouri, USA: University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA). I primi tre gruppi annunciarono contemporaneamente (gennaio 1983), in una conferenza tenutasi a Miami, Florida, che avevano inserito con successo geni batterici in organismi vegetali; il quarto gruppo annunciò qualche mese dopo (aprile 1983), in una conferenza tenutasi a Los Angeles, California, che erano stati in grado di inserire un gene vegetale da una specie ad un'altra.

Il gruppo dell'Università di St. Louis, guidato da Mary-Dell Chilton, produsse una pianta transgenica di una specie selvatica di tabacco, *Nicotina plumbaginifolia*, resistente all'antibiotico kanamicina; Jeff Schell e Marc Van Montagu, dell'Università di Gent, avevano invece prodotto piante di tabacco resistenti a kanamicina e metatrexato, un composto usato per trattare il cancro e l'artrite reumatoide; Robert Fraley. Stephen Rogers e Robert Horsh della Monsanto, produssero piante di pisello resistenti a kanamicina. Il gruppo dell'Università del Wisconsin, guidato da John Kemp e Timothy Hall, aveva invece trasferito con successo un gene di fagiolo in una pianta di girasole. Queste ricerche furono condotte prevalentemente su piante modello, ma la transgenesi subito dopo cominciò ad essere applicata alle specie di interesse agrario per il miglioramento di caratteri agronomici e commerciali.

La trasformazione genetica può avvenire per trasferimento diretto oppure per trasferimento mediato del transgene. Con i metodi di **trasferimento diretto** il costrutto di DNA contenente il transgene è inizialmente inserito in vettori di clonaggio, di solito plasmidi di *E. coli*, e successivamente estratto dal batterio, linearizzato ed inserito nelle cellule vegetali seguendo procedure diverse affinché queste possano integrare il DNA esogeno nel loro genoma. I metodi di **trasferimento mediato**, invece, prevedono lo sfruttamento delle capacità naturali di virus e soprattutto di batteri fitopatogeni, opportunamente modificati. Una volta amplificati, i transgeni sono infatti rimossi dai vettori di clonaggio ed inseriti entro vettori di trasformazione (virioni o plasmidi) per il loro trasferimento nel genoma della cellula vegetale mediato da un virus o da un batterio. In generale i metodi di trasferimento diretto sono meno efficienti di quelli che prevedono l'uso di vettori virali o batterici e per questo motivo sono impiegati soprattutto nelle monocotiledoni per le quali i metodi di trasferimento mediato non danno buoni risultati.

#### 19.6.1 Metodi di trasferimento genico mediato da virus e agrobatteri

Il trasferimento genico mediato può essere realizzato ricorrendo a vettori virali oppure agrobatterici. Come vettori di transgeni, i virus e i batteri si prestano ad applicazioni tra loro molto diverse poiché soltanto questi ultimi consentono l'integrazione permanente dei geni esogeni nei cromosomi della cellula vegetale (Fig. 19.26). A seconda dell'organismo impiegato per la trasformazione, l'espressione dei transgeni nelle piante può essere stabile oppure transiente. Nel primo caso, i transgeni possono esprimersi dopo essere stati integrati stabilmente nei cromosomi della pianta (espressione stabile), così che l'informazione genetica possa trasmettersi alle generazioni successive. Nel secondo caso, la pianta non è modificata geneticamente, ma è impiegata soltanto come mezzo di propagazione di un virus vegetale: si parla di espressione transiente poiché la modificazione dovuta al transgene avviene totalmente a carico del genoma del virus e la pianta non è altro che il suo ospite temporaneo.

Per la trasformazione genetica dei vegetali possono funzionare da vettori i virus fitopatogeni. Alcuni virus sono infatti in grado di replicare i propri acidi nucleici all'interno delle cellule vegetali, fino a produrne un numero elevatissimo di copie, con meccanismi diversi a seconda della natura (DNA o RNA) del loro genoma. Potendosi inoltre diffondere attraverso i plasmodesmi, i virus sono in grado di invadere rapidamente i tessuti della pianta ospite.

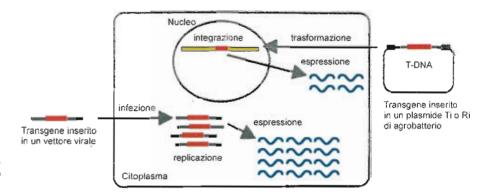
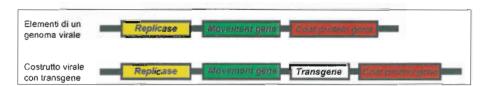


Fig. 19.26 – Confronto tra vettori virali e plasmidici riguardo alle loro modalità di espressione.

I vettori virali di trasformazione attualmente disponibili derivano sia da virus a singola elica di RNA che da virus a doppia elica di DNA, in entrambi i casi modificati attraverso tecniche di ingegneria genetica. Ad esempio, il DNA di un caulimovirus, come il virus del mosaico del cavolfiore o CaMV (Cauliflower Mosaic Virus), contiene il gene II che può essere parzialmente o totalmente rimosso e sostituito con un gene esogeno senza che il virus stesso perda la capacità di infettare la pianta e svilupparsi nelle sue cellule. Il genoma di un virus usato come vettore in esperimenti di trasformazione genetica è costituito da tre elementi essenziali: i) i geni per la replicazione (replicase) del materiale genetico; ii) il gene per il movimento (movement gene) nel-l'ospite; iii) il gene per la sintesi della proteina di rivestimento (coat protein gene) del capside (Fig. 19.27). Qualsiasi gene esogeno può essere inserito in un vettore virale

Fig. 19.27 – Elementi costitutivi essenziali di un genoma virale e vettore modello per l'espressione transiente di un gene esogeno in pianta.



ed espresso in un organismo vegetale ma, a differenza di quanto accade per alcuni virus animali, i virus fitopatogeni non integrano il proprio genoma nei cromosomi dell'ospite. L'utilizzazione di un virus come vettore nella trasformazione di specie vegetali offre dunque la possibilità di ottenere elevati livelli di espressione transiente dei geni trasferiti. Molto usato per studiare in via preliminare gli effetti fenotipici dei geni è un virus a RNA appartenente ai tobamovirus, il virus del mosaico del tabacco o TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) che infetta molte specie di *Solanaceae* e consente di avere risultati in tempi molto più brevi (2-4 settimane) rispetto ai metodi che richiedono la rigenerazione delle piante transgeniche.

La trasformazione genetica con vettori derivati da **plasmidi agrobatterici** è invece la strategia che ha consentito di raggiungere i maggiori successi nei vegetali, soprattutto nelle specie dicotiledoni, sia erbacee che arboree.

Un'altra specie di agrobatterio da cui sono stati derivati vettori di trasformazione è A. rhizogenes. In questo caso il plasmide è denominato plasmide Ri (root inducing plasmid) poiché tale agrobatterio causa la malattia chiamata hairy roots che si manifesta con una consistente quanto anomala emissione di radici avventizie (Fig. 19.28). Entrambi questi organismi possiedono un plasmide, di oltre 200 kb di lunghezza, con una caratteristica comune: in seguito ad infezione dell'ospite naturale, la regione corrispondente al T-DNA viene excisa, trasferita nella cellula vegetale ed integrata nel suo DNA cromosomico. In questa regione, di lunghezza compresa tra 12 e 24 kb, risiedono i geni responsabili della patogenesi. In natura i plasmidi Ti e Ri condividono altre importanti omologie, sia a livello cellulare che molecolare. La regione del plasmide corrispondente al T-DNA è delimitata da due sequenze di bordo di 25 pb, quasi identiche e ripetute in modo diretto, chiamate LB (left border) e RB (right border), che sono indispensabili per la sua excisione ed integrazione nel DNA della cellula ospite. Nel T-DNA sono inoltre contenuti i geni responsabili della sintesi di ormoni (auxine e citochinine) e di opine (octopina, nopalina, atropina, ecc.). In A. tumefaciens i geni per la biosintesi di auxine (iaaH e iaaM, noti anche come tms1 e tms2) sono associati a quello responsabile della biosintesi di citochinine (ipt, noto anche come tmr): una volta integrati nel nucleo della cellula vegetale, l'espressione di questi geni determina lo sbilanciamento ormonale che provoca una proliferazione cellulare anomala e lo sviluppo della neoplasia. In particolare, i geni iaaH e iaaM codificano, rispettivamente, una idrolasi e una monossigenasi coinvolte nella trasformazione del triptofano in acido indolacetico, mentre il gene ipt codifica una isopentenil-transferasi responsabile della addizione di AMP ad una catena isopentenile formando isopenteniladenosina. In A. rhizogenes i geni per la sintesi di auxine sono invece associati a diversi geni, tra cui quelli noti come rol (root loci) che sono coinvolti nella differenziazione accentuata di radici avventizie. I geni responsabili della sintesi di auxine e citochinine, e talvolta anche i rol, sono chiamati oncogeni. Le opine rappresentano composti prodotti dalle cellule tumorali per condensazione di un aminoacido con uno zucchero indispensabili per il metabolismo dell'agrobatterio: potendo utilizzare questi composti come fonti di carbonio, i patogeni traggono quindi vantaggio dalla interazione con la pianta ospite. Anche i geni per il catabolismo delle opine sono localizzati nel plasmide ma esternamente al T-DNA. Esternamente al T-DNA è inoltre presente la sequenza di origine della replicazione (ori), che permette al plasmide di mantenersi stabilmente nelle cellule batteriche in divisione, le sequenze preposte alle funzioni di coniugazione e la regione di 30 kb contenente i geni per la virulenza (vir). In particolare, le proteine codificate dai geni vir sono responsabili del riconoscimento della pianta ospite, del trasferimento e dell'integrazione del T-DNA nel DNA cromosomico della cellula ospite (Fig. 19.29).

Dopo che la cellula di agrobatterio ha infettato la pianta ospite e i geni per la virulenza sono stati indotti, probabilmente in risposta a determinate sostanze fenoliche

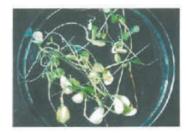


Fig. 19.28 – Dischi fogliari con accentuata emissione di radici avventizie (hairy roots) in seguito ad infezione con A. rhizogenes.

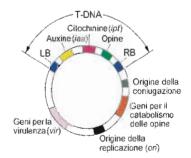


Fig. 19.29 – Rappresentazione schematica di un plasmide Ti con i principali elementi costitutivi.

prodotte dalla pianta stessa, come ad esempio acetosiringone, il T-DNA del plasmide viene trasferito nel DNA cromosomico della cellula ospite verosimilmente sotto forma lineare a singolo filamento: l'estremità 5' del T-DNA è delimitata dalla sequenza RB e l'estremità 3' da quella LB. Dopo l'excisione è avviata la sintesi del nuovo filamento di T-DNA in direzione 5' → 3'. L'integrazione del T-DNA nel genoma della cellula ospite dipende quindi dalla presenza delle sequenze terminali corrispondenti alle unità ripetute di 25 pb del RB e LB. I geni contenuti nel T-DNA di agrobatterio vengono attivati soltanto dopo che questo è stato integrato nel DNA cromosomico della cellula vegetale e sono i loro prodotti genici a provocare la malattia.

La scoperta della capacità di queste specie batteriche di trasferire parte del loro DNA plasmidico nel DNA genomico delle cellule vegetali infettate ha offerto nuove possibilità di manipolazione genetica delle piante: l'attitudine naturale dei plasmidi Ti ed Ri di trasformare geneticamente le piante poteva infatti essere sfruttata per inserire geni esogeni all'interno del loro T-DNA servendosi quindi dell'infezione con Agrobacterium per trasmettere ed integrare questi geni nel genoma di una cellula vegetale di una pianta suscettibile a questi patogeni. Affinché i plasmidi Ti di A. tumefaciens e Ri di A. rhizogenes potessero essere impiegati come vettori per il trasferimento di geni isolati da altri organismi e clonati in E. coli è stato tuttavia necessario apportare al loro T-DNA alcune importanti modifiche molecolari. In primo luogo, è stata necessaria la costruzione di plasmidi disarmati, cioè privati dei geni responsabili della biosintesi dei fitormoni. Questo passaggio è stato indispensabile per i plasmidi Ti, attraverso la rimozione dei geni capaci di indurre la formazione del cancro del colletto, poiché lo sbilanciamento ormonale determinato da questi geni impediva la rigenerazione delle piante a partire dalle cellule transgeniche della galla. Per i plasmidi Ri, invece, questo passaggio non è risultato indispensabile poiché era possibile la rigenerazione delle piante mediante caulogenesi dai tessuti transgenici con radici avventizie. Sono state poi rimosse anche le sequenze non necessarie al plasmide per svolgere la funzione di vettore, così come quella del gene che promuove la sintesi di una opina, in quanto ritenuta inutile per la pianta transgenica. Inoltre, è stato indispen-

Tab. 19.4 - Elenco di sistemi di geni marcatori selezionabili e di geni reporter usati per la trasformazione genetica delle piante.

Azione enzimatica	Gene marcatore selezionabile	Gene reporter	
Neomicina-fosfotransferasi (NPT II)	+	+	
Igromicina-fosfotransferasi (HPT)	+	+	
Diidrofolato-riduttasi (DIHR)	+	+	
Cloramfenicolo-acetiltransferasi (CAT)	+	+	
Gentamicina-acetiltransferasi (GAT)	+	+	
Fosfinotricina-acetiltransferasi (PAT)	+	+	
Streptomicina-fosfotransferasi (SPT)	+	+	
Nopalina-sintasi (NOS)		+	
Octopina-sintasi (OCS)		+	
Luciferasi di lucciola	-	+	
Luciferasi batterica		+	
β-Glucuronidasi	-	+	
β-Galattosidasi	-	+	
Resistenza alla bleomicina	+	Ψ.	
Treonina-deidratasi	+	+	
Blasticidina S-deamminasi	+	+	
enol-Piruvilshikimato-3-fosfato-sintasi	+	-	
Acetolattato-sintasi	+	9	
Bromossinile-nitrasi	+		

sabile l'inserimento di un gene marcatore selezionabile, in grado di conferire resistenza ad un antibiotico oppure ad un erbicida, al fine di riconoscere gli eventi di trasformazione genetica. In particolare, ancora molto utilizzato a tale scopo è il gene della neomicina fosfotransferasi (nptll) che conferisce resistenza alla kanamicina. Poiché tale gene è di origine procariotica è indispensabile porlo sotto il controllo di segnali di regolazione trascrizionale di origine vegetale (eucariotica) in modo da assicurare una sua espressione efficiente nelle cellule trasformate. Ovviamente, è stata inserita anche una regione con siti unici di restrizione (polylinker), per rendere possibile il clonaggio del gene esogeno all'interno del T-DNA. Infine, sono stati introdotti geni reporter, che conferiscono specifiche attività enzimatiche consentendo di individuare le cellule transgeniche con opportune tecniche di analisi. Molto diffuso è il gene GUS codificante per una β-glucuronidasi, normalmente assente nei vegetali, in grado di idrolizzare diversi substrati producendo sostanze fluorescenti rilevabili con luce ultravioletta (saggio fluorimetrico) oppure sostanze direttamente visibili di colore blu (saggio istochimico). In Tab. 19.4 è riportato un elenco di sistemi di geni marcatori selezionabili e di geni reporter usati per la trasformazione genetica delle piante.

L'impiego di vettori disarmati e ingegnerizzati per il trasferimento di geni nelle piante prevede che i plasmidi Ti ed Ri possano essere caricati dei geni da trasferire, clonati in *E. coli* ed inseriti in *Agrobacterium* mediante coniugazione.

Il trasferimento e l'integrazione del T-DNA nel sistema genetico della pianta richiede la presenza di diversi geni per la virulenza e la colonizzazione batterica ubicati

nel cromosoma dell'agrobatterio (chvA, chvB, chE, cel, exoC, att), delle sequenze RB e LB alle estremità della regione corrispondente al T-DNA e della regione vir del plasmide esternamente al T-DNA. La presenza dei geni vir può essere assicurata secondo due diverse strategie in quanto il trasferimento e l'integrazione del T-DNA e dei geni esogeni nella cellula vegetale può avvenire sia quando T-DNA e regione vir sono combinati in uno stesso plasmide (condizione cis) che quando sono clonati in due plasmidi distinti (condizione trans): nel primo caso i vettori sono detti cointegrati, mentre nel secondo caso sono detti binari.

Un vettore cointegrato è un plasmide di grosse dimensioni (oltre 100 kb) che contiene una parte del T-DNA (estremità LB) e la regione dei geni per la virulenza (vir). Il T-DNA è disarmato, in quanto non contiene i geni che producono il tumore, e solitamente include un gene reporter, come ad esempio quello della nopalina sintasi (NOS), insieme con un gene marcatore selezionabile che conferisce resistenza ad un antibiotico, come ad esempio l'ampicillina (amp<sup>R</sup>). Tale plasmide, che include l'origine della replicazione (ori) in Agrobacterium, presenta una sequenza di DNA omologa a quella di un altro plasmide disarmato intermedio. I transgeni vengono clonati in E. coli impiegando il vettore intermedio, plasmide di piccole dimensioni (circa 3 kb) ad elevato numero di copie, che non può mantenersi come unità autonoma in Agrobacterium. Infatti, tale plasmide include un'altra parte del T-DNA (estremità RB) e l'origine della replicazione (ori) di E. coli, oltre che un gene marcatore selezionabile

che conferisce resistenza ad un antibiotico, come ad esempio la kanamicina ( $kan^R$ ). In seguito ad un evento di ricombinazione omologa tra il vettore cointegrato e il vettore intermedio sono prodotti plasmidi che riproducono le estremità RB e LB del T-DNA e

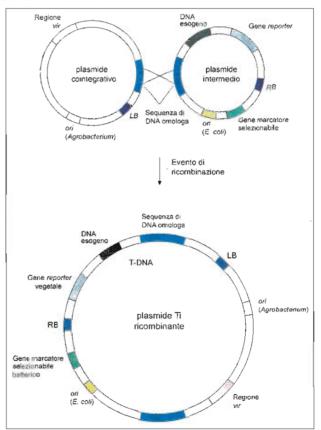


Fig. 19.30 – Vettore di clonaggio derivante dalla ricombinazione omologa di un vettore cointegrato con uno intermedio.

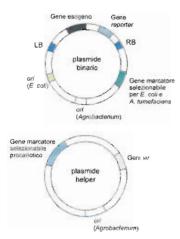


Fig. 19.31 – Rappresentazione schematica di un vettore binario e di un plasmide *helper* in agrobatterio.

che racchiudono nel T-DNA stesso un gene reporter vegetale, un gene marcatore selezionabile batterico e il DNA esogeno da trasferire (Fig. 19.30). In tale sistema, il vettore risultante dalla combinazione del plasmide cointegrato con il plasmide intermedio assicura la presenza dei geni *vir* che mobilizzano il T-DNA e della sequenza *ori* per il mantenimento in *Agrobacterium*. Soltanto in questa configurazione è possibile il trasferimento e l'integrazione del T-DNA e del DNA esogeno di cui è stato caricato nel DNA cromosomico della pianta. Uno dei geni reporter maggiormente impiegati è la neomicina fosfotransferasi (NPT II), che conferisce resistenza alla kanamicina. Data la sua origine procariotica, questo gene viene solitamente posto sotto il controllo trascrizionale di un forte promotore costitutivo, come il 35S derivato dal virus del mosaico del cavolfiore (CaMV), nonché del segnale di arresto trascrizionale e di poliadenilazione della nopalina-sintasi (NOS) di agrobatterio.

Un **vettore binario** contiene esternamente al T-DNA l'origine della replicazione (*ori*) sia di *E. coli* che di *Agrobacterium*, come un vero e proprio vettore navetta in grado di replicarsi in due diversi organismi, ma non include la regione *vir*. Il plasmide binario, di dimensione pari a circa 10 kb, viene modificato e clonato in *E. coli* prima di essere trasferito nel ceppo ricevente di *Agrobacterium* che include un plasmide difettivo, di oltre 100 kb, contenente l'insieme dei geni *vir*, ma privato della regione di T-DNA (**Fig. 19.31**). In tale sistema, il plasmide difettivo, detto anche *helper*, assicura quindi la sintesi delle proteine codificate dai geni *vir* che mobilizzano il T-DNA del plasmide binario dall'agrobatterio al DNA cromosomico della pianta.

#### 19.6.2 Metodi chimico-fisici di trasferimento genico

Benché i sistemi di trasferimento genico mediati da Agrobacterium siano risultati molto efficaci, non tutte le specie vegetali di interesse agrario possono essere trasformate con tali sistemi. Negli ultimi anni sono stati pertanto messi a punto diversi metodi chimico-fisici di trasferimento genico diretto sia in cellule integre (espianti e calli) che in cellule private della parete (protoplasti). I metodi chimico-fisici più importanti sono: i) l'elettroporazione, mediante l'impiego di impulsi di corrente elettrica che creano nella membrana plasmatica pori transitori attraverso i quali il DNA può penetrare all'interno del protoplasto; ii) la microiniezione, in questo caso la soluzione di DNA è iniettata con aghi sottilissimi direttamente nel nucleo di protoplasti o di cellule integre (di espianti, calli, embrioni somatici, ecc.) usando micromanipolatori; iii) il bombardamento, per mezzo di un acceleratore che consente di sparare nel nucleo di cellule intatte microparticelle di metallo rivestite di DNA plasmidico (metodo biolistico); iv) la fusione dei liposomi, in questo caso il DNA in soluzione viene incorporato in vescicole lipidiche che in condizioni opportune possono fondersi con la membrana plasmatica di cellule private della parete liberando il loro contenuto nel citoplasma. In tutti questi casi, la produzione di piante transgeniche prevede non solo l'integrazione stabile dei transgeni nel genoma della cellula vegetale, ma anche la rigenerazione delle piante complete da espianti, calli o protoplasmi (Fig. 19.32).

Il **metodo biolistico**, termine derivante dalla combinazione dei termini biologico e balistico, è certamente quello più usato in alternativa all'*Agrobacterium*, soprattutto per le monocotiledoni. Lo sviluppo di questo metodo risale al 1987 quando John C. Sanford e Theodore M. Klein della Cornell University (USA) misero a punto un pratico acceleratore di particelle per bombardare le cellule vegetali con proiettili microscopici ricoperti di DNA. Tale dispositivo, chiamato *particle gun*, funziona con elio compresso e consente di accelerare a velocità di circa 400–500 m/s microparticelle sferiche di oro o tungsteno del diametro di 0,5-1 µm rivestite di DNA plasmidico. A questo scopo, il DNA plasmidico in soluzione è innanzitutto precipitato sulla superficie delle microparticelle di metallo usando cloruro di calcio, spermidina o polietilene-

glicole. Successivamente, il bombardamento di cellule integre per mezzo di questo dispositivo fa sì che le microparticelle riescano a penetrare la parete e la membrana delle cellule di tessuti specifici trasferendo così il DNA esogeno all'interno del loro nucleo. Una volta inseritosi nel nucleo, il DNA esogeno è in grado di integrarsi nel DNA cromosomico della pianta. Tale metodo è stato messo a punto e applicato con successo nei cereali più importanti, come frumento, riso, orzo e mais. In queste specie, le piante transgeniche vengono solitamente ottenute mediante bombardamento con microparticelle di cellule embrionali in sospensione, di embrioni zigotici immaturi oppure di calli embriogenici. Il metodo biolistico è stato impiegato con successo anche nelle conifere, per le quali il trasferimento genico mediato dall'Agrobacterium non è possibile, ma di fatto ha un campo di applicazione illimitato poiché non presenta gli inconvenienti connessi alla manipolazione dei protoplasti (Fig. 19.32).

Recentemente il metodo biolistico è stato impiegato per inserire geni entro i cloroplasti, fornendo così nuove possibilità di trasformare il genoma plastidiale (plastoma). Le cellule delle foglie delle piante superiori contengono approssimativamente un centinaio di cloroplasti ognuno dei quali può includere decine di copie di molecole circolari di DNA, di dimensione compresa generalmente tra 120 kb (pissello) e 160 kb (pomodoro, tabacco). Il DNA esogeno

può essere inserito nelle cellule mediante bombardamento di tessuti fogliari utilizzando plasmidi aventi, oltre al transgene e al gene marcatore selezionabile, specifiche sequenze di DNA cloroplastico. La presenza di queste sequenze permette l'integrazione del DNA esogeno nel plastoma attraverso meccanismi di ricombinazione omologa (Fig. 19.33). I vantaggi della trasformazione del cloroplasto sono dovuti al modo con cui sono espressi, integrati ed ereditati. Infatti, è possibile avere livelli di espressione molto alti, in conseguenza del numero elevato di copie di cloroplasti per singola cellula, ed eliminare i problemi connessi alla diffusione dei transgeni, in quanto i cloroplasti sono ereditati quasi esclusivamente per via materna. Inoltre, la trasformazione del plastoma di solito non evidenzia effetti di posizionamento o di silenziamento genico, dal momento che il DNA esogeno è integrato in una specifica regione del DNA del cloroplasto attraverso un evento di ricombinazione omologa.

Il trasferimento genico può avvenire anche per assunzione diretta di DNA da parte della cellula, ponendo *in vitro* porzioni di tessuto o sospensioni di protoplasti in co-coltivazione con plasmidi in soluzioni addizionate di una sostanza chimica, quale il cloruro di magnesio, il fosfato di calcio, la poliornitina (POL) o il polietilene-glicole (PEG). I metodi di trasformazione basati sull'assunzione diretta non richiedono la mediazione da parte di altri organismi, ma evidenziano due limitazioni principali: una bassa efficienza di trasformazione e una elevata frequenza di riarrangiamenti nei plasmidi prima della loro inserzione nel genoma vegetale.

Al momento i metodi più usati per la produzione di piante transgeniche nelle dicotiledoni sono quelli basati sulla trasformazione mediata da vettore batterico

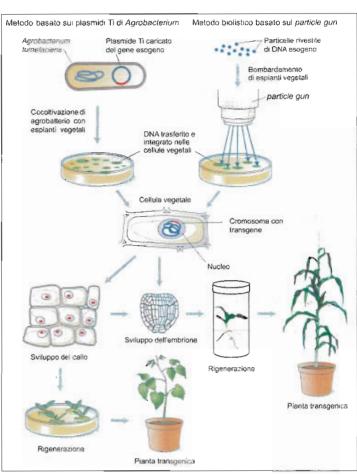
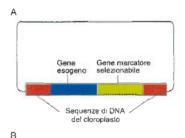
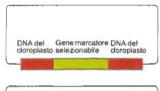


Fig. 19.32 – (A) Metodo di trasformazione genetica mediato dal plasmide Ti di *Agrobacterium tumefaciens;* (B) Metodo biolistico di trasformazione genetica basata sull'impiego del *particle gun* (Adattato da: C.S. Gasser e R.T. Fraley (1992) *Transgenic Crops,* Scientific American Inc.).





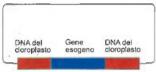


Fig. 19.33 – Vettori plasmidici impiegati per la trasformazione del genoma di cloroplasto: vettore contenente sia il gene esogeno che il gene marcatore selezionabile (A); vettori distinti contenenti il gene esogeno oppure il gene marcatore selezionabile (B). In entrambi i casi le sequenze geniche sono fiancheggiate da una regione di DNA del cloroplasto.

(plasmidi Ti e Ri di agrobatterio), mentre nelle monocotiledoni è quello basato sulla trasformazione diretta con bombardamento (metodo biolistico).

#### 19.6.3 Integrazione ed espressione dei transgeni

Molteplici sono i fattori che influenzano l'efficienza di trasformazione diretta o mediata da agrobatterio, intesa come rapporto tra numero di piante transgeniche ottenute e numero di espianti infettati o trattati. Per i metodi di trasformazione basati sull'agrobatterio, sia il riconoscimento dell'ospite che l'excisione del T-DNA dal plasmide e il suo trasferimento nella cellula vegetale dipendono dal ceppo di agrobatterio usato e dalle condizioni ambientali adottate per l'induzione della virulenza, mentre l'integrazione dei transgeni nel DNA cromosomico coinvolge il sistema enzimatico della cellula vegetale. Tra i metodi di trasformazione diretta, quello biolistico non evidenzia particolari limiti connessi al funzionamento del dispositivo usato per accelerare le microparticelle e si adatta ad un numero praticamente illimitato di specie.

Come metodo predittivo dell'efficienza di trasformazione può essere usata la frequenza di espressione transiente dei geni reporter, come ad esempio il GUS, osservabile a livello delle cellule dell'espianto vegetale nelle prime 3-4 settimane successive all'infezione con Agrobacterium o al trasferimento diretto con il particle gun. In seguito la frequenza di espressione del gene reporter decade fino a livello molto bassi e le cellule che conservano una espressione stabile di questo gene sono generalmente quelle che possono essere mantenute come callo per tempi indefiniti o che sono in grado di rigenerare una pianta transgenica. Poiché l'espressione transiente può anche costituire il risultato della trascrizione e della traduzione di costrutti non ancora integrati nei cromosomi della cellula ospite, l'attività dei geni reporter non può essere utilizzata come prova conclusiva dell'integrazione stabile dei transgeni. Dal momento che tutte le tecniche di attività GUS sono distruttive, recentemente è stato introdotto come reporter il gene codificante la cosiddetta proteina fluorescente verde o GFP (green fluorescent protein), derivante dalla medusa Aequorea victoria, grazie alla quale le cellule transgeniche possono essere individuate in modo conservativo in base alla fluorescenza caratteristica che emettono dopo esposizione alla luce ultravioletta (Fig. 19.34).

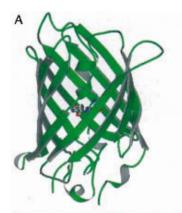
A livello dell'espianto o della cellula accettrice del transgene, l'efficienza di trasformazione genetica dipende dalla competenza ed, in particolare, dalle sue due componenti principali: la competenza alla integrazione (o transgenesi) e la competenza alla rigenerazione (o morfogenesi). Affinché possano essere ottenute piante trasformate è necessario infatti che vengano soddisfatte entrambe le condizioni: il transgene deve potersi integrare stabilmente nei cromosomi della cellula ospite la quale a sua volta deve essere totipotente in modo da poter rigenerare la pianta completa. I tessuti vegetali possono essere considerati come popolazioni di cellule aventi una diversa competenza, alcune di queste sono competenti sia alla integrazione che alla rigenerazione, altre completamente non competenti, altre ancora parzialmente competenti soltanto alla integrazione oppure soltanto alla rigenerazione (Fig. 19.35). In particolare, i tessuti impiegati negli esperimenti di trasformazione sono usualmente composti di un piccolissimo numero di cellule competenti sia per l'integrazione che per la rigenerazione. Inoltre, le cellule dei vari tessuti delle piante di solito reagiscono con risposte differenti agli stimoli cui vengono sottoposte. In base ai due stati di competenza si possono infatti trovare cellule competenti all'uno o all'altro fenomeno, cellule potenzialmente competenti qualora si utilizzi una tecnica di trasformazione opportuna o condizioni di coltura adeguate, e cellule non competenti in proporzioni variabili. Il rapporto tra cellule competenti e non competenti varia con il genotipo, il tipo di organo e lo stadio ontogenetico della pianta. Lo stimolo più efficace per l'induzione della competenza nelle cellule potenzialmente tali è il ferimento meccanico: in

questa circostanza le cellule bersaglio sono quelle adiacenti al tessuto danneggiato che per reazione alla ferita possono passare da uno stato differenziato ad uno indifferenziato, ed entrare in una fase di rapida divisione mitotica. Tale risposta è comunque diversa in relazione al tessuto, al genotipo e soprattutto alla specie. Nelle dicotiledoni la trasformazione genetica è usualmente mediata da agrobatterio in quanto è relativamente facile ottenere calli embriogenetici a partire da dischi fogliari, mentre nel caso dei cereali il bombardamento con microparticelle di embrioni zigotici immaturi è il metodo più diffuso in quanto consente di ovviare ai problemi connessi alla scarsa attitudine embriogenetica delle cellule indifferenziate.

Una volta che il DNA esogeno è stato introdotto all'interno delle cellule queste devono potersi sviluppare e differenziare *in vitro* fino a rigenerare piante complete. La capacità delle cellule di dividersi e degli espianti di accrescersi in un terreno di coltura selettivo (contenente antibiotici o erbicidi) fornisce la prima evidenza dell'acquisizione da parte delle cellule stesse del plasmide con il transgene e il gene marcatore selezionabile che conferisce resistenza allo specifico antibiotico o erbicida. Successivamente, sono necessarie indagini approfondite per stabilire se effettivamente il transgene è stato incorporato nei cromosomi delle plantule rigenerate dalle cellule trasformate. Molte ricerche sono state intraprese pertanto con l'intento di studiare gli eventi molecolari che caratterizzano l'integrazione e l'espressione del DNA esogeno. La localizzazione dei transgeni nei cromosomi della pianta trasformata e il tipo di espressione spaziale (tessuto) e temporale (stadio) di questi costituiscono quindi aspetti molto importanti.

I metodi di trasferimento genico diretto, a differenza di quelli mediati da agrobatteri, non hanno un sistema di controllo del numero di copie trasferite. In termini generali, quando le piante transgeniche vengono prodotte adottando sistemi di trasferimento diretto (particle gun), l'analisi di queste è molto più complessa poiché di solito il genoma può acquisire un numero multiplo di copie del gene esogeno e bisogna selezionare soltanto le linee trasformate che hanno incorporato una o comunque poche copie. Il ricorso all'incrocio controllato seguito dalla selezione non è molto usato per produrre le linee con un basso numero di transgeni perché richiede molto tempo, ma soprattutto perché spesso i transgeni risultano strettamente associati e quindi difficilmente separabili. Relativamente alle piante transgeniche prodotte con sistemi di trasferimento genico basati su Agrobacterium, il meccanismo di integrazione del DNA esogeno nel DNA cromosomico della cellula ospite non è stato pienamente compreso. Di solito il transgene è integrato ad un singolo locus, ma l'evento di inserzione nel DNA cromosomico può comportare riarrangiamenti della molecola di DNA esogeno. Indagini molecolari condotte mediante PCR e analisi Southern sono indispensabili per stabilire il tipo di integrazione intercorsa. Solitamente le piante transgeniche (T<sub>o</sub>) sono quindi autofecondate per studiare i modelli di segregazione nella generazione T (prima generazione filiale delle piante transgeniche originarie). Una segregazione fenotipica semplice di tipo 3:1 (1TT: 2Tt: 1tt) non può che indicare una inserzione ad un singolo sito e quindi uno stato eterozigote (Tt), così come può essere verificato mediante analisi PCR con primer specifici per il DNA esogeno (Fig. 19.36). In generale, il numero di copie integrate del transgene è comunque basso, compreso tra uno e cinque per cellula, e questo può essere verificato mediante analisi Southern del DNA genomico delle piante rigenerate con sonde specifiche per il DNA esogeno. Se l'integrazione è stabile, ogni transgene verrà trasmesso regolarmente ai gameti durante la meiosi e comparirà altrettanto regolarmente nelle piante ottenute nel corso delle varie generazioni di moltiplicazione. Tuttavia, non è raro osservare integrazioni anomale o instabili e modelli di segregazione complessi.

Determinante affinché le piante trasformate possano essere impiegate come materiale di partenza per la costituzione di varietà transgeniche è la conoscenza della capa-



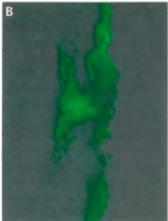


Fig. 19.34 – Proteina fluorescente verde o GFP (green fluorescent protein): modello tridimensionale della proteina (A) e localizzazione subcellulare della proteina (B).

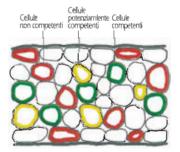


Fig. 19.35 – Sezione di tessuto fogliare con cellule competenti, non competenti e potenzialmente competenti alla rigenerazione e/o alla trasformazione.

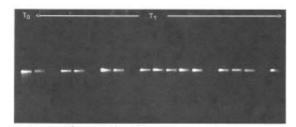


Fig. 19.36 - Segregazione 3:1 di un ipotetico marcatore PCR-derivato osservata nella discendenza T, ottenuta autofecondando una pianta To avente una singola copia del transgene.

cità di espressione in vivo del transgene. Infatti non sempre un transgene realmente e stabilmente integrato nel cromosoma dell'organismo ospite è in grado di esprimersi correttamente. Il fenomeno di parziale o totale inattivazione di un gene è chiamato silenziamento genico (gene silencing). Le cause che possono determinare questo fenomeno sono molteplici. Ad esempio, la presenza nello stesso nucleo di copie multiple di un transgene possono silenziare alcune o tutte le copie del gene esogeno e perfino quella di un eventuale

gene endogeno omologo al transgene. Inoltre, è stato dimostrato che in tutti i casi di silenziamento genico la perdita di espressione dei transgeni non è dovuta alla loro eliminazione fisica, ma alla loro inattivazione molecolare.

In che modo una sequenza di DNA è riconosciuta come estranea all'interno di una cellula? La capacità di distinguere un DNA esogeno da quello endogeno è in realtà una caratteristica molecolare più che cellulare, nel senso che avviene a livello di acidi nucleici. Le osservazioni condotte nei genomi delle piante geneticamente modificate hanno suggerito tre possibili modalità di riconoscimento: i) un sistema di riconoscimento dipendente dalla composizione di basi azotate della sequenza di DNA esogeno del costrutto differente rispetto a quella che caratterizza le sequenze endogene del DNA cromosomico della cellula; ii) un macchinario di esplorazione del genoma (genome scanning machinery) in grado di riconoscere le copie dei geni esogeni che formano nei cromosomi domini indipendenti dai geni endogeni; iii) un meccanismo di modificazione o di restrizione molecolare del DNA estraneo peculiare di ogni cellula.

I genomi delle piante sono formati di regioni isocore, cioè di lunghi tratti cromosomici in cui la composizione in basi azotate del DNA è caratterizzata da una forte omogeneità. In base al concetto di "spazio genico" è stato osservato che se un transgene ricco di GC è integrato in una regione cromosomica ricca di GC può essere trascritto normalmente, così come se un transgene ricco di AT è integrato in una regione cromosomica ricca di AT. Quando invece un transgene ricco di GC è integrato in una regione ricca di AT o viceversa, il transgene stesso può essere inattivato a causa della sua composizione nucleotidica particolarmente diversa rispetto a quella circostante del cromosoma. Dopo l'acquisizione e il riconoscimento del gene esogeno, la cellula è inoltre in grado di attivare alcuni meccanismi specifici prima che questo sia integrato nel suo genoma, come ad esempio la digestione per mezzo di nucleasi citoplasmatiche. Qualora l'integrazione cromosomica di un gene esogeno avvenga regolarmente, il suo silenziamento può essere parziale o totale e può avvenire a livello trascrizionale o traduzionale. I meccanismi conosciuti di silenziamento di un transgene sono i seguenti: i) metilazione; ii) co-soppressione; iii) effetto posizionale; iv) integrazione multipla. L'inattivazione di un transgene è spesso accompagnata da un aumento del livello di metilazione delle basi del DNA. Tale modificazione enzimatica avviene ad opera della metiltransferasi che catalizza l'addizione di gruppi CH, al carbonio in posizione 5 della citosina in corrispondenza della sequenza dinucleotidica simmetrica 5'-CG-3' (→ Cap. 5). La metilazione può comportare un silenziamento trascrizionale, quando interessa il promotore del transgene, oppure post-trascrizionale, quando invece interessa la regione codificante del transgene. L'inattivazione di un transgene integrato può anche dipendere dalla sua omologia con un gene endogeno. In particolare, l'espressione del transgene è suscettibile di riduzione o totale soppressione quando nel genoma è presente un gene endogeno strutturalmente simile. In questo caso il silenziamento è traduzionale poiché i trascritti dei geni omologhi possono interagire tra loro impedendo così la sintesi proteica. Tale fenomeno, chiamato co-soppressione in quanto solitamente determina assenza di espressione sia del transgene integrato che del gene endogeno omologo, è stato osservato per la prima volta in Petunia hybrida. Il 42% delle piante che avevano integrato nel loro genoma il gene codificante la calconesintasi (CHS), un enzima coinvolto nella biosintesi delle antocianine, risultarono a fiore bianco o variegato dimostrando così che il transgene era in grado di annullare l'espressione del gene endogeno responsabile della produzione di pigmenti di colore rosso-blu (Fig. 19.37). La co-soppressione è riconducibile ad eventi post-trascrizionali ed è quindi indipendente da modificazioni a carico del promotore. In molti casi l'inattivazione di un transgene dipende dalla posizione in cui questo viene integrato nel cromosoma oppure dal numero di copie integrate nel genoma. L'effetto posizionale del transgene può essere altrettanto efficace della co-soppressione nel silenziamento genico. Quando un gene esogeno si inserisce in regioni cromosomiche improprie, come ad esempio quelle ipermetilate, eterocromatiche, telomeriche o con una composizione nucleotidica differenziata, la sua inattivazione è una diretta conseguenza della posizione e dell'effetto esercitato dal tratto cromosomico circostante a quello di integrazione. Infine, l'integrazione di un numero eccessivo di copie costituisce un esempio ampiamente documentato di silenziamento

genico, soprattutto per transgeni localizzati sulla stessa regione cromosomica ed arrangiati in condizione *cis*. L'aumento del numero di copie di un dato gene esogeno è risultato correlato con una riduzione della sua espressione fino al suo completo silenziamento soprattutto quando interessa un particolare locus genomico. La natura multipla dell'integrazione può riguardare anche una parte del costrutto: effetti di soppressione genica sono stati osservati in seguito a duplicazioni del promotore o a inserzione di regioni codificanti incomplete.

Fig. 19.37 – Biosintesi delle antocianine (Fonte: B.R. Glick e J.J. Pasternak (1988) Molecular biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. American Society for Microbiology).

In conclusione, gli studi compiuti sui meccanismi molecolari di silenziamento dei transgeni hanno chiaramente indicato che le strategie migliori per avere una integrazione stabile ed una espressione regolare del transgene sono quelle basate sulla preparazione di costrutti con inserti semplici di DNA esogeno che non includano sequenze duplicate o elementi ripetuti con sequenze invertite. Inoltre, in tutte le specie che lo permettono è preferibile adottare i metodi di trasformazione genetica mediata da vettori agrobatterici in quanto generalmente consentono di trasferire gli inserti in singola copia (raramente in doppia copia).

## Quadro 19.3 – Trasformazione genetica in tabacco mediante agrobatterio con plasmidi disarmati

Il lavoro di Jeff Schell e Marc Van Montagu pubblicato nel 1984 sulla prestigiosa rivista Nature può essere considerato la pietra miliare della trasformazione genetica delle piante. I primi tentativi di ottenimento di piante transgeniche furono condotti ricorrendo ad un batterio del suolo come vettore, Agrobacterium tumefaciens. Questo agrobatterio è l'agente eziologico della malattia nota come "cancro del colletto" che si manifesta con la formazione di neoplasie sulla pianta infettata. Era noto che tale infezione poteva verificarsi nella grande maggioranza delle dicotiledoni, ma solo in pochissime monocotiledoni, e che dopo l'infezione una parte del plasmide poteva trasferirsi direttamente nel DNA cromosomico delle cellule della pianta ospite inducendo la malattia (Fig. 19.38). Per questo motivo il plasmide di agrobatterio fu chiamato plasmide Ti (Tumor inducing plasmid) e la parte di plasmide trasferita nel genoma della pianta denominata T-DNA (Transferred DNA). Benché l'infezione della pianta con l'agrobatterio potesse essere sfruttata per l'integrazione nel suo genoma di una parte del plasmide Ti, i geni ospitati nel T-DNA erano in grado di provocare l'insorgenza del cancro del colletto, rendendo così impossibile impiegare il plasmide come vettore di trasformazione in quanto la malattia interferiva con la normale crescita della pianta. Shell e Van Montagu intuirono che prima di utilizzare il plasmide Ti come vettore per trasformare le piante, eventualmente caricando la regione corrispondente al T-DNA dei geni da trasferire stabilmente nel genoma della pianta, occorreva identificare e rimuovere i geni responsabili della malattia. Partendo da cellule infettate con Agrobacterium avente i normali plasmidi Ti non era infatti possibile rigenerare in vitro le piante poiché la continua produzione di ormoni impediva la differenziazione delle cellule del callo. Così studiando gli mRNA trascritti dai T-DNA integri e da quelli modificati ricorrendo a tecniche di ingegneria genetica riuscirono a stabilire che i geni per la tumorogenesi erano normalmente contenuti nella regione del plasmide trasferita nel genoma della cellula ospite. Questa

scoperta permise di costruire vettori cosiddetti disarmati, cioè contenenti T-DNA privati dei geni induttori del cancro del colletto e reinseriti nel plasmide Ti mediante ricombinazione omologa. I plasmidi Ti disarmati di Agrobacterium mantenevano tuttavia le sequenze dei geni vir per la virulenza poiché ubicati fuori del T-DNA, così come le seguenze di 25 pb ripetute ai bordi del T-DNA: la sequenza LB (left border) e quella RB (right border). Queste due sequenze sono risultate tra loro simili ed entrambe necessarie per l'integrazione del T-DNA nel DNA cromosomico della cellula vegetale. Sulla scorta di tali acquisizioni, Shell e Van Montagu svilupparono un sistema che consentisse di clonare geni esogeni nella regione del T-DNA al fine di costruire plasmidi Ti ricombinanti utilizzabili per trasferire questi geni nel DNA cromosomico delle cellule infettate con Agrobacterium. La validità di questo sistema fu dimostrata attraverso la rigenerazione di piante transgeniche di tabacco (Nicotiana) normalmente fertili in grado di esprimere l'octopina-sintasi di Agrobacterium a partire da cellule infettate successivamente alla delezione dal T-DNA dei geni responsabili delle neoplasie. In seguito, tale tecnica permise ai due ricercatori di ottenere anche piante di tabacco resistenti ad antibiotici. Da allora i vettori di trasformazione basati sui plasmidi Ti di agrobatterio sono divenuti lo strumento più diffuso per la produzione di piante transgeniche in moltissimi laboratori di tutto il mondo.

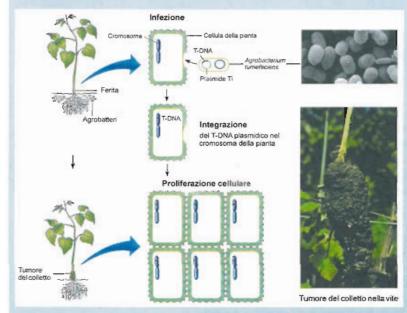


Fig. 19.38 – Schema semplificato del processo di infezione da parte di Agrobacterium tumefaciens e di integrazione del T-DNA nel cromosoma della pianta ospite. Immagine al microscopio elettronico di agrobatteri e particolare di tumore del colletto (crown gall) nella vite.

#### 19.6.4 Diffusione e classificazione delle piante transgeniche

La prima pianta transgenica di tabacco conteneva un gene batterico di resistenza a kanamicina e fu ottenuta nel 1983 presso i laboratori di Genetica dell'Università di Gent, Belgio (Quadro 19.3). L'agricoltura transgenica nacque, invece, nel 1991 in Cina con la coltivazione di piante geneticamente modificate di tabacco resistenti a virus. Nel 1994 vennero concesse le prime autorizzazioni negli Stati Uniti e in Europa riguardanti varietà transgeniche, rispettivamente, di pomodoro a marcescenza ritarda-

ta e di tabacco con tolleranza a diserbanti totali. Negli ultimi dieci anni l'agricoltura transgenica ha avuto una crescita esponenziale, diffondendosi rapidamente nei cinque continenti. Attualmente, a livello mondiale le colture trangeniche hanno superato abbondantemente i 70 milioni di ettari.

La costituzione di varietà transgeniche è infatti diventata ormai una pratica consolidata per molte specie vegetali di interesse agrario, come il mais, la soia, il colza, il cotone, il tabacco e il pomodoro. I caratteri che in anni recenti e in laboratori diversi sono stati trasferiti riguardano soprattutto la resistenza a erbicidi ed insetti, le caratteristiche qualitative delle produzioni e il controllo del sistema riproduttivo della pianta. Al momento la maggior parte delle produzioni transgeniche è concentrata negli Stati Uniti, seguiti da Argentina e Canada, Brasile, Cina, Australia e Sud Africa, mentre in Europa non è consentita né la commercializzazione né la coltivazione di varietà transgeniche (Fig. 19.39). Attualmente quasi la metà della produzione mondiale di soia (46%) è fornita da varietà transgeniche, mentre per altre specie, come cotone (20%), colza (11%) e mais (7%), la percentuale è nettamente inferiore ma tutt'altro che trascurabile. Negli ultimi anni sono state introdotte in coltivazione anche varietà trasgeniche di molte altre specie, come barbabietola, lino, pomodoro, patata, riso, erba medica, radicchio e zucchino.

Convenzionalmente possono distinguersi tre tipi di piante geneticamente modificate (PGM):

- PGM di I generazione: piante transgeniche costituite per incrementare la produttività, migliorando le difese contro patogeni e avversità ambientali, per ridurre i costi e per facilitare le pratiche agronomiche;
- ii) PGM di II generazione: piante transgeniche costituite per migliorare la qualità dei prodotti finali;
- iii) PGM di III generazione: piante transgeniche costituite per ottenere prodotti con nuove proprietà, come vaccini, componenti del sangue, vitamine, ormoni e enzimi terapeutici di origine umana o animale, cosmetici e bioplastiche.

La tolleranza agli erbicidi totali (glifosate o glufosinato-ammonio) e la resistenza agli insetti (principalmente, lepidotteri), rappresentano i principali caratteri trasferiti nella quasi totalità delle attuali varietà transgeniche di soia, mais, colza e cotone, mentre la tolleranza ad alcuni virus è stata introdotta in varietà di patata e bietola, così come la ritardata marcescenza è stata trasferita in pomodoro e la sterilità maschile è stata sfruttata soprattutto per la produzione di varietà ibride di colza (**Tab. 19.5**). Le varietà transgeniche hanno avuto un notevole impatto sull'agricoltura di molti Paesi: la coltivazione di mais e cotone Bt, ad esempio, ha determinato forti riduzioni del numero di trattamenti richiesti e quindi del consumo di insetticidi, mentre la soia Round-up Ready ha comportato una maggiore flessibilità delle pratiche di diserbo e la riduzione del consumo di altri prodotti diserbanti aventi impatto ambientale molto più elevato. Per alcune specie di interesse agrario sono state, inoltre, costituite varietà transgeniche tolleranti alle avversità ambientali, come le basse temperature in patata o barbabietola e la carenza idrica in girasole.

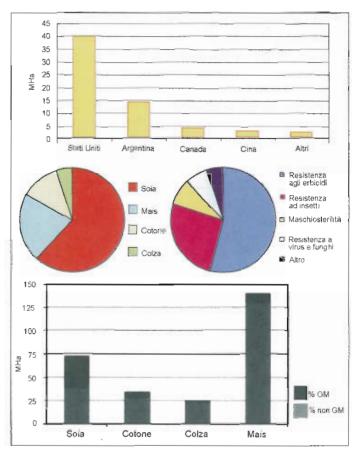


Fig. 19.39 – Statistiche relative alle piante geneticamente modificate.

Tab. 19.5 – Lista delle principali PGM di I generazione autorizzate all'immissione sul mercato nei Paesi extra UE.

Specie	Transgeni	Caratteri principali	
Mais	Cry 1A(b) EPSPS <i>pat</i> Barnase	Resistenza a lepidotteri Tolleranza a glifosate Tolleranza a glufosinato-ammonio Maschiosterilità	
Pomodoro	PG antisenso ACC-sintasi	Ritardata marcescenza Ritardata maturazione	
Soia	EPSPS Δ 1,2 desaturasi	Tolleranza a glifosate Aumento di acido oleico	
Patata	Cry 3A CP	Resistenza a coleotteri Resistenza a virus PVY	
Cotone	Nitrilasi EPSPS Acetolattato-sintasi	Tolleranza a bromossinile Tolleranza a glifosate Tolleranza sulfonilurea	
Colza	ACP tioesterasi EPSPS, Gox par Barnase Nitrilasi 3-fitasi	Incremento in acido laurico Tolleranza a glifosate Tolleranza a glufosinato-ammonio Maschiosterilità Tolleranza a bromossinile Degradazione dei fitati	
Bietola	EPSPS pal CP	Tolleranza a glifosate Tolleranza a glufosinato-ammonio Resistenza a WMV2, CMV e ZYMV	
ino	Acetolattato-sintasi	Tolleranza a sulfonilurea	
/lelone	Sam-K	Ritardata maturazione	
Radicchio	Barnase	Maschiosterilità	

La ricerca e la sperimentazione nel settore transgenico è in continua evoluzione: dal 1987 ad oggi, soltanto negli USA sono state portate a termine quasi 8.000 sperimentazioni in piano campo di varietà geneticamente modificate! Poco meno del 50% di queste sperimentazioni ha riguardato la resistenza a insetti o a patogeni batterici, virali e fungini, il 15% circa la tolleranza a erbicidi e oltre il 30% le qualità nutrizionali o le proprietà farmaceutiche dei prodotti. Negli ultimi anni si è assistito infatti ad una evoluzione della ricerca che ha portato alla produzione di piante geneticamente modificate di seconda generazione, cioè varietà transgeniche migliorate per la composizione del prodotto finale. Le caratteristiche qualitative modificate comprendono la composizione dell'amido o dell'olio, la produzione di zuccheri e di particolari proteine o amminoacidi, la colorazione dei fiori e numerosi altri caratteri (Tab. 19.6).

L'aspetto maggiormente innovativo è tuttavia quello che prevede la sperimentazione con piante transgeniche di terza generazione destinate all'industria farmaceutica, veterinaria o cosmetica. In questo senso le piante cominciano ad essere viste sempre più come bioreattori, cioè come organismi utilizzabili per realizzare reazioni biologiche finalizzate alla sintesi di prodotti specifici. Molti esperimenti hanno dimostrato la capacità delle piante di assemblare proteine derivanti da differenti organismi tra le quali alcune di interesse terapeutico, come vaccini, anticorpi e autoantigeni. Attualmente, sono in fase di sperimentazione agronomica e clinica varietà transgeniche di banana che producono antigeni virali o batterici allo scopo di ottenere vaccini edibili a basso costo per la lotta contro il colera, l'epatite o la dissenteria nei Paesi più poveri delle aree tropicali e subtropicali. È in fase di sperimentazione anche una varietà transgenica di erba medica che produce  $\beta$ -difensina, una proteina con ampio spettro di attività contro batteri e funghi, che dopo essere stata attivata nello stomaco degli animali monogastrici fornisce una difesa naturale contro tali microrganismi patogeni. L'uso di piante per la produzione commerciale di prodotti terapeutici, principalmente

Carattere modificato	Specie	
Composizione dell'amido	patata, pisello, frumento, mais	
Composizione degli zuccheri	bietola, cicoria	
Composizione dell'olio	colza, girasole	
Sintesi dei fruttani	patata, bietola	
Sintesi dello xilosio	tabacco	
Sintesi del glicogene	patata	
Sintesi della lignina	pioppo, betulla, festuca, tabacco	
Sintesi di proteine a amminoacidi	colza, patata, mais	
Contenuto in fitati	colza, orzo, mais	
Contenuto di nitrati e nitriti	lattuga, tabacco	
Contenuto di β-carotene (provit. A)	riso	
Qualità tecnologica*	frumento, patata, pomodoro, orzo	
Digeribilità del foraggio	erba medica, mais	
Impiego dell'etanolo	patata	
Colore e morfologia fiorale	petunia, viola, crisantemo, limonium	

Tab. 19.6 – Lista delle principali PGM di II generazione oggetto di sperimentazione in pieno campo.

ormoni ed enzimi umani e componenti del sangue, è un settore emergente dell'industria biotecnologica noto come *molecular farming* che promette di avere notevole ricadute applicative in un futuro prossimo.

#### 19.6.5 Applicazioni delle varietà transgeniche

Si è ormai nella fase iniziale di una rivoluzione metodologica del miglioramento delle piante per la costituzione di nuove varietà. Durante l'ultimo secolo, l'uomo ha raggiunto una raffinata capacità di costituire varietà superiori di piante agrarie, dotate di caratteristiche ereditarie miglioratrici delle funzioni e delle produzioni, incrociando e selezionando secondo metodi sperimentali basati su conoscenze scientifiche dei processi naturali. In anni recenti, i metodi di miglioramento genetico si sono sviluppati ulteriormente fino ad integrare tecniche di ingegneria genetica molecolare. I metodi molecolari e i metodi convenzionali di miglioramento genetico hanno gli stessi obiettivi di modificazione genetica, ma si differenziano nel modo e nel tipo di lavoro. Per produrre nuove vantaggiose associazioni di fattori genetici, invece di dipendere dalla ricombinazione casuale tra un largo numero di geni, il metodo molecolare consente di inserire nel genoma specifici geni, ciascuno responsabile del controllo di un determinato carattere. Così facendo i tempi della selezione si riducono, il processo è quanto mai preciso, permette di conservare le caratteristiche vantaggiose del genotipo originario e di dotarlo di uno o pochi geni necessari per migliorare le caratteristiche di cui era carente. Rispetto a quello convenzionale, il metodo molecolare consente inoltre lo scambio di geni tra organismi sessualmente incompatibili, aumentando così drasticamente le possibilità di modificare in modo preciso e minimale il genoma. I geni usati per migliorare le piante coltivate secondo procedure biotecnologiche avanzate possono infatti derivare da batteri, da animali o da altre di piante. Inoltre, possono essere modificati attraverso tecniche di ingegneria genetica affinché codifichino per una proteina attiva in un particolare tessuto o momento dello sviluppo.

La costituzione di varietà transgeniche ha permesso di ampliare il grado di espressione di molti caratteri agronomicamente importanti, connessi non soltanto alla produttività delle colture, ma anche alla qualità del prodotto. Nel decennio successivo alla messa punto delle tecniche di trasformazione genetica, a livello mondiale sono stati autorizzati oltre 3.600 rilasci nell'ambiente di piante geneticamente modificate, prevalentemente per caratteri di resistenza ad erbicidi, insetti, virus, batteri e funghi.

## 19.6.5.1 Miglioramento delle caratteristiche nutrizionali

Il miglioramento delle qualità nutrizionali delle produzioni ha riguardato prevalentemente la composizione in amminoacidi, lipidi e vitamine dei semi. I semi rappresentano la più importante risorsa alimentare poiché contengono proteine, lipidi e carboidrati, sono facilmente trasportabili e possono essere conservati senza che subiscano cambiamenti sostanziali delle loro proprietà nutrizionali. Gli esseri umani così come gli animali non sono in grado di sintetizzare dieci dei 20 aminoacidi essenziali che quindi devono assumere attraverso la dieta.

La composizione amminoacidica delle proteine di riserva dei semi è estremamente variabile in relazione alla specie e non esiste alcuna specie coltivata i cui semi

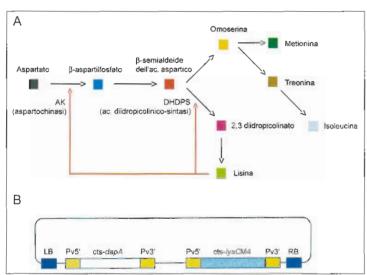


Fig. 19.40 - (A) Percorso biosintetico semplificato degli amminoacidi derivanti dall'acido aspartico (la retroinibizione o inibizione a feedback è evidenziata in rosso); (B) Vettore plasmidico usato per la trasformazione di soia e colza allo scopo di modificare il tenore di lisina nei semi (B) (Pv5' e Pv3': promotore e terminatore del gene della B-faseolina di fagiolo: cts: regione codificante il peptide di transito del cloroplasto; dapA: gene di Corynebacterium codificante una acido diidropicolinico-sintasi (DHDPS) insensibile alla lisina; lysCM4: membro mutante di un gene di E. coli codificante una aspartato-chinasi (AK) insensibile alla lisina.

abbiano una proporzione ottimale dei diversi amminoacidi. Le fonti principali di proteine per una larga parte della popolazione mondiale sono rappresentate dai semi di cereali e da quelli di leguminose. Tuttavia, uno dei maggiori limiti nutrizionali di questi semi è la carenza di lisina nei cereali e di cisteina e metionina nelle leguminose. Una delle possibili soluzioni a questo problema può essere il consumo bilanciato di entrambi i tipi di semi o dei loro derivati, benché molto spesso tradizioni culturali e fattori ambientali ed economici impediscano la fattibilità di questo naturale compromesso. Una soluzione alternativa è offerta quindi dalla trasformazione genetica finalizzata a modificare la composizione delle proteine di riserva dei semi di specie agronomicamente importanti deregolando il percorso biosintetico di questi amminoacidi essenziali. Ad esempio, risultati molto

interessanti sono stati ottenuti in colza (Brassica napus var. oleifera), dove il contenuto di metionina nei semi è stato aumentato considerevolmente (fino al 33%) mediante il trasferimento di un gene di mais codificante per una proteina ricca in metionina, così come in lupino azzurro (Lupinus angustifolium), dove invece il contenuto di questo amminoacido è stato raddoppiato sfruttando l'espressione di un gene di girasole codificante per una albumina. Anche in mais (Zea mays) e soia (Glycine max) è stato possibile ottenere piante geneticamente modificate per un gene sintetico codificante per una proteina con il 31% di lisina e il 22% di metionina. Un incremento consistente di lisina libera nei semi, fino ad un livello di oltre 100 volte superiore rispetto a quello di partenza, è stato infine ottenuto sia in soia che in colza modificando due geni che presiedono alla produzione di altrettanti enzimi coinvolti nella sintesi di questo amminoacido essenziale. Tali geni, codificanti per l'aspartato-chinasi (AK) e la diidrodipicolinico-sintasi (DHDPS), clonati rispettivamente in E. coli e Corynebacterium, posti sotto il controllo di un promotore specifico del seme ed introdotti nelle piante per mezzo di un vettore binario (Fig. 19.40), hanno consentito infatti un aumento del tenore totale in lisina di due volte nel colza e di cinque volte nella soia. Recentemente, la trasformazione genetica della patata (Solanum tuberosum) con un gene isolato in Amaranthus e codificante per una proteina non allergenica, l'albumina AmA1, avente una composizione aminoacidica bilanciata, promette di avere ricadute rilevanti sul miglioramento del valore nutritivo dei tuberi di questa specie.

Per quanto concerne i lipidi, quelli di origine vegetale hanno qualità nutrizionali ritenute migliori di quelle dei grassi di origine animale poiché non contengono colesterolo e sono ricchi in acidi grassi polinsaturi. Oltre il 75% della produzione

mondiale di oli vegetali è fornita da soia, palma, colza e girasole, mentre gli acidi grassi più rappresentati sono il palmitico, lo stearico, l'oleico, il linoleico e il linolenico. La tecnologia del DNA ricombinante è stata particolarmente efficace nel modificare i lipidi vegetali, non tanto in termini quantitativi, quanto piuttosto per il grado di insaturazione, espresso come numero di legami C=C. Semi di colza transgenica per un antisenso della stearoil-ACP desaturasi di Brassica hanno mostrato un incremento di acido stearico dal due al 40%: tale modificazione inibisce l'espressione del gene normale e porta all'accumulo dell'acido stearico anziché alla sua degradazione ad acido oleico. Sempre nei semi di colza è stato aumentato fino al 58% il contenuto di acido laurico, così come della frazione di trigliceridi a catena media, attraverso l'espressione di una acil-ACP tioesterasi di Cuphea hookeriana. Analogamente, in soia sono stati modificati i contenuti di diversi acidi grassi come, ad asempio, acido stearico e

acido oleico portati, rispettivamente, dal 4% al 30% e dal 28% all'86%, usando stearoil-ACP e oleocil-ACP desaturasi di *Glycine*. Dato che un aspetto molto importante caratterizzante la qualità degli oli vegetali è il rapporto tra gli acidi grassi saturi e quelli polinsaturi, recentemente sono stati condotti molti esperimenti di trasformazione genetica nel tentativo di modificare la loro composizione.

La deficienza di vitamine nella dieta costituisce uno dei maggiori problemi nutrizionali dei Paesi in via di sviluppo. Benché le piante siano una grande fonte di vitamine, non tutte producono quelle necessarie all'uomo. Il riso, ad esempio, che rappresenta l'alimento principale nel sud-est asiatico, è carente di vitamina A provocando malattie associate a malnutrizione, tra le quali la cecità. Sfruttando il metodo di trasformazione mediato da *Agrobacterium*, ricercatori tedeschi e svizzeri hanno recentemente introdotto tre geni provenienti da un'altra pianta, la giunchiglia (*Narcissus pseudonarcissus*) e da un batterio (*Erwinia uredovora*) codificanti per tre enzimi assenti in riso, coinvolti nella biosintesi di  $\beta$ -carotene (pro-vitamina A) e capaci di esprimersi specificatamente nell'endosperma dei semi di riso transgenico (**Fig. 19.41**). Questi geni, *psy*, *crtl* e *icy*, promuovono la sintesi, rispettivamente, di fitoene-sintasi, fitoene-denaturasi e  $\beta$ -ciclasi, enzimi che trasformano il geranil-geranil-difosfato in  $\beta$ -carotene, che è poi convertito nel nostro organismo in vitamina A. A causa dell'accumulo di  $\beta$ -carotene nell'endosperma, le cariossidi di questo riso transgenico presentano un colore giallo-arancione, da cui il nome *Golden Rice* (**Fig. 19.42**).

Anche il tipo ed il contenuto di polisaccaridi possono essere modificati ricorrendo alle tecniche di ingegneria genetica. In particolare, amidi con rapporti variabili di amilosio e amilopectina sono stati prodotti attraverso la parziale eliminazione di un trascritto specifico utilizzando il suo antisenso. Un gene che codifica per la glucosio-pirofosforilasi batterica ha, invece, permesso di aumentare la concentrazione di amido nel tubero di patata. In questa specie, è stato anche dimostrato che bloccando l'attività di questo enzima si induce l'accumulo di saccarosio, fino al 30% della sostanza secca, mentre esprimendo un gene batterico per la fruttosio-transferasi si promuove l'accumulo di fruttosio.

Sempre nell'ambito della qualità delle produzioni, uno dei problemi connessi al commercio dei molti frutti è quello riguardante la rapidità con cui vanno incontro alle modificazioni causate dalla senescenza naturale. Alcuni dei geni espressi durante la maturazione, responsabili dell'ammorbidimento dei frutti, codificano gli enzimi cellulasi e poligalatturonasi coinvolti nella degradazione della parete cellulare. Intervenendo su questi geni, mediante la produzione di piante transgeniche in grado di

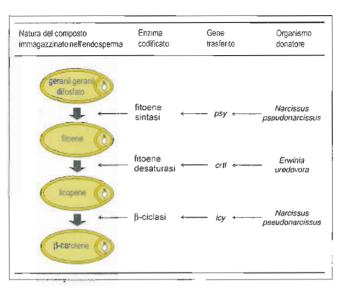


Fig. 19.41 – Produzione di β-carotene nel riso transgenico.

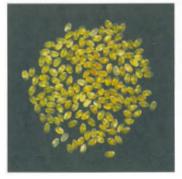


Fig. 19.42 – Chicchi dì "riso dorato", Golden rice.

produrre i rispettivi RNA antisenso, è stata costituita una varietà di pomodoro a lunga conservazione dopo la raccolta, in grado di mantenere a lungo non solo la consistenza ma anche il sapore e per questo chiamata Flavr Savr. Tale proprietà dipende dalla inibizione della senescenza conseguente ad un abbassamento della sintesi dell'enzima poligalatturonasi (PG). Analogamente, la maturazione e la senescenza dei frutti può essere regolata modificando altri geni coinvolti in questi processi ed, in modo particolare, quelli codificanti gli enzimi necessari per la biosintesi dell'etilene. Tale regolatore di crescita viene sintetizzato a partire dalla S-adenosilmetionina attraverso un composto intermedio, l'acido 1-ammino-ciclopropano-1-carbossilico (ACC). La manipolazione genetica della via biosintetica dell'etilene consente di ritardare sia la maturazione che la senescenza quando determina l'inibizione della formazione di questo ormone. Poiché l'enzima ACC-ossidasi catalizza l'ultimo passaggio della sintesi di etilene, riducendo per via biotecnologica il livello di produzione di questo ormone può ottenersi una durata significativamente più lunga dei frutti. Piante transgeniche di pomodoro e di melone con livelli di etilene molto più bassi di quelli ordinari sono state quindi prodotte ricorrendo alla strategia dei geni antisenso dell'ACC-ossidasi. Un'altra strategia usata è quella che prevede la produzione di piante transgeniche per geni, isolati in batteri del suolo, codificanti l'enzima ACC-deamminasi capace di degradare il precursore finale dell'etilene. In ogni caso, l'obiettivo è quello di rallentare la maturazione dei frutti e agevolare così il loro stoccaggio e trasporto. Tale modificazione è considerata potenzialmente molto utile per i frutti delle specie tropicali.

## 19.6.5.2 Resistenze agli erbicidi

Il miglioramento della produttività può essere conseguito attraverso il trasferimento di geni che conferiscono resistenza o tolleranza ad erbicidi e ad agenti biotici. Le ragioni che hanno portato allo sviluppo di piante resistenti agli erbicidi sono molteplici, in primo luogo la facilità del sistema di controllo delle erbe infestanti basato sull'uso di molecole a largo spettro, biodegradabili e con bassa tossicità verso gli animali, che consente di eliminare gli inconvenienti dovuti alla loro bassa selettività dotando la pianta dei geni di resistenza. I meccanismi molecolari che possono essere sfruttati a tale scopo sono: i) il ridotto assorbimento della molecola da parte della pianta; ii) l'aumento nella pianta della sintesi del metabolita bersaglio sensibile all'erbicida; iii) la modifica del metabolita bersaglio per ridurre la sua affinità con l'erbicida; iv) la degradazione della molecola erbicida nella pianta.

Il glifosate è un erbicida che inibisce la biosintesi degli aminoacidi aromatici bloccando l'attività dell'enzima 5-enol-piruvil-scichimato-3-fosfato-sintasi (EPSPS). Tale erbicida non selettivo, che agisce come sistemico dopo essere stato assorbito dalle parti verdi della pianta, consente di intervenire molto efficacemente nel controllo della flora infestante, con dosi molto ridotte di principio attivo, ed è considerato tra i migliori sotto l'aspetto tossicologico e dell'impatto ambientale. Due geni distinti, AroA isolato in Salmonella typhimurium e CP4 isolato in Agrobacterium, codificanti entrambi un enzima EPSPS insensibile al glifosate, sono stati ingegnerizzati affinché il loro prodotto genico venisse trasferito nel cloroplasto. L'espressione di questi geni ha così permesso di produrre varietà transgeniche di tabacco, pomodoro, soia, colza, cotone e barbabietola tolleranti al glifosate (alcune note come Round-up Ready, dal nome di uno dei suoi formulati commerciali più diffusi). Un altro gene che conferisce resistenza al glifosate è stato isolato da Achromabacter: tale gene, codificante per una glifosate-ossidoriduttasi (GOX), presiede alla degradazione dell'erbicida ad acido amminoetilfosfonico, un prodotto non tossico per la pianta. Una modalità di azione analoga è stata sfruttata anche in tabacco, cotone e soia per l'ottenimento di varietà transgeniche tolleranti agli erbicidi basati sugli oxinili e sugli acidi fenossicarbossilici.

Tab. 19.7 – Alcuni esempi di erbicidi con diversa modalità di azione e di enzimi codificati da geni clonati per lo più nei procarioti ed impiegati
per produrre piante transgeniche resistenti agli erbicidi.

Erbicida	Prodotto genico (gene)	Organismo	Modalità di azione	
Triazine	Proteina di legame (psbA)	Amaranthus	Alterazione del bersaglio dell'erbicida	
Sulfoniluree, imidazolinoni	Acetolattato-sintasi (ALS)		Alterazione dell'enzima che risulta resistente all'erbicida	
Arilossifenossipropanoati, cicloesandioni	AcetilCoA-carbossilasi	3	Alterazione dell'enzima che risulta insensibile all'erbicida	
Glifosate	EPS-fosfato-sintasi (AroA)	Salmonella typhimurium	Iperproduzione dell'enzima bersaglio dell'erbicida	
	EPS-fosfato-sintasi (CP4)	Agrobacterium	Iperproduzione dell'enzima bersaglio dell'erbicida	
	Ossidoriduttasi (GOX)	Achromabacter	Degradazione dell'erbicida	
Bromossinile	Nitrilasi (oxy)	Kielsiella ozaneae	Degradazione dell'erbicida	
Acidi fenossicarbossilici (2,4-D, 2,4,5-T)	Biossigenasi (tfdA)	Alcaligenes	Degradazione dell'erbicida	
Cianammide	Cianammide-idratasi	Myrothecium verrucaria	Trasformazione dell'erbicida in urea	
Glufosinato (fosfinotricina, PPT)	PPT-acetiltransferasi (bar, pat)	Streptomyces	Detossificazione dell'erbicida	
Dalapon	Dealogenasi	Pseudomonas putida	Detossificazione dell'erbicida	

Ad esempio, il principio attivo dell'erbicida bromossinile è degradato ad acido benzoico da una nitrilasi: il gene *oxy* codificante per tale enzima è stato clonato dal batterio *Klelsiella ozaneae*. Piante di tabacco resistenti alla cianammide sono state prodotte mediante il trasferimento del gene *tfdA*, isolato dal fungo *Myrothecium verrucaria*, codificante per una idratasi che trasforma il principio attivo dell'erbicida in urea.

Il principio attivo di altri erbicidi è rappresentato dalla fosfinotricina (PPT), molecola in grado di inibire la sintesi di glutammina bloccando l'attività dell'enzima glutammina-sintasi (GS). I geni bar e pat isolati, rispettivamente da Streptomyces hygroscopicus e S. viridochromogenes, controllano la sintesi di un enzima detossificante, la fosfinotricina acetil-transferasi, in grado di inattivare gli erbicidi PPT-derivati, come il glufosinato. Entrambi i geni hanno dimostrato di proteggere efficacemente il mais, la soia, la canna da zucchero, il tabacco, il riso, il cotone, il colza, la barbabietola e l'erba medica dall'azione di questo erbicida.

La resistenza alle sulfoniluree e agli imidazolinoni, erbicidi che agiscono come inibitori dell'enzima acetolattato-sintasi (ALS) coinvolto nella sintesi degli amminoacidi valina, isoleucina e leucina, è stata introdotta in colza, cotone, barbabietola, soia, lino, riso e pioppo impiegando geni codificanti versioni resistenti dell'enzima ALS. Inoltre, linee di mais resistenti a questi erbicidi sono state selezionate mediante colture in vitro.

Un elenco di molecole erbicide con diversa modalità di azione e di proteine enzimatiche codificate da geni clonati per lo più nei procarioti ed impiegati per l'ottenimento di piante transgeniche resistenti ad erbicidi di classi diverse è riportato in **Tab. 19.7**.

#### 19.6.5.3 Resistenze a stress biotici (patogeni)

Lo sviluppo di piante resistenti a patogeni di diversa natura è un altro dei principali settori di applicazione dei metodi di trasformazione genetica finalizzati alla costituzione di varietà transgeniche. In particolare, le perdite di raccolto provocate dagli insetti costituiscono da sempre uno dei problemi più importanti delle colture agrarie. La produzione di piante transgeniche resistenti o tolleranti agli insetti è stata basata sulla conoscenza che anche le proteine possono avere proprietà insetticide ed ha avuto un grosso impatto sia per l'industria sementiera che per quella agrochimica. La strategia più utilizzata è quella che prevede l'acquisizione da parte delle piante della capacità di sintetizzare proteine tossiche per determinati insetti dannosi in grado di proteg-

gerle dai loro attacchi, aumentando la selettività del controllo. Fondamentale è risultato lo sfruttamento dei geni di varie sottospecie di Bacillus thuringiensis (Bt), un microrganismo del suolo in grado di produrre particolari proteine, chiamate δendotossine, durante la sporulazione: tali endotossine sono nocive nei confronti delle larve di un certo numero di insetti, ma sono prive di effetto sui vertebrati. Per più di 30 anni sono stati prodotti, commercializzati ed impiegati insetticidi a partire da questi bacilli, fino a quando i biologi molecolari hanno pensato di sfruttare questo sistema naturale clonando e trasferendo nelle piante il gene codificante per la corrispondente endotossina insetticida. Le proteine Bt possono in realtà essere codificate da geni diversi e differiscono tra loro relativamente allo spettro di attività insetticida, essendo alcune in grado di controllare i lepidotteri, altre i ditteri ed altre ancora i coleotteri. Fino ad oggi sono stati clonati almeno 130 geni Bt da diversi ceppi di B. thuringiensis. Quando uno dei geni che presiedono alla sintesi di specifiche δ-endotossine è trasferito nelle piante e correttamente espresso, rende le piante stesse resistenti a particolari ordini di insetti poiché le proteine ingerite esercitano la loro tossicità a carico delle cellule epiteliali dell'intestino medio delle larve, dissolvendole per mezzo di una lisi osmotica. I geni codificanti le proteine insetticide sono stati modificati mediante interventi di ingegneria genetica e negli esperimenti di trasformazione genetica sono state impiegate le versioni troncate di questi geni aventi anche codoni parzialmente modificati. Tali interventi di ingegneria genetica si resero necessari una volta accertato che il gene completo crylA di B. thuringiensis subsp. kurstaki non era in grado di esprimersi nelle piante a livelli soddisfacenti. Un incremento significativo della quantità di endotossina prodotta nelle piante fu raggiunto riducendo il gene alla sequenza minima funzionale, eliminando una porzione consistente verso l'estremità 3' e lasciando quella codificante per la sola parte N-terminale della proteina insetticida. Il confronto delle sequenze aminoacidiche di  $\delta$ -endotossine di diversi ceppi di B. thuringiensis permise infatti di rivelare la presenza di una regione altamente conservata nella porzione N-terminale e di una regione variabile nella porzione C-terminale. Attualmente è noto, ad esempio, che l'attività della δ-endotossina di B. thuringiensis subsp. kurstaki dipende dai primi 646 aminoacidi dei 1.156 totali della proteina. In molti costrutti, un gene ingegnerizzato di questo tipo è stato posto sotto il controllo trascrizionale di un forte promotore costitutivo, come il 35S derivato dal virus del



Nptll 35S CaMV transgene nos RB

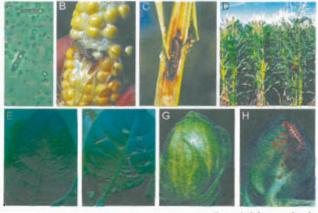


Fig. 19.44 – Batteri di Bacillus thuringiensis (A) ed esempi di piante transgeniche resistenti agli insetti: danni da piralide in spighe e culmi di mais (B, C): varietà di mais Bt e (D); foglie di una varietà di soia Bt e di una normale (E,F); capsule di una varietà di cotone Bt e di una normale (G,H).

mosaico del cavolfiore (CaMV), nonché del sito di arresto trascrizionale e di poliadenilazione della nopalina-sintasi (NOS) di agrobatterio, usando come marcatore selezionabile il gene della neomicina-fosfo-transferasi (NPTII) che conferisce resistenza alla kanamicina (Fig. 19.43). Piante transgeniche in grado di esprimere d-endotossine modificate di *B. thuringiensis* sono state prodotte in diverse specie ed utilizzate per costituire varietà *Bt* resistenti ad insetti dannosi: tra le specie di interesse agrario sono note il tabacco, il pomodoro, il cotone, il colza, la soia, il riso e il mais. Particolarmente diffuse sono le varietà transgeniche di questa ultima specie, note come mais *Bt*, che hanno dimostrato di essere pienamente resistenti agli attacchi di piralide (*Ostrinia nubilalis*) (Fig. 19.44).

Benché la produzione di endossine rappresenti il sistema più usato per conferire alle piante la resistenza contro gli insetti, tali proteine sono efficaci solo contro determinati insetti dannosi e ciò ha reso necessario lo sviluppo di strategie alternative, come quella basata sullo sfruttamento di geni codificanti per inibitori dell'amilasi e delle proteasi. Tali proteine, che si sono dimostrate efficaci contro vari tipi di insetti dannosi insensibili all'azione delle endotossine, agiscono rendendo gli insetti incapaci di digeri-

re le sostanze vegetali di cui si nutrono poiché questi inibitori interferiscono con l'idrolisi dell'amido o delle proteine della pianta.

Il gene che codifica l'inibitore della tripsina del fagiolo dall'occhio (Vigna sinensis) ha così permesso di ottenere piante transgeniche di tabacco tolleranti alle larve di lepidottero Heliothis virescens. Piante transgeniche di riso per il gene che codifica l'inibitore II della proteasi di patata hanno mostrato resistenza contro Sesamia inferens, uno dei principali lepidotteri nocivi per questa coltura. Anche altri inibitori delle proteasi di origine vegetale sono risultati efficaci contro diversi insetti dannosi di importanti specie coltivate, come il colza, la patata, l'erba medica e il pomodoro. Un altro modo per ottenere piante transgeniche resistenti agli insetti prevede il trasferimento del gene che codifica l'inibitore dell'α-amilasi. Tale inibitore, naturalmente

presente nelle proteine dei semi del fagiolo comune, è stato usato per produrre piante transgeniche di pisello tolleranti o resistenti, a seconda del suo livello di espressione, al coleottero *Callosobruchus maculatus* (**Fig. 19.45**).

Piante transgeniche resistenti ai virus sono state ottenute trasferendo nella pianta geni virali codificanti per replicasi, proteine del capside e di trasporto. Il primo esperimento che ha dimostrato la fattibilità di questa strategia ha riguardato l'espressione della proteina del capside del virus TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) in piante di tabacco. In seguito, ricorrendo all'espressione delle proteine del capside sono state costituite varietà transgeniche di pomodoro, cetriolo, riso e patata tolleranti, rispettivamente, ai virus ToMV (*Tomato Mosaic Virus*), CuMV (*Cucumber Mosaic Virus*), RSMV (*Rice Striated Mosaic Virus*), PVY e PVX (*Potato Virus Y e Potato Virus X*). In tabacco, da un solo evento di trasformazione, sono state sviluppate varietà trasgeniche resistenti ad un ampio spettro di virus in quanto il gene codificante la proteina del capside di un certo virus è risultato in grado di conferire tolleranza anche verso altri virus. In tutti questi casi la capacità dei virus di infettare la pianta e di diffondersi sistematicamente è risultata fortemente attenuata, verosimilmente a causa della incapacità del virus stesso di moltiplicarsi in maniera corretta.

Attualmente, una strategia molto seguita per la costituzione di varietà resistenti ai virus è quella basata sull'ottenimento di piante in grado di sintetizzare RNA antisenso complementare all'RNA messaggero della proteina di rivestimento del virus (Quadro 19.4). Tale strategia può conferire resistenza impedendo al virus di replicarsi nelle cellule della pianta ospite. Una delle prime sperimentazioni è stata condotta nella zucca (Cucurbita pepo) utilizzando costrutti aventi una combinazione di geni antisenso delle proteine del capside di CuMV (Cucumber Mosaic Virus), ZYMV (Zucchini Yellow Mosaic Virus) e WMV (Watermelon Mosaic Virus), permettendo così la costituzione di varietà transgeniche resistenti a più virus contemporaneamente. In particolare, le piante che sintetizzano copie di RNA antisenso dei geni codificanti le proteine del capside di questi virus hanno dimostrato di possedere una piena resistenza contro l'infezione trasmessa dagli afidi.

Anche le malattie di origine fungina sono responsabili di perdite consistenti di produzioni, ma la costituzione di varietà resistenti a questi patogeni è stata fino a questo momento limitata. Il controllo dei funghi, così come quello dei batteri, è infatti tuttora basato principalmente sull'uso di agenti chimici. È noto che le piante rispondono all'invasione di un fungo patogeno producendo particolari proteine, chiamate comunemente proteine correlate con la patogenesi o PRP (*Pathogenic-Related Proteins*). Tali proteine comprendono principalmente le chitinasi e le glucanasi, le proteine taumina-simili e le proteine inibitrici dei ribosomi o RIP (*Ribosome Inhibiting Proteins*). La produzione di piante transgeniche in grado di esprimere in modo costitutivo i geni codificanti gli enzimi che degradano i principali costituenti delle

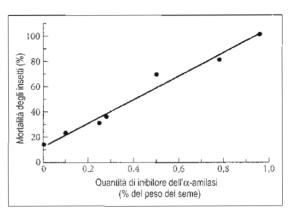
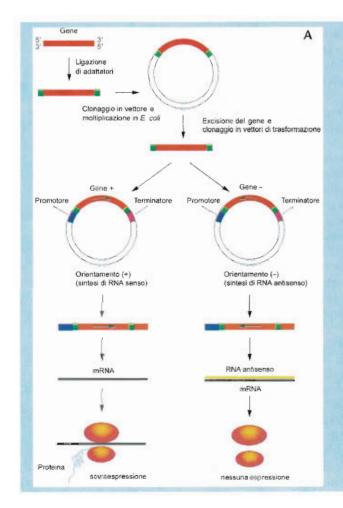


Fig. 19.45 – Mortalità delle larve del coleottero *Callosobruchus maculatus* sulle piante di pisello transgenico in relazione alla quantità di inibitore dell' $\alpha$ -amilasi.

pareti cellulari fungine (β-1,4-chitine e β-1,3-glucani) costituisce la strategia più seguita per la costituzione di varietà transgeniche resistenti ai funghi. Ad esempio, in pomodoro il trasferimento e l'espressione contemporanea di questi due geni ha conferito tolleranza alle infezioni di *Fusarium*. Il tabacco, il colza e il riso rappresentano altre specie di interesse agrario dove è stata realizzata la trasformazione genetica con l'ottenimento di piante in grado di esprimere la chitinasi sotto il controllo del promotore CaMV, mentre linee di tabacco transgeniche in grado di esprimere costitutivamente sia la chitinasi che la glucanasi sono state ottenute trasformando due distinte piante per ognuno di questi geni e combinando successivamente in un unico genotipo i due caratteri attraverso incrocio seguito da selezione.

Particolarmente utili come fattori di virulenza sono risultate alcune tossine di origine batterica. Ad esempio, *Xanthomonas albilineans* può sintetizzare una famiglia di tossine che determinano sintomi caratteristici di clorosi dovuti al blocco dello sviluppo dei cloroplasti. L'introduzione e l'espressione di un gene codificante una di queste tossine di resistenza nella canna da zucchero ha determinato una riduzione consistente dei sintomi e della moltiplicazione del batterio patogeno. Risultati di rilievo sono stati ottenuti in patata, contro il batterio patogeno *Erwinia carotovora* trasferendo un gene del batteriofago T4 responsabile della sintesi del lisozima, e in riso contro l'avvizzimento fogliare causato dal batterio *Xanthomonas oryzae* trasferendo un gene di resistenza (*Xa*21) isolato in una specie selvatica di riso.



#### Quadro 19.4 - Trasformazione genetica con geni antisenso

A differenze delle strategie normalmente seguite per la costituzione di piante transgeniche, basate sulla possibilità di dotare una pianta di una caratteristica, particolare inserendo nel suo DNA genomico uno specifico gene in grado di essere efficientemente trascritto e tradotto (gain of function), la strategia di trasformazione con DNA antisenso è utilizzata per annullare l'attività di un gene (loss of function) soprattutto allo scopo di studiarne la funzione e comprendere il carattere controllato.

Sia negli eucarioti che nei procarioti la molecola di RNA complementare al normale trascritto di un gene prende il nome di RNA "antisenso". Qualsiasi trascritto di mRNA può infatti essere con-



Fig. 19.46 – (A) Strategia antisenso: la trasformazione di piante con geni aventi un orientamento inverso rispetto alle regioni di regolazione determina il blocco della espressione del corrispondente gene endogeno. (B) Pomodori transgenici e prodotto commerciale americano a base di pomodori transgenici.

siderato un RNA "senso" poiché l'informazione genetica contenuta corrisponde a quella del filamento senso di DNA e può essere tradotto in una catena polipeptidica. Trasformando una pianta usando un costrutto con la regione codificante di un gene orientata in maniera invertita rispetto al promotore è possibile annullare la traduzione del corrispondente gene endogeno. L'espressione di mRNA antisenso all'interno di una cellula è infatti in grado di reprimere la sintesi proteica in quanto può formare una molecola duplex con il normale mRNA senso (Fig. 19.46). In questo modo viene sottratto il trascritto di un dato gene che non è pertanto più utilizzabile e non può essere tradotto in una catena polipeptidica. L'ibridazione RNA antisenso-senso determina, inoltre, una molecola instabile e soggetta a rapida degradazione all'interno della cellula per opera di ribonucleasi specifiche degli RNA a doppio filamento. Una delle prime applicazioni della strategia di trasformazione con geni antisenso finalizzata a sopprimere l'espressione di geni endogeni è quella riguardante l'inibizione dell'ammorbidimento rapido dei frutti per mezzo dell'antisenso del gene codificante la poligalatturonasi (PG) che ha portato alla costituzione della varietà transgenica commerciale Flavr Savr di pomodoro (Fig. 19.46). Attualmente, oltre che per modificare il contenuto di determinanti acidi grassi o polisaccaridi nei semi, l'espressione di RNA antisenso è sfruttata per la manipolazione genetica della pigmentazione dei fiori, bloccando o riducendo l'attività dei geni coinvolti nel percorso biosintetico delle antocianine. Ad esempio, la trasformazione genetica della Petunia con il cDNA antisenso codificante la calcone-sintasi (CHS) è stata intrapresa al fine di ottenere piante a fiori completamente bianchi o variamente colorati in relazione alla quantità di pigmento sintetizzato.

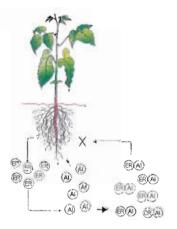
## 19.6.5.4 Tolleranza a stress abiotici (ambientali)

La siccità, la salinità dei suoli e le basse temperature rappresentano i principali fattori ambientali che diminuiscono la produttività delle piante coltivate.

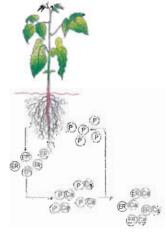
La coltivazione in condizioni di carenza o assenza di irrigazione presenta grossi problemi connessi alla salinità del suolo. Una delle strategie seguite per migliorare la tolleranza a questo tipo di stress prevede la costituzione di varietà transgeniche in grado di produrre composti a basso peso molecolare, che nel loro complesso sono chiamati osmoliti o composti osmoprotettivi, come ad esempio gli zuccheri (trealosio, mannitolo), gli alcoli, alcuni amminoacidi (prolina) e i sali ammonici quaternari (betaina). Tali composti sono capaci di aumentare il potenziale osmotico della cellula, facilitando sia l'assunzione che la ritenzione di acqua, stabilizzando al contempo le membrane e proteggendo le macromolecole contenute nella cellula stessa dalle forti concentrazioni saline. Alcune piante adattate a condizioni ambientali di siccità e salinità sono in grado di sintetizzare naturalmente gli osmoliti, mentre altre piante coltivate non possiedono questa caratteristica risultando pertanto pochissimo tolleranti a tali condizioni di stress. Recentemente, acquisizioni significative sono state raggiunte in alcune specie modello incrementando la produzione endogena di composti osmoprotettivi mediante il trasferimento genico. In particolare, la betaina (glycinebetaine) si è dimostrata un efficiente osmolito in grado di accumularsi nelle piante di Arabidopsis trasformate con i geni coinvolti nella sua biosintesi e di conferire tolleranza non solo ad alte concentrazioni saline (100 mM NaCl) ma anche a basse ed alte temperature. Una strategia alternativa è quella che prevede una espressione accentuata di geni codificanti trasportatori ionici, come ad esempio quelli per l'attività antiporto Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> vacuolare, che mobilità il sodio dal citoplasma compartimentalizzandolo nel vacuolo e mantiene così la cellula in equilibrio osmotico. Ad esempio, piante trasgeniche di pomodoro con espressione accentuata di questo trasportatore ionico di Arabidopsis hanno mostrato tolleranza ad altissime concentrazioni saline (200 mM NaCl)

Riguardo alla tolleranza agli stress termici, recentemente sono stati clonati fattori di trascrizione che regolano l'espressione di geni coinvolti nelle reazioni di tolleranza a basse ed alte temperature. Tali fattori potrebbero rivelarsi utili per la costituzione di varietà trasngeniche idonee a condizioni ambientali avverse dal punto di vista termico.

Anche l'acidità dei suoli rappresenta un problema di primaria importanza per la coltivazione di molte specie. L'alluminio rappresenta un elemento particolarmente abbondante nei suoli e risulta tossico per molte piante, anche a basse concentrazioni, costituendo pertanto un grosso inconveniente soprattutto nei suoli acidi poiché divie-



suoli acidi



suoli alcalini

Fig. 19.47 – Ruolo degli essudati radicali (ER) nei suoli acidi e in quelli alcalini.

ne solubile inibendo così la crescita dell'apparato radicale. Molte piante tolleranti a questo elemento emettono essudati radicali contenenti acidi organici che combinandosi con l'alluminio formano complessi non più tossici. Le piante geneticamente modificate con una espressione accentuata dei geni coinvolti nella biosintesi di acidi organici hanno una capacità superiore di produrre e secernere questi acidi risultando quindi più tolleranti alla sua tossicità. Nei suoli alcalini, invece, il fosforo è in grado di formare complessi insolubili sia con il calcio che con il ferro, e conseguentemente la disponibilità di questo elemento viene ridotta drasticamente costituendo uno dei principali fattori limitanti per la produttività della coltura. Le piante geneticamente modificate in grado di produrre e secernere una maggiore quantità di acidi organici manifestano anche tolleranza ai suoli alcalini in conseguenza della loro capacità di acquisire il fosforo dai complessi insolubili (Fig. 19.47). La possibilità di sviluppare piante transgeniche in grado di sintetizzare acidi organici e di rilasciare questi con gli essudati radicali rappresenta quindi una delle strategie più promettenti per la costituzione di varietà adatte a suoli particolarmente svantaggiosi. Esempi sono rappresentati da varietà di tabacco e di papaia transgeniche per una citrato-sintasi, un gene isolato da Psudomonas aeruginosa, che consente alle piante di secernere una quantità di citrato molto superiore rispetto ai valori ordinari e di acquisire così tolleranza all'alluminio. Piante di tabacco transgeniche con una espressione accentuata del gene della citratosintasi hanno evidenziato anche una migliore capacità di crescere in suoli alcalini poveri di fosforo, dimostrando che il citrato consente una acquisizione efficiente di fosforo dai complessi insolubili tipo Ca-P. In conclusione, si può affermare che la manipolazione della biosintesi degli acidi organici promette di portare alla costituzione di varietà adatte ad essere coltivate in una vasta gamma di suoli.

## 19.6.5.5 Controllo dello sviluppo e del sistema riproduttivo

Il clonaggio di geni che controllano la biosintesi degli ormoni, l'architettura della pianta o la struttura dei fiori ha offerto nuove possibilità per intervenire sulle piante coltivate al fine di modificare caratteri agronomicamente utili o vantaggiosi per la produzione del seme. Tra i caratteri modificati attraverso esperimenti di trasformazione genetica possono essere citati il nanismo e l'habitus di crescita (ciliegio), la capacità di radicazione nelle specie arboree (melo, vite e actinidia), l'inibizione della fioritura in specie foraggere, come il loietto, e la modificazione del colore e della morfologia fiorale (petunia, viola, crisantemo, garofano). Un altro carattere importante che è stato frequentemente modificato riguarda la fertilità maschile e femminile poiché le linee transgeniche ottenute consentono di mettere a punto sistemi molto efficienti di produzione commerciale di seme ibrido anche in specie ermafrodite.

Nel 1990 Celestina Mariani e collaboratori hanno ottenuto le prime piante transgeniche maschio-sterili mediante il trasferimento del gene che codifica per la Barnase, una ribonucleasi che quando espressa nelle cellule del tappeto delle antere determina l'aborto del polline. Successivamente, lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato che la ristorazione della fertilità maschile può essere indotta esprimendo il gene Barstar, un inibitore della ribonucleasi ( $\rightarrow$  Cap. 10). Tale sistema è stato sfruttato per la costituzione di varietà ibride di colza, mais e radicchio.

Le piante femmina-sterili hanno invece una certa utilità nelle specie il cui prodotto commerciale non sia rappresentato dai semi: l'incapacità di produrre semi può infatti essere particolarmente vantaggiosa, nel caso di colture transgeniche di specie da foglie o da fiori, per realizzare il contenimento dei transgeni. L'ottenimento di linee impollinanti per la produzione commerciale di seme ibrido è comunque un'altra possibile applicazione delle piante caratterizzate da sterilità femminile.

L'isolamento di geni specifici coinvolti nello sviluppo dell'ovulo o del pistillo può consentire altre interessanti manipolazioni del sistema riproduttivo. Ad esempio, il promotore di un gene espresso nell'ovulo di *Antirrhinum majus* (bocca di leone) è stato utilizzato da A. Spena per l'induzione della partenocarpia in melanzana. La partenocarpia (**Quadro 19.5**), cioè lo sviluppo di frutti in assenza di fecondazione e pertanto privi di semi, è un fenomeno insolito, soprattutto considerando che sono i semi a permettere la perpetuazione della specie. La partenocarpia costituisce, tuttavia, un'carattere ricercato in orticoltura e frutticoltura, in quanto permette di produrre frutti in presenza di condizioni climatiche limitanti per la fecondazione e l'allegagione dei frutti. Lo sviluppo partenocarpico dei frutti può essere ottenuto selezionando varietà con partenocarpia genetica oppure irrorando il fiore con ormoni auxinici di sintesi. In condizioni naturali, i fitormoni auxinici sono prodotti dall'ovulo fecondato e stimolano lo sviluppo dell'ovario.

Per costruire piante transgeniche partenocarpiche è stato necessario introdurre un gene capace di aumentare la quantità e/o l'attività dei fitormoni auxinici negli ovuli. Il gene per la partenocarpia doveva, infatti, svolgere una precisa azione regolativa, esprimendosi in maniera appropriata non solo in termini spaziali e temporali, ma anche quantitativi. Il gene chimerico impiegato al fine di indurre la partenocarpia risulta

costituito da una regione regolativa, che conferisce espressione ovulo-specifica, e da una regione codificante, che presiede alla sintesi di un enzima capace di aumentare il contenuto di auxina. La regione regolativa è stata clonata dal genoma di una pianta, Antirrhinum majus, mentre la regione codificante è stata derivata dal genoma di un batterio, Pseudomonas savastanoi. Il gene chimerico per la partenocarpia è stato introdotto in melanzana ed in numerose specie vegetali, dimostrando di essere in grado di promuovere lo sviluppo partenocarpico dei frutti in condizioni climatiche proibitive per le varietà tradizionali (Fig. 19.48). La costituzione di piante orticole e frutticole partenocarpiche può permettere di ridurre i costi di produzione, razionalizzare la raccolta ed ottenere un valore aggiunto del prodotto

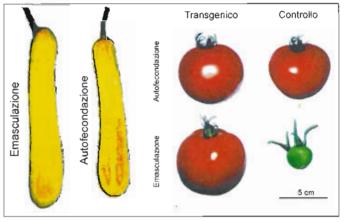


Fig. 19.48 - Melanzana partenocarpica (foto: A. Spena).

La ricerca biotecnologica è molto attiva anche nel controllo dell'espressione genica nelle piante allo scopo di manipolare caratteri specifici in un modo sempre più raffinato. Una delle applicazioni più recenti riguarda la cosiddetta tecnologia del seme suicida, un sistema genetico capace di provocare la sterilità dei semi una volta introdotto nelle piante mediante esperimenti di trasformazione genetica. Questa tecnologia, che costituisce un esempio di applicazione dell'espressione genica inducibile nelle piante, fa sì che i semi prodotti dall'agricoltore, benché apparentemente normali, non siano in grado di germinare. Il sistema genetico, brevettato nel 1998 dal Dipartimento di Agricoltura degli Stati Uniti (USDA), ha tre componenti: i) un gene che presiede alla sintesi di una sostanza capace di devitalizzare il seme nelle fasi finali del suo sviluppo, lasciando integri gli altri tessuti della pianta; ii) un metodo che consente di promuovere l'espressione del gene letale solo al momento desiderato, rendendo così possibile il lavoro di miglioramento genetico e la produzione del seme da parte delle piante transgeniche per ottenerne il quantitativo necessario per il mercato; iii) un meccanismo per attivare il gene letale dopo che l'agricoltore ha acquistato il seme in modo che il seme della generazione successiva prodotto dall'agricoltore sia incapace di germinare (Fig. 19.49). Il sistema nel suo complesso è composto da tre geni ed è basato sulla loro espressione tessuto-specifica, regolabile e ritardata.

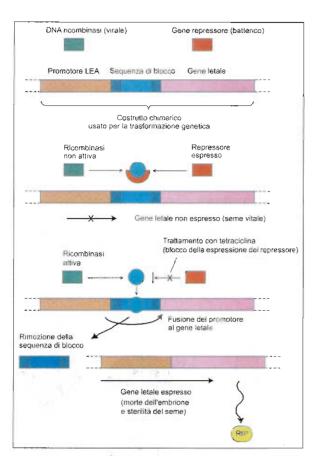


Fig. 19.49 – Tecnologia gene terminator.

Relativamente al gene codificante la sostanza letale per il seme, tra i possibili candidati è stato preferito quello che produce una proteina inibitrice dei ribosomi (RIP), gene isolato dalla pianta Saponaria officinalis. Questa proteina è capace di inibire la sintesi proteica e quindi di causare la morte delle cellule, anche a basse concentrazioni. Il promotore usato è invece quello di un gene di cotone attivo nelle fasi finali dell'embriogenesi, noto come Late Embryogenesis Abundant (LEA). Il promotore LEA consente pertanto al gene che codifica la RIP di esprimersi soltanto quando il seme ha completato il suo sviluppo ed ha quindi raggiunto la dimensione finale, avendo così accumulato le normali riserve di proteine e lipidi.

L'attivazione del gene che presiede la sintesi della RIP è comunque anche sotto il controllo di un ulteriore gene che può essere attivato con un trattamento esterno. Questo sistema di controllo è stato realizzato inserendo tra il gene letale e il suo promotore una sequenza di DNA in grado di bloccarne la trascrizione. Le estremità di questa sequenza possono essere riconosciute da un enzima, detto ricombinasi, che è capace di rimuovere la sequenza di blocco, ripristinando la funzionalità del gene letale. Affinché la ricombinasi sia in grado di agire soltanto quando il seme viene immesso sul mercato, il gene della ricombinasi è stato posto sotto il controllo di un promotore costitutivo, cioè normalmente attivo in tutti i tessuti della pianta durante tutte le fasi del suo sviluppo, opportunamente modificato in modo che venga represso attraverso il legame con una particolare proteina. Questa proteina è prodotta da un terzo gene posto sempre sotto il controllo di un promotore costitutivo. Di

conseguenza, l'inibitore della ricombinasi è sempre presente e questa non può pertanto attivare il gene letale: in tali condizioni il seme prodotto è in grado di germinare.

La proteina che reprime la ricombinasi, inibendo l'espressione del gene letale, è capace però di interagire e legarsi con un antibiotico, la tetraciclina. Quando il seme è trattato con la tetraciclina, prima della sua immissione sul mercato, tale antibiotico promuove l'inattivazione della proteina inibitrice della ricombinasi. La ricombinasi viene quindi prodotta ed è in grado di rimuovere la sequenza che blocca l'espressione del gene letale. Dal momento che il gene che codifica la RIP è attivo solo nella fase finale della maturazione del seme, poco prima del raccolto, il seme ha un aspetto del tutto normale ma è incapace di germinare poiché l'embrione è stato devitalizzato dall'azione di questa proteina.

Tale tecnologia ha avviato un acceso dibattito per le sue conseguenze socio-economiche ed è stata ribattezzata con il nome di *Terminator*. L'USDA ha definito la biotecnologia del seme suicida un "sistema per la protezione delle tecnologie". Lo scopo principale e dichiarato è quello di costringere gli agricoltori ad acquistare il seme dalla ditta sementiera ogni anno, impedendo loro di reimpiegare quello prodotto in azienda. Ciò avviene già per le varietà ibride, in quanto a causa della segregazione e della ricombinazione genetica la produttività delle colture impiantate con il seme prodotto in proprio è molto scarsa. La tecnologia del seme suicida potrà eventualmente consentire alle ditte sementiere di ottenere lo stesso risultato anche per le varietà di specie autogame, fondate sulla linea pura.

Attualmente, uno dei principali obiettivi della transgenesi applicata alla modificazione del sistema riproduttivo delle piante sembra essere comunque il clonaggio del gene che controlla l'apomissia e la costituzione di varietà geneticamente modificate

in grado di produrre seme per via asessuata. In questo senso lo sfruttamento biotecnologico dell'apomissia consentirebbe la moltiplicazione delle varietà ibride direttamente per seme: ciò renderebbe possibile l'ottenimento a basso costo di varietà uniformi, combinando i vantaggi propri della propagazione vegetativa (clonazione del genotipo) con quelli dell'anfimissia (propagazione per seme). In questo modo potrebbe essere realizzata la moltiplicazione di individui altamente eterozigoti mantenendo inalterato il genotipo nel tempo.

# Quadro 19.5 – L'allegagione del frutto e il fenomeno della partenocarpia

A cura di Andrea Mazzucato

Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

#### Allegagione del frutto

L'allegagione è il momento in cui l'ovario contenuto in un fiore maturo 'decide' se proseguire il proprio sviluppo e formare un frutto oppure se sottostare ai processi di senescenza che portano all'abscissione. Di regola, questa decisione dipende dall'avvenuta impollinazione del pistillo e dalla fecondazione dell'ovulo o degli ovuli contenuto/i nell'ovario. In definitiva, l'allegagione è legata alla possibilità che venga formato seme. Questo meccanismo ha una sua spiegazione biologica: la pianta, infatti, spende le risorse necessarie alla formazione del frutto solo nel caso in cui questo abbia la possibilità di contenere seme, il quale rappresenta a sua volta la possibilità di propagazione della specie. Nei sistemi agricoli, l'allegagione assume particolare importanza non solo perché su di essa si basa la propagazione per seme delle specie coltivate, ma anche perché è un cardine della produttività di tutte le colture in cui il prodotto commerciale è il frutto o il seme. Nonostante ciò, non si conosce molto in merito ai meccanismi genetico-molecolari che controllano l'allegagione.

È noto che l'azione combinata di due ormoni vegetali, auxina (IAA) e gibberelline (GA), è uno dei fattori chiave nello stimolo all'allegagione. Infatti i livelli di tali ormoni, che vengono in primis prodotti dal polline e dal tubetto pollinico, aumentano in maniera considerevole nell'ovario dopo l'impollinazione e la fecondazione, a causa della loro produzione da parte del seme che si sviluppa. Inoltre, trattamenti con IAA e/o GA sono in grado di indurre la partenocarpia, cioè lo sviluppo autonomo dell'ovario in assenza di impollinazione, con produzione di frutti senza seme. In linea con queste osservazioni, è stato dimostrato che esistono meccanismi che reprimono la biosintesi o il segnale dei due ormoni nell'ovario maturo.

Nonostante sia noto che IAA e GA sono fondamentali per l'allegagione del frutto, l'importanza relativa di ciascuno può variare da specie a specie; inoltre, non si conosce esattamente in quale rapporto funzionale i due ormoni si trovino. Se per molto tempo si è pensato che il segnale delle GA fosse necessario a stimolare la síntesi (o il trasporto) di IAA, oggi molti dati sperimentali hanno indicato il contrario, cioè che l'IAA può agire come attivatore trascrizionale di alcuni geni per la biosintesi di GA. È probabile, come spesso accade quando si studiano fenomeni sotto stretto controllo ormonale, che entrambe le ipotesi siano vere; ossia che l'azione dei due ormoni sia sinergica e mutualmente necessaria o che la stimolazione dell'uno sull'altro possa variare in maniera molto fine, in dipendenza del tessuto e/o di un preci-

so stadio di sviluppo. Di fatto il segnale ormonale scatena l'attività di geni IAA e/o GA-inducibili: uno dei primi effetti è la riattivazione del ciclo cellulare nel pericarpo (fase mitotica), a cui segue la progressiva differenziazione delle nuove cellule, che aumentano in volume determinando di fatto la crescita dimensionale del frutto (fase di espansione).

#### La partenocarpia: mutazioni spontanee e indotte

Il termine partenocarpia è stato introdotto per la prima volta da Noll all'inizio del XX secolo per indicare lo sviluppo di frutti apireni (senza semi) in assenza di fecondazione. Quando lo sviluppo partenocarpico del frutto è dovuto alla presenza di particolari combinazioni geniche la partenocarpia è detta genetica o naturale. Gustafson, autore di importanti ricerche sull'argomento, descrisse esempi di partenocarpia naturale in molte specie vegetali, tra cui diverse di interesse agrario. Egli utilizzò il termine partenocarpia per indicare lo sviluppo di un frutto senza fecondazione, distinguendola dalla stenospermocarpia in cui il frutto allega perché fecondato, ma, a causa dell'aborto precoce dell'embrione, rimane comunque senza seme.

La partenocarpia è un fenomeno già sfruttato dal miglioramento genetico; frutti apireni di diverse specie sono molto diffusi in quanto la mancanza di semi è una condizione molto apprezzata dai consumatori. L'interesse verso la partenocarpia è aumentato considerevolmente negli ultimi anni. La produzione del frutto svincolata dal compimento del processo riproduttivo costituisce un ulteriore vantaggio, in quanto consente buone produzioni anche in condizioni ambientali non ottimali per l'impollinazione e la fecondazione, o in individui sterili (es. poliploidi) o non autofertili (es. autoincompatibili). Infine, la mancanza di semi può essere un carattere favorevole per l'attività di trasformazione, come accade nel caso dell'industria conserviera del pomodoro. La partenocarpia naturale è detta obbligata quando una pianta produce solo frutti apireni; in questo caso il fenomeno è esclusivamente da imputarsi a fattori genetici. Diversamente, la partenocarpia è detta facoltativa, quando la pianta produce sia frutti con semi che senza semi, in dipendenza delle condizioni ambientali; anche in questo caso, tuttavia, i fattori genetici agiscono in maniera prevalente su quelli ambientali. La partenocarpia facoltativa è stata trovata in pomodoro (Fig. 19.50) e in altre specie in cui i processi di impollinazione e fecondazione dipendono strettamente dalle condizioni ambientali. Infine, si può avere partenocarpia accidentale, quando la formazione di frutti apireni è unicamente dovuta alla presenza di condizioni ambientali molto particolari, come estremi di temperatura (alta o bassa), d'intensità iuminosa, di fotoperiodo, ecc.

In diverse specie di interesse agrario (banano, agrumi, ananas, anguria, cetriolo, vite) esistono varietà con capacità parteno-carpiche più o meno spiccate, che vengono sfruttate nella produzione commerciale (Tab. 19.8). Ad esempio, tutte le varietà di

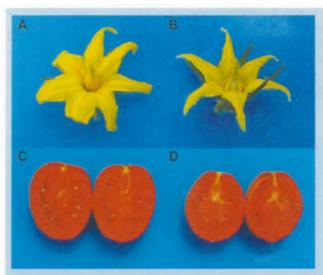


Fig. 19.50 – Fiore wild-type (A) e del mutante partenocarpico di pomodoro pat-2 (B, notare l'accrescimento precoce dell'ovario), bacche wild-type (C) e del mutante pat-2 (D, notare l'assenza di seme) (foto: P. Mosconi).

banano sono partenocarpiche; ciò permette di evitare la presenza di semi nel frutto e di sfruttare la coltivazione di genotipi triploidi che sono commercialmente più validi dei diploidi, ma completamente sterili. In pomodoro, sono stati identificati e descritti diversi mutanti che presentano espressione di partenocarpia genetica (Tab. 19.8). In questa specie, lo sfruttamento della partenocarpia permetterebbe, soprattutto in coltura protetta, di evitare trattamenti alleganti, garantendo anche in condizioni sub-ottimali una produzione soddisfacente ed un miglioramento delle caratteristiche merceologiche ed organolettiche della bacca.

Nonostante i mutanti partenocarpici siano noti da tempo, sono

veramente pochi i casi in cui sono stati individuati i geni responsabili di tali fenotipi. Di fatto si sa che tali mutanti presentano alterati equilibri ormonali che raggiungono nell'ovario livelli capaci di stimolare l'allegagione anche in assenza di fecondazione. Di conseguenza, si ritiene che i geni per la partenocarpia influiscano sul metabolismo degli ormoni e/o sul loro trasporto.

#### La partenocarpia artificiale: trattamenti ormonali e soluzioni biotecnologiche

La partenocarpia può essere indotta artificialmente mediante trattamento con polline devitalizzato (effetto mentore), estratto di polline o sostanze di crescita di tipo auxinico (acido indolpropionico, fenossiacetico, indolacetico e indol-butirrico), ma anche di altro tipo come gibberelline, citochinine ed etilene (partenocarpia artificiale).

Gustafson è stato il primo ad ottenere lo sviluppo di frutti di pomodoro partenocarpici di dimensioni normali, utilizzando sostanze chimiche (IAA, IBA e penicilline). Oggi sono disponibili composti naturali o di sintesi e protocolli di applicazione di notevole efficacia in un certo numero di specie, che vengono frequentemente utilizzati per garantire un'ottimale allegagione in colture orto-frutticole (Tab. 19.8). Ciononostante rimangono diverse problematiche connesse con questa pratica; i trattamenti costituiscono un costo supplementare per la produzione e la somministrazione di sostanze di sintesi (benchè teoricamente innocue) può essere mal vista dal consumatore. Inoltre, a volte si verificano cambiamenti indesiderati sulla pezzatura, la forma e la struttura del frutto o danni alla pianta stessa.

Sulla scorta delle conoscenze disponibili sul controllo dell'allegagione, la partenocarpia è stata anche ottenuta recentemente modificando, tramite interventi di ingegneria genetica, il contenuto ormonale dell'ovario o la sua sensibilità nei confronti degli ormoni (partenocarpia biotecnologica) (Tab. 19.8).

Uno dei primi successi in questo campo è stato raggiunto con l'introduzione nel genoma vegetale di un gene chimerico costituito dal promotore del gene DefH9 di Antirrhinum majus, che conferisce espressione specifica nei tessuti della placenta e del-

Tab. 19.8 - Esempi di partenocarpia naturale, artificiale e biotecnologia scoperta o ottenuta in diverse specie di interesse agrario.

Tipo di partenocarpia	Coltura / Specie / Cultivar	Controllo genetico (accertato o presunto) o altro fattore scatenante
Partenocarpia naturale	Vite / Vitis vinifera / cv Cortinto cv Thompson* Agrumi / Citrus spp. / Mandarino Satsuma Pomodoro / Solonum iycopersicum / cv Severianin e aftre Cetriolo / Cucumis sativus Anguria / Citrulius lanatus* Banano / Musa spp. Pepino / Solonum muricatum	? 2 geni recessivi complementari 3 geni dominanti complementari 1 o 2 geni recessivi (diverse mutazioni non alleliche) Poligenico ? 3 geni dominanti complementari 1, gene dominante
Partenocarpia artificiale	Pomacee, Drupacee, Vite Cucurbitacee, Solanacee	principalmente GA principalmente IAA
Partenocarpía biotecnologica	Melanzana / Solanum melongeno Tabacco / Nicotiono tobocum Pomodoro / Solanum lycopersicum Pomodoro / Solanum lycopersicum	pDefH9-iaaM pDefH9-iaaM pDefH9-iaaM pTPRP-F1-rol8-

l'ovulo, e dalla regione codificante del gene triptofano monossigenasi (iaaM), derivata dal batterio Pseudomonas syringae pv. savastanoi. L'enzima iaaM catalizza la reazione di produzione di indolacetamide, un precursore dell'IAA. Questo costrutto ha dimostrato di essere capace di innalzare i livelli dell'ormone nell'ovario e quindi indurre partenocarpia in melanzana e tabacco, ma anche in pomodoro ed in alcune specie frutticole.

Un altro brevetto per indurre la partenocarpia mediante ingegneria genetica è stato messo a punto sfruttando la capacità del gene rol8 di Agrobacterium rhizogenes di incrementare la sensibilità alle auxine dei tessuti in cui viene ad esprimersi. In pratica, l'espressione di rol8 produce un effetto di "overdose da IAA" che, in ultima analisi, è sufficiente a indurre lo sviluppo autonomo dell'ovario. Per limitare l'espressione del gene agli ovari e ai frutti, la sequenza codificante è stata associata al promotore del gene TPRP-F1, che conferisce trascrizione specifica in tali tessuti.

Oltre agli esempi citati, alcuni altri brevetti hanno proposto metodi per indurre partenocarpia coniugando opportuni promotori con sequenze codificanti enzimi coinvolti nel metabolismo ormonale. Considerando che le risposte partenocarpiche ai trattamenti ormonali sono strettamente specie e cultivar-specifiche (cioè ogni specie ha un suo optimum in termini di natura e concentrazione dell'ormone), è improbabile che un solo tipo di costrutto possa conferire un'allegagione ideale per tutte le specie. Perciò nuove soluzioni per ottenere la partenocarpia nelle piante superiori sono desiderabili e saranno suscettibili di sfruttamento commerciale. A tale scopo è di fondamentale importanza approfondire le conoscenze relative ai meccanismi naturali di allegagione del frutto, nonché quelle sulle basi geneticomolecolari delle forme di partenocarpia dovute a mutazioni spontanee o indotte che oggi sono conosciute ed utilizzate.

Considerando le problematiche connesse con l'Introduzione di piante geneticamente modificate negli agroecosistemi, le varietà dotate di partenocarpia biotecnologica avrebbero il vantaggio di impedire la dispersione del transgene (flusso genico) via seme; inoltre, la natura partenocarpica di tali individui consentirebbe anche di adottare meccanismi genetici che impediscano la produzione di polline vitale, come la maschiosterilità, garantendo così un contenimento completo del genoma della pianta ingegnerizzata.

#### Bibliografia

Carmi N., Salts Y., Dedicova B., Shabtai S., Barg R. (2003). Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the rol8 gene in the ovary. Planta 217: 726-35

Gillaspy G., Ben-David H., Gruissem W. (1993). Fruits: A developmental perspective. Plant Cell 5: 1439-1451.

Gorguet B., van Heusden A.W., Lindhout P. (2005). Parthenocarpic fruit development in tomato. Plant Biol 7: 131-139.

Gustafson F.G. (1942). Parthenocarpy: natural and artificial. Bot Rev 8: 599-654.

Mazzucato A., Taddei A.R., Soressi G.P. (1998). The parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. Development 125:107-114.

Ozga J.A., Reinecke D.M. (2003). Hormonal interactions in fruit development. J Plant Growth Regul 22: 73-81.

Prohens J., Ruiz J.J., Nuez F. (1998). The inheritance of parthenocarpy and associated traits in pepino. J Amer Soc Hort Sci 123: 376-380.
Rotino L., Perri E., Bottini M., Sommer H., Spena A. (1997). Genetic engineeing of parthenocarpic plants. Nat Biotech 15: 1398-1401.

Rowe P., Rosales F.E. (1996). Bananas and plantains. In: Fruit Breeding. Vol. 1: Tree and Tropical Fruits. J. Janick and J. Moore. New York, John Wiley. pp. 167-211.

Schwabe W.W., Mills J.J. (1981). Hormones and parthenocarpic fruit set. Hort Abstr 51: 661-698.

Varoquaux F., Blanvillain R., Delseny M., Gallois P. (2000). Less is better: new approaches for seedless fruit production. Trends Biotech 18: 233-242.

## 19.7 Trasformazione genetica come strumento per lo studio della funzione genica: RNA interference (RNAi) e silenziamento genico post-trascrizionale

Il silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS, post-transcriptional gene silencing), ritenuto inizialmente un fenomeno bizzarro e limitato a Petunia e a poche altre specie, rappresenta adesso uno degli argomenti di ricerca più interessanti ed innovativi della biologia molecolare e della genomica funzionale. Nel corso degli ultimi anni è divenuto, infatti, evidente che le modificazioni post-trascrizionali che determinano silenziamento genico si verificano nelle piante così come negli animali, svolgendo un ruolo rilevante nella difesa da infezioni di virus e risultando coinvolte nei processi alla base della mancata espressione di trasposoni.

L'applicazione più importante dei meccanismi di PTGS è riconducibile alla tecnica di RNA *interference* (RNAi), che consiste in un silenziamento genico post-trascrizionale mediato dalla formazione nella cellula di molecole di RNA a doppio filamento. Tale tecnica si è dimostrata estremamente efficiente per il *knock out* genico in molti organismi.

Oltre un decennio fa, R. Jorgensen e collaboratori, conducendo esperimenti in *Petunia* mirati all'ottenimento di fiori viola intensamente colorati attraverso l'intro-

duzione di geni per la sintesi di pigmenti sotto il controllo di promotori forti, ottennero risultati sostanzialmente diversi da quelli attesi: la maggior parte delle piante presentavano fiori variegati o bianchi, anziché viola. A tale fenomeno venne dato il nome di "co-soppressione" poiché sia l'espressione del transgene che quella del suo omologo endogeno veniva soppressa. In seguito, la co-soppressione venne evidenziata non soltanto in altre specie vegetali, ma anche nei funghi. Ad esempio, in Neurospora crassa il silenziamento di un gene endogeno dovuto all'inserimento di un transgene, fenomeno conosciuto in questa specie come quelling, è stato caratterizzato molto dettagliatamente a livello molecolare. Riguardo alle cause, il silenziamento genico in alcune piante è risultato associato con specifici meccanismi di metilazione, trattandosi cioè di una forma di silenziamento trascrizionale (transcriptional gene silencing, TGS), mentre in altre piante è stato evidenziato una forma di silenziamento a livello post-trascrizionale (post-transcriptional gene silencing, PTGS). Numerosi esperimenti hanno, infatti, evidenziato che il trascritto viene prodotto e rapidamente degradato nel citoplasma senza quindi potersi accumulare. Il silenziamento post-trascrizionale può essere avviato dalla introduzione di transgeni così come dalla infezione di certi virus. Studi condotti in Neurospora, Drosophila, C. elegans e piante hanno dimostrato che il fattore responsabile dei meccanismi PTGS è rappresentato da molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA, double stranded RNA).

La prima evidenza sul silenziamento genico mediato da dsRNA è stata ottenuta lavorando con il nematode *Caenorhabditis elegans*. Alcuni ricercatori, bloccando l'espressione di alcuni geni al fine di stabilirne la funzione, osservarono che l'iniezione di RNA senso determinava inaspettatamente lo stesso esito dell'RNA antisenso. Tale risultato venne spiegato solo alcuni anni dopo, quando l'iniezione in *C. elegans* di dsRNA, come miscuglio di filamenti senso e antisenso, produsse un silenziamento genico molto più efficiente di quello ottenuto con l'iniezione di RNA senso oppure di RNA antisenso. In particolare, l'iniezione di poche molecole di dsRNA per cellula risultò sufficiente a determinare il silenziamento completo del gene omologo non soltanto nell'individuo in esame, ma anche nella sua discendenza. Questo fenomeno, denominato "RNA interference", fu in seguito osservato anche in *Drosophila*. La microiniezione di dsRNA in embrioni si dimostrò idonea a produrre effetti di silenziamento così come l'inserimento di dsRNA mediante *particle gun*.

Circa il meccanismo biochimico alla base dell'RNAi, recentemente in piante caratterizzate da co-soppressione sono state identificate molecole di RNA lunghe circa 25 nucleotidi assenti in piante con normale espressione. Tali RNA sono risultati complementari sia al filamento senso che al filamento antisenso del gene silenziato. Ulteriori esperimenti condotti in *Drosophila* hanno messo in evidenza che l'mRNA omologo endogeno veniva tagliato nella regione corrispondente al dsRNA introdotto ad intervalli di 21-23 nucleotidi.

Il modello proposto per spiegare il funzionamento dell'RNAi è riportato in Fig. 19.51. Tale modello include una fase iniziatrice (*initiator step*), una fase effettrice (*effector step*) e una eventuale fase di amplificazione (*amplification step*). La fase iniziatrice prevede la digestione del dsRNA in frammenti di 21-23 nucleotidi. Le evidenze molecolari suggeriscono che tali siRNA vengono prodotti quando il dimero *Dicer*, una ribonucleasi dsRNA-specifica appartenente alla famiglia RNasi III, agisce sul dsRNA introdotto direttamente o attraverso transgene o virus, secondo un semplice processo di idrolisi ATP-dipendente. Successivamente, si formano strutture duplex lunghe circa 22 pb, chiamati *small interfering RNA* (siRNA), che presentano 2-3 nucleotidi sporgenti in 3'. Nella fase effettrice, le molecole siRNA vanno incontro alla incorporazione in un complesso di silenziamento chiamato *RNA-induced silencing complex* (RISC). Tale complesso proteico include una subunità elicasica, a stretto contatto con i frammenti di RNA processati, e subunità nucleasiche di tipo

esonucleotidico ed endonucleolitico. Nel complesso di silenziamento attivo l'siRNA subisce un processo di disavvolgimento dei filamenti così da rendere possibile l'ibridazione con l'mRNA target endogeno. Una volta completato l'appaiamento tra trascritti omologhi, inizia la frammentazione nucleasica dell'mRNA a partire dall'estremità 3' dell'siRNA. Data la notevole efficienza del sistema di silenziamento, almeno nelle piante, si ritiene possibile anche una fase di amplificazione responsabile della replicazione delle molecole di siRNA attraverso l'azione di una RNA polimerasi DNA-dipendente con conseguente propagazione del segnale di interferenza a tutto l'organismo.

Le acquisizioni relative agli ultimi tempi indicano che il sistema di PTGS possa avere svolto un ruolo chiave in termini evolutivi. In particolare, tale sistema viene considerato il risultato di un meccanismo molecolare di difesa contro l'azione dei trasposoni e l'infezione dei virus a RNA. Infatti, è stato osservato che le modificazioni a carico dei geni responsabili del meccanismo di RNAi molto spesso causano gravi difetti dello sviluppo.

Dopo la sua scoperta, il meccanismo di interferenza è stato sfruttato come strumento di ricerca nel settore della genomica funzionale. La tecnica RNAi è stata già impiegata con successo per accertare la funzione di molti geni non solo in *Drosophila* e *C. elegans*, ma anche in molte specie vegetali. Inoltre, la conoscenza che il sistema di RNAi mediato da transfezione o da infezione sia efficace nelle cellule di mammifero, ha indotto ad applicare questa tecnica anche per lo studio di molti geni nell'uomo e nel topo.

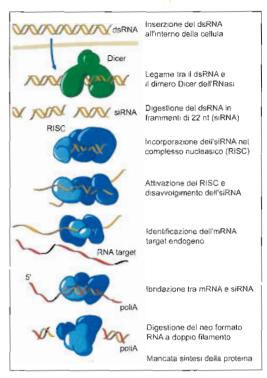


Fig. 19.51 – RNA interference: meccanismo di azione.

# 19.8 Produzione di biofarmaci, anticorpi e vaccini mediante piante geneticamente modificate

Benché l'uso delle piante per scopi medicinali risalga a migliaia di anni fa, il loro sfruttamento per la produzione di sostanze di interesse terapeutico come anticorpi, vaccini e autoantigeni è stato avviato solo molto recentemente. Da più parti si ritiene che la richiesta di prodotti farmaceutici di origine vegetale aumenterà progressivamente nel prossimo futuro e che sarebbe pertanto opportuno potenziare la ricerca in questo settore al fine di assicurare la disponibilità di grossi quantitativi a costi contenuti. Allo stato attuale non sono infatti le moderne tecnologie molecolari a limitare la loro diffusione e nemmeno la loro efficacia terapeutica, quanto piuttosto i costi di produzione, ritenuti ancora non competitivi rispetto a quelli relativi ai sistemi tradizionali, basati sull'uso di cellule batteriche, di lievito o di mammifero. La ricerca nel settore genetico vegetale ha acquisito conoscenze teoriche e sviluppato protocolli tecnologici che consentono di ottenere piante capaci di esprimere, strutturare ed assemblare proteine eterologhe (cioè derivanti da organismi di origine diversa) con elevata precisione. Numerosi studi hanno dimostrato che le piante sono in grado di produrre proteine eterologhe utili in campo biomedico, come ad esempio anticorpi, emoglobina, enzimi digestivi e subunità immunogeniche derivate da agenti patogeni utili per la messa a punto di vaccini. I medicinali di origine vegetale sono potenzialmente facili da produrre su vasta scala ed economici da conservare, e sono inoltre teoricamente più sicuri di quelli derivati dagli animali. Infatti, la produzione di biomolecole di interesse medico-farmaceutico basata sull'uso di piante transgeniche permette di eliminare i rischi associati alla trasmissione di agenti patogeni indesiderati o di tossine dannose per la salute dell'uomo. Lo sfruttamento delle piante transgeniche per l'ottenimento

di tali biomolecole di per sé non ha un impatto negativo sull'opinione pubblica, è piuttosto la diffusione in campo di piante geneticamente modificate che solleva interrogativi sui potenziali rischi di ordine ecologico ed ambientale.

Negli ultimi decenni la ricerca nel settore genetico ha rivoluzionato l'uso di proteine aventi grande valore terapeutico in un'ampia gamma di trattamenti clinici. Poiché moltissimi geni possono essere espressi in sistemi tanto differenti, come batteri, lieviti, animali e piante, è ormai essenziale determinare quale dei sistemi disponibili offre i migliori vantaggi per la produzione di proteine ricombinanti. Va da sé che il sistema di espressione ideale è quello che consente di ottenere il prodotto finale sanitariamente più sicuro e biologicamente più attivo, secondo una procedura che sia anche quella più economica. L'uso di cellule di mammifero modificate ricorrendo alla tecnologia del DNA ricombinante ha il grosso vantaggio di consentire l'ottenimento di prodotti che sono identici a quelli di origine naturale. Tuttavia, la coltura di queste cellule è molto costosa e può essere realizzata soltanto su scala limitata. L'uso di microrganismi, come i batteri, può invece essere impiegato su ampia scala, ma è accompagnato dallo svantaggio di portare all'ottenimento di prodotti che sono leggermente diversi da quelli di origine naturale. Ad esempio, le proteine che sono normalmente glicosilate negli essere umani, non lo sono nei batteri. Inoltre, le proteine umane che sono espresse ad alti livelli in E. coli frequentemente subiscono un cambiamento a livello di conformazione che è accompagnato anche da una precipitazione intracellulare, a causa della mancanza di ponti disolfuro e di un ripiegamento (folding) appropriato.

La produzione di proteine ricombinanti nelle piante ha comunque molti vantaggi potenziali nel settore dei biofarmaceutici di importanza rilevante per la medicina clinica: i) i sistemi di produzione basati sulle piante sono potenzialmente molto più economici di quelli che richiedono attrezzature industriali come fermentatori o bioreattori; ii) le tecnologie necessarie per ottenere le piante e trasformare i loro prodotti sono già disponibili; iii) l'esigenza del passaggio di purificazione può venire a mancare qualora il materiale vegetale contenente le proteine ricombinanti fosse ingeribile direttamente come alimento (vaccini edibili o commestibili); iv) nelle piante la formazione e l'immagazzinamento di tali proteine può essere indirizzato verso compartimenti specifici che ne preservano la stabilità nel tratto gastrointestinale oppure la loro espressione può essere localizzata direttamente nei cloroplasti; v) la quantità di proteine ricombinanti che può essere prodotta con la coltivazione delle piante è equivalente a quella ottenibile a livello industriale; vi) i rischi sanitari connessi alla potenziale contaminazione con patogeni o tossine di origine umana sono ridotti al minimo.

#### Quadro 19.6 - Struttura e funzione degli anticorpi

Gli anticorpi, detti anche immunoglobuline (Ig), sono proteine prodotte dalle cellule del sistema immunitario che l'organismo impiega per combattere l'infezione da parte di sostanze estranee. Gli anticorpi si legano a strutture, chiamate epitopi, sulla superficie di sostanze estranee, gli antigeni. Un particolare anticorpo è in grado di legarsi ad un particolare antigene con un aftissimo grado di specificità.

Una molecola di anticorpo è costituita da due catene proteiniche leggere (L) identiche e da due catene proteiniche pesanti (H), tenute insieme da legami idrogeno e ponti disolfuro localizzati (Fig. 19.52). In ogni anticorpo le regioni N-terminali di entrambe le catene formano il sito di riconoscimento dell'antigene. La modificazione è agevole poiché le varie funzioni delle molecole

anticorpali sono assolte da regioni distinte (domini). In particolare, i siti dell'anticorpo che riconoscono e fissano gli antigeni sono costituiti da tre domini denominati complementarity determinant region (CDR) poiché rappresentano gli elementi che determinano la complementantà, localizzati nell'ambito delle regioni variabili ( $V_n$  e  $V_c$ ) alle estremità NH<sub>2</sub> delle due catene pesanti e leggere, e caratterizzati dalla massima variabilità della sequenza aminoacidica. Le singole catene presentano inoltre regioni, o domini, costanti: ogni catena leggera include infatti una regione costante ( $C_1$ ), mentre ogni catena pesante è caratterizzata da tre regioni costanti ( $C_{10}$ ,  $C_{12}$  e  $C_{13}$ ).

Digerendo gli anticorpi con l'enzima papaina si ottengono tre frammenti: due identici, denominati Fab, composti ciascuno da una catena leggera intatta connessa a parte della catena pesante mediante un ponte disolfuro tra le regioni costanti C, e C<sub>uv</sub> e uno singolo, denominato Fc, composto di due frammenti di catena pesante verso l'estremità COOH, ognuno contenente le regioni  $C_{N2}$  e  $C_{N3}$  congiunte da un ponte disolfuro. I frammenti Fab conservano la capacità di legarsi con l'antigene così come l'anticorpo integro e questo è riconducibile alla loro porzione N-terminale contenente i domini CDR, nota come frammento Fv. La sequenza aminoacidica di tale frammento varia notevolmente in funzione dell'anticorpo, mentre una volta avvenuto il legame antigene-anticorpo la porzione C-terminale delle catene pesanti, corrispondente al frammento Fc, è in grado di determinare risposte immunitarie diverse.

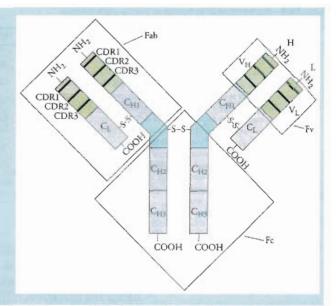


Fig. 19.52 - Struttura della molecola di un anticorpo.

#### 19.8.1 Produzione di anticorpi (immunoglobuline) nelle piante

Nell'ultimo decennio l'espressione e l'assemblaggio di catene proteiche leggere e pesanti di immunoglobuline (Ig) finalizzati all'ottenimento di anticorpi funzionali è stato dimostrato principalmente in piante transgeniche di tabacco, una specie risultata idonea per sviluppare sistemi versatili di produzione di forme diverse di molecole anticorpali quali: IgG e IgA complete, chimeriche, secretorie, frammenti Fv singola catena o fusi mediante un peptide linker, frammenti Fab e domini variabili di catene H. Di fatto le piante rappresentano una risorsa teoricamente illimitata di anticorpi monoclonali, rinominati secondo la terminologia anglosassone plantibody, per la terapeutica umana e animale, per applicazioni diagnostiche e trattamenti antitumorali specifici (Tab. 19.9).

Attualmente non è stato ancora raggiunto un consenso generale riguardo alla specie più adatta per la produzione commerciale di anticorpi. La maggior parte degli anticorpi sono stati espressi in tabacco, anche se recentemente sono state usate con successo altre specie, come erba medica, soia, patata, riso e frumento. I maggiori vantaggi derivanti dall'uso della materia prima (foglie oppure semi) sono connessi alla sola produttività: ad esempio, l'erba medica può fornire diversi raccolti all'anno, con produzioni complessive di biomassa pari a circa 25 t/ha, mentre il tabacco può fornire un numero elevatissimo di semi, fino ad 1 milione per pianta. I semi sono generalmente più poveri di complessi fenolici, proteici e lipidici rispetto alle foglie, e quindi il loro uso dovrebbe teoricamente rendere più semplici i procedimenti di purificazione. Inoltre, a differenza delle foglie, i semi così come i tuberi possono essere conservati agevolmente anche per lunghi periodi. In riso è stato dimostrato che i livelli di scFv nelle cariossidi non mostrano alcuna riduzione significativa dopo 6 mesi di conservazione a temperatura ambiente, mentre i tuberi di patata dopo 18 mesi di conservazione a basse temperature hanno mantenuto oltre il 50% della funzionalità anticorpale. Per brevi periodi di conservazione (5-7 giorni), anche le foglie di tabacco ed erba medica hanno comunque mostrato perdite contenute di frammenti scFv e di anticorpi IgG. La possibilità di purificare gli anticorpi da materiale di origine vegetale

Tab. 19.9 - Espressione di anticorpi in piante transgeniche.

Applicazione	Specificità	Anticorpi	Pianta	Livello di espressione
Carie dentaria	Antigene I o II di Streptococcus mutants	Guy's 13 (SigA)	Tabacco <sup>1</sup>	500 mg/g foglie (peso fresco)
Diagnostica	Immunoglobulina G	C5-1 (lgG)	Erba medica	1% proteine totali solubili
Trattamento del cancro	Antigene del carcinoma embrionico	ScFvT84.66 (ScFv) ScFvT84.66 (ScFv) ScFvT84.66 (ScFv) T84.66 (IgG)	Frumento Riso Riso Tabacco <sup>1</sup>	900 ng/g foglie 29 mg/g foglie 27 mg/g foglie 1 mg/g foglie
Trattamento del linfoma	Cellule 8	38C13 (ScFv)	Tabacco <sup>2</sup>	30 mg/g foglie
Trattamento del cancro del colon	Antigene di superficie	C017-A (lgG)	Tabacco <sup>2</sup>	n.d.
Trattamento contro virus	Virus 2 dell'Herpex simplex	Anti-HSV-2 (lgG)	Soia	n.d.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Nicotiana tabacum; <sup>2</sup> Nicotiana benthamiana (n.d., non determinato).

di semplice conservazione consentirebbe di dilazionare nell'arco dell'anno tale attività anziché concentrarla in periodi di tempo molto limitati.

Al momento sono noti soltanto pochi anticorpi prodotti in pianta potenzialmente utili ai fini terapeutici nell'uomo. Uno di questi è stato già testato nell'uomo e si tratta dell'anticorpo chimerico IgG-IgA secretorio contro un antigene di superficie del batterio Streptococcus mutants, il principale agente responsabile della carie dentale. Questo anticorpo (Guy's 13), prodotto in piante transgeniche di tabacco ottenute nel 1995 dal ricercatore inglese Julian Ma e dai suoi collaboratori, quando applicato in maniera topica come estratto grezzo ha dimostrato di essere efficace nella prevenzione di successive colonizzazioni dentarie da parte dello streptococco. Analogamente, l'anticorpo contro l'Herpes simplex, prodotto in soia geneticamente modificata, è risultato efficace nella prevenzione della trasmissione vaginale di questo virus usando il topo come modello di studio. La sua attività è infatti risultata uguale sia in vitro che in vivo a quella dell'anticorpo monoclonale prodotto mediante coltura di cellule. Altre ricerche sono state condotte con piante transgeniche esprimenti anticorpi contro antigeni tumorali: tale specificità può essere utilizzata sia a scopi diagnostici che per specifiche terapie di immunizzazione atte a stimolare una risposta immunitaria contro le cellule cancerose. Ad esempio, un anticorpo contro l'antigene del carcinoma embrionico (CEA), una glicoproteina di superficie cellulare, è stato recentemente espresso in riso e frumento. Gli anticorpi contro tale glicoproteina, che rappresenta uno degli antigeni meglio caratterizzati tra quelli associati ai tumori, sono largamente utilizzati sia nella terapia anticorpale che come strumento diagnostico in vivo. Inoltre, anche in questo caso i livelli di scFv nei semi di frumento non hanno mostrato alcuna diminuzione significativa nell'arco di 6 mesi di conservazione a temperatura ambiente. Lo stesso anticorpo è stato espresso anche in colture in vitro di cellule di riso. Infine, un esempio di anticorpo ancora in fase sperimentale espresso in pianta secondo un sistema alternativo è quello prodotto in tabacco sfruttando l'espressione transiente determinata da un vettore virale per l'ottenimento di vaccini specifici per il trattamento contro il linfoma. In questo caso, i geni anticorpali per l'espressione di un frammento Fv a singola catena sono stati derivati da un linfoma delle cellule B di topo. I frammenti scFv prodotti in pianta sono stati quindi impiegati per immunizzare topi che hanno così sviluppato anticorpi capaci di proteggerli contro l'infezione del linfoma responsabile della formazione dell'anticorpo originale. Altri vettori virali sono stati usati per produrre in pianta anticorpi utili ai fini terapeutici, come ad esempio l'anticorpo contro un antigene (GA733-2) associato ai tumori del colon-retto.

Al momento non esiste ancora alcuna produzione commerciale di anticorpi di origine vegetale. I costi di produzione dipendono sia dai livelli di espressione proteica

nelle cellule vegetali che dal sistema di purificazione utilizzato. È stato stimato che i costi di produzione di una immunoglobulina (IgG) usando erba medica coltivata in serra si aggirano intorno a € 500-600 g<sup>-1</sup>, contro i € 5.000 g<sup>-1</sup> necessari per la produzione della stessa immunoglobulina mediante ibridoma murino. La Fig. 19.53 mostra il confronto tra i costi per grammo di una immunoglobulina (IgA) prodotta secondo quattro diversi sistemi di espressione: colture cellulari di mammifero, animali transgenici (capre) e piante transgeniche, ulitizzando la granella (7,5 t/ha) o la biomassa verde (120 t/ha). Sebbene i livelli di espressione condizionino fortemente i costi, considerando il migliore valore riportato (500 mg/g di foglia) il costo finale sarebbe pari a € 50 g<sup>-1</sup> con le piante transgeniche, abbondantemente inferiore al costo finale stimato per gli animali transgenici (€ 100 g<sup>-1</sup>) e le colture cellulari (€ 1.000 g<sup>-1</sup>). La componente più consistente del costo finale degli anticorpi di origine vegetale è dovuta alla purificazione. Tuttavia, l'espressione di anticorpi nei semi di cereali, come riso e frumento, offre la possibilità di som-

ministrare per via orale alcuni anticorpi a scopo terapeutico senza la necessità di ricorrere a costose fasi di purificazione.

## 100 000 Cottura di cettule 10 000 Capre Euro g-1 transgeniche 1000 7.6 tonha Piante 100 ransgeniche 100 300 500 700 1000 5000 Espressione mg l<sup>-1</sup> coltura di cellule mg Kg-1 semi mg |⁻¹ latte ■ mg Kg<sup>-1</sup> biomassa

Fig. 19.53 – Costi per grammo di immunoglobulina A prodotta con diversi sistemi di espressione.

## 19.8.2 Produzione di vaccini (proteine immunogene) eduli nelle piante

Le proteine di patogeni virali e microbici costituiscono i primi esempi scelti per dimostrare sperimentalmente la fattibilità dei sistemi di espressione in piante transgeniche. La motivazione logica che ha spinto verso la produzione di vaccini eduli è facile da comprendere: proteine immunogene dei patogeni più importanti potevano essere sintetizzate nei tessuti vegetali per essere poi somministrate come alimenti per la vaccinazione sia all'uomo che agli animali. La dimostrazione di questo concetto è stata fornita usando diverse proteine batteriche e virali (**Tab. 19.10**). Gli aspetti pratici inerenti la scelta del prodotto vegetale più appropriato dove immagazzinare dosi definite di un dato vaccino sono ancora in corso di valutazione, così come la regolamentazione riguardante le procedure più idonee per produrre i vaccini.

La somministrazione orale dei vaccini costituisce senza dubbio una alternativa molto vantaggiosa rispetto alle iniezioni, sia per la maggiore praticità che per i costi più contenuti. Le possibilità di una acquisizione di immunità da parte delle mucose contro gli agenti infettivi che penetrano nel corpo attraverso la loro superficie sono aumentate considerevolmente con l'adozione dei vaccini orali. Uno dei maggiori problemi connessi all'uso dei vaccini orali concerne comunque la degradazione delle componenti proteiche nello stomaco e nel fegato prima che queste possano esplicare una risposta immunitaria. Per proteggere i vaccini da una degradazione di questo tipo, sono stati sviluppati parecchi sistemi che consentono di veicolarli e mantenerli integri durante la fase digestiva, come ad esempio mezzi di incapsulamento quali liposomi e tessuti di piante transgeniche.

Le prime proteine immunogene sono state ottenute nei vegetali impiegando specie facilmente trasformabili, come tabacco, patata e pomodoro. È tuttavia noto che le specie vegetali più idonee per l'espressione di vaccini debbano essere in grado di produrre alti livelli di proteine solubili che conservino inalterate le loro proprietà per un lungo periodo dopo la raccolta: per questo motivo i semi di cereali, come ad esempio il mais, sono da molti ritenuti i più adatti. La frazione embrionale è infatti ricca in proteina solubile e può essere agevolmente separata dalle altre componenti del seme al fine di incrementare la concentrazione dell'antigene e quindi contenere il volume delle dosi. La scelta della specie condiziona, inoltre, il tipo di prodotto da usare come

Tab. 19.10 - Piante transgeniche che producono proteine potenzialmente utilizzabili come vaccini.

Origine della proteina e organismo target per il vaccino	Proteine o peptidi espressi	Sistema di espressione	Integrità, immunogenecità e capacità protettiva del vaccino
Escherichia coli enterotossico (uomo)	Subunità B della tossina termolabile	Tabacco Patata Mais	Proteina multimerica, immunogenica <sup>1</sup> Attività di legame al recettore, immunogenica e protettiva <sup>1</sup> Attività immunogenica e protettiva <sup>1</sup>
Vibrio cholerae (uomo)	Subunità B della tossina del colera	Patata	Attività di legame al recettore, immunogenica <sup>1</sup>
Virus dell'epatite B (uomo)	Proteina di rivestimento virale	Tabacco Patata Lupino Lattuga	Proteina immunogenica <sup>1,2</sup> Proteina immunogenica <sup>1</sup> Proteina immunogenica <sup>1</sup> Proteina immunogenica <sup>1</sup>
Virus di Norwalk (uomo)	Proteina capsidica	Tabacco Patata	Proteina intatta, immunogenica <sup>1</sup> Particelle simili a virus, immunogenica <sup>1</sup>
Virus della rabbia (uomo)	Glicoproteina	Pomodoro	Proteina intatta
Cytomegalovirus (uomo)	Glicoproteina B	Tabacco	Proteina correlata alla immunogenicità
Virus della malattia emorragica (coniglio)	VP60	Patata	Attività immunogenica e protettiva <sup>2</sup>
Virus della malattia del piede e della bocca (animali domestici)	VP1	Arabidopsis Erba medica	Attività immunogenica e protettiva <sup>1</sup> Attività immunogenica e protettiva <sup>1,2</sup>
Coronavirus della gastroenterite (maiale)	Glicoproteina S	Arabidopsis Tabacco Mais	Attività immunogenica <sup>2</sup> Proteina intatta, immunogenica <sup>2</sup> Attività protettiva <sup>1</sup>

alimento: molti prodotti vegetali possono essere consumati così come sono, mentre altri richiedono processi di trasformazione. Il processamento agevola l'allestimento di campioni omogenei e dosaggi precisi, ma può anche determinare la parziale distruzione dell'antigene qualora richieda trattamenti ad alte temperature o pressioni elevate. Procedure alternative di processamento sono state sperimentate impiegando le componenti di ceppi enterotossigenici di E. coli che consistono della subunità B della tossina termolabile (Lt-B) espressa in mais. Una tipica dose di 1 mg di tale subunità può essere immagazzinata nell'embrione, al fine di ridurre il volume della dose, oppure in un singolo snack, per migliorarne la palatabilità ed incrementarne la stabilità. Per la vaccinazione di animali, la proteina immunogena può essere espressa unicamente negli organi della pianta che rappresentano la componente principale della loro dieta, così che possano essere evitati i trattamenti termici o quelli a pressione richiesti per la trasformazione del prodotto in mangime. Una lista di proteine espresse in pianta e di vaccinazioni per l'uomo e gli animali è riportata in Tab. 19.10. Nelle cavie di laboratorio, gli antigeni espressi in pianta hanno dimostrato di essere capaci di indurre risposte immunizzanti nel siero e nelle mucose quando somministrati per via peritoneale oppure orale, evidenziando in alcuni casi la capacità di conferire una protezione efficace contro una serie di patogeni modello. Alcuni di questi vaccini candidati sono stati anche testati clinicamente, dimostrando che tanto il prodotto vegetale fresco quanto quello trasformato o purificato possiede realmente enormi potenzialità in termini di livelli di immunizzazione.

La quantità di tessuto vegetale equivalente alla dose di vaccino deve avere un volume appropriato affinché possa essere assunto agevolmente. Conseguentemente, il raggiungimento di alti livelli di espressione in pianta appare come uno degli obiettivi più importanti. Miglioramenti dell'espressione possono essere raggiunti allestendo

costrutti molecolari contenenti specifiche regioni di regolazione da impiegare nella trasformazione genetica oppure ricorrendo ad incroci controllati tra le linee trasformate ed altri materiali seguiti da cicli di selezione genetica. Un altro aspetto molto importante concerne la necessità che ogni componente del vaccino mantenga la propria dimensione e forma nativa nelle cellule delle piante transgeniche, conservando così attività enzimatiche o di legame ai recettori (qualora necessario) o che sia in grado eventualmente di formare complessi che mimano strutture microbiche o virali, come nel caso delle *virus-like particles* (VLP). La stabilità delle proteine eterologhe, così come l'assemblaggio di più proteine diverse, dipende anche dall'ambiente cellulare e quindi dal compartimento subcellulare di immagazzinamento: i siti più favorevoli per l'espressione sembrano essere la superficie cellulare e gli organelli membranosi, come il reticolo endoplasmatico, l'apparato del Golgi e i plastidi.

# 19.8.3 Produzione di prodotti biofarmaceutici e di proteine umane nelle piante

I livelli delle proteine ad uso farmaceutico espresse nelle piante transgeniche sono risultati generalmente inferiori all'1% della proteina solubile totale, valore che costituisce la soglia minima indispensabile ai fini commerciali qualora le proteine debbano essere anche purificate. L'antigene ricombinante di superficie dell'epatite B derivato in lattuga transgenica ha indotto una produzione di anticorpi molto limitata nell'uomo, riflettendo probabilmente il suo basso livello di espressione (1-5 ng/g di peso fresco) in tale pianta. Nonostante i consistenti miglioramenti raggiunti in patata, il livello di espressione rimane ancora inferiore a quello richiesto per condurre test clinici in prospettiva di applicazioni pratiche.

Benché tuberi di patata capaci di esprimere una proteina del capside del virus di Norwalk (causa di gastroenterite) abbiano causato una immunizzazione preventiva quando consumati come alimento, i livelli di espressione attualmente raggiungibili (0,37% della proteina solubile totale) sono considerati ancora troppo bassi per intraprendere somministrazioni orali su vasta scala. In molte piante transgeniche, l'espressione di geni codificanti per altre proteine umane è risultata sempre molto bassa: 0,020% della proteina solubile totale per la siero-albumina, 0,001% della proteina solubile totale per la proteina C, 0,003% della proteina solubile totale per la eritropoietina e meno dello 0,001% del peso fresco per l'interferone-β (Tab. 19.11). Un altro gene codificante per il fattore di crescita dell'epidermide umana è stato espresso in tabacco transgenico soltanto nella misura pari allo 0,001% della proteina solubile totale. Nonostante i numerosi lavori che documentino gli alti livelli di espressione raggiunti in pianta con geni codificanti per proteine non umane, (ad esempio, la fitasi e la glucanasi) introdotti nel genoma nucleare, rimane comunque la necessità di implementare i livelli di espressione in pianta dei geni di origine umana al fine di consentire la produzione commerciale di proteine ricombinanti importanti dal punto di vista farmacologico. Un approccio alternativo molto promettente è rappresentato dall'espressione di transgeni nel genoma plastidiale (plastoma) delle piante. Geni esogeni sono stati introdotti nel DNA cloroplastico di tabacco, fornendo più di 10.000 copie per cellula e risultando nell'accumulazione di proteine ricombinanti fino al 47% della proteina solubile totale. La tecnica di trasformazione del cloroplasto è basata sullo sfruttamento di due sequenze fiancheggianti che, attraverso eventi di ricombinazione omologa, sono in grado di permettere l'inserimento di DNA estraneo nella regione compresa tra due geni funzionali. In questo modo i geni possono essere introdotti in una regione precisa all'interno della molecola circolare di DNA cloroplastico, evitando pertanto problemi di silenziamento dell'espressione connessi all'effetto di posizionamento, fenomeno riscontrato invece abbastanza frequentemente in piante transgeniche per geni inseriti

Tab. 19.11 – Produzione di composti biofarmaceutici con piante transgeniche per la terapia medica nell'uomo.

Applicazioni potenziali	Pianta	Proteina	Livelli di espressione
Proteine umane			
Anticoagulante	Tabacco	Proteina C	<0,01% PST
Antitrombina III	Colza	Irudina	0,3% proteine del seme
Neutropenia	Tabacco	Fattore stimolante	n.d.
Ormone della crescita	Tabacco	Somatropina	7,0% PST (cloroplasto)
Anemia	Tabacco	Eritropoletina	<0,01% PST (nucleo)
Analgesico per narcosi	Arabidopsis	Encefalite	0,1% proteine del seme
Cicatrizzante, attivatore tissutale	Tabacco	Proteina epidermica	<0,01% PST
Epatite C e B	Riso, rapa, tabacco	Interferone $\alpha$ interferone $\beta$	n.d. <0,01% peso fresco
Cirrosi epatica	Tabacco	Siero albumina	0,02% PST
Sostituto del plasma nelle trasfusioni	Tabacco	Emoglobine α e β	0,05% proteine del seme
Collagene	Tabacco	Collagene	<0,01% peso fresco
Fibrosi cistica, malattie del fegato	Riso	α <sub>1</sub> antitripsina	n.d.
Inibitore della tripsina nei trapianti	Mais	Aprotinina	n.d.
Antimicrobico	Patata	Lattoferrina	<0, 1% PST
Proteine non umane			
pertensione	Tabacco, pomodoro	Enzima di conversione della angiotensina	n.d.
Terapia contro l'HIV	Tabacco	α-tricosantina	2,0% PST
Malattia di Gaucher	Tabacco	Glucocerebrosidasi	1-10% PST

nel genoma nucleare. Comunque, i problemi connessi al silenziamento genico non sono mai stati osservati nel caso di trasformazione cloroplastica, mentre sono comuni nel caso di trasformazione nucleare.

La trasformazione del cloroplasto costituisce, inoltre, un sistema di ingegneria genetica che minimizza i rischi ambientali (gene escape). Infatti, questi organelli citoplasmatici sono generalmente ereditati per via materna e quindi ciò evita che la dispersione del polline possa diffondere il transgene nell'ambiente. L'aspetto più importante riguarda comunque la capacità da parte dei cloroplasti di sintetizzare proteine eucariotiche in quantità molto elevate, permettendo un ripiegamento corretto e la formazione di ponti disolfuro. L'accumulo di grandi quantità di somatropina umana completamente formata e correttamente assemblata (7% della proteina solubile totale) ha fornito evidenze sperimentali a favore della elevatissima espressione di tale proteina. Seguendo l'approccio basato sulla trasformazione del cloroplasto potrebbe eliminarsi così la necessità di ricorrere a costosi processi produttivi in vitro di proteine di valore farmaceutico ricorrendo a organismi ricombinanti. Ad esempio, il 60% dei costi operativi per la produzione commerciale di insulina umana in E. coli è dovuto a questi processi.

Le conoscenze acquisite fino ad oggi consentono di affermare che i biofarmaceutici prodotti in pianta (Quadro 19.7) possiedano gli stessi standard di sicurezza e le stesse caratteristiche terapeutiche dei sistemi tradizionali attualmente utilizzati. Tuttavia, molti medicinali di origine vegetale sono esenti dai controlli severi che invece subiscono i prodotti derivati dai microrganismi a causa della loro classificazione come supplementi nutrizionali. Poiché da alcune parti sono state sollevate preoccupazioni riguardo alla salvaguardia ambientale, è di fondamentale importanza che gli organi deputati alla regolamentazione dei processi biotecnologici stabiliscano al più presto precise procedure di valutazione che, caso per caso, permettano di distinguere i rischi reali da quelli presunti. Qualora prodotti biofarmaceutici particolarmente tossici ottenuti at-

traverso le piante transgeniche fossero in grado di persistere nell'ambiente o di accumularsi negli organismi, si renderebbe necessaria l'adozione di misure precauzionali.

L'induzione della produzione di biofarmaceutici potrebbe essere effettuata dopo il raccolto sfruttando l'espressione transiente determinata dai vettori virali, eliminando in questo modo i rischi connessi ad una esposizione in ambiente non controllato.

Altri interrogativi sollevati dalla coltivazione in pieno campo di piante transgeniche sono quelli che riguardano il *gene escape*, cioè la possibilità che il transgene diffonda in natura, attraverso il polline, trasmettendosi così, ad esempio, a specie infestanti interfertili con quelle coltivate. Per contenere tale fenomeno sono già stati messi a punto o sono in fase di sviluppo sistemi cosiddetti di contenimento basati sullo sfruttamento di barriere riproduttive, come la maschiosterilità, l'incompatibilità, l'apomissia e l'eredità materna. È stato dimostrato che l'inserimento di geni esogeni nel cloroplasto consente realmente di contenere la loro diffusione, ma fanno eccezione le specie che presentano eredità biparentale del genoma cloroplastico, così come lo sfruttamento della maschiosterilità, che è tuttavia possibile unicamente nelle specie il cui prodotto commerciale non sia rappresentato dal seme.

#### Quadro 19.7 – Espressione della GAD 65 umana in piante transgeniche per la prevenzione del diabete mellito insulinodipendente

A cura di Linda Avesani e Mario Pezzotti Dipartimento Scientifico e Tecnologico Università degli Studi di Verona

Il diabete mellito insulino-dipedente (IDDM), chiamato anche diabete giovanile o di tipo I (T1DM), è una malattia metabolica dovuta ad una deficienza di insulina che porta ad alterazioni nel metabolismo del glucosio con conseguente chetoacidosi, sete ed aumento della produzione di urine. Tale malattia colpisce lo 0,3-0,4% della popolazione, con un picco di insorgenza all'età di 11-12 anni ed è caratterizzata da un'elevata variabilità geografica. Lo spettro di ereditarietà del T1DM si presenta molto complesso perché numerosi geni sono coinvolti nell'insorgenza di questa malattia: a dimostrazione di ciò il 90% dei pazienti affetti non hanno genitori malati.

La deficienza nella produzione di insulina nei soggetti malati deriva dalla distruzione delle cellule  $\beta$ , responsabili della sintesi di tale ormone, di conseguenza si rende necessaria una terapia sostitutiva continua. La distruzione delle cellule  $\beta$  deriva da una risposta di tipo autoimmune che si manifesta a causa dell'inefficienza dei normali meccanismi responsabili del mantenimento della tolleranza verso gli antigeni autologhi, denominata anche tolleranza verso il self

Sulla patogenesi del T1DM umano sono disponibili scarse informazioni per ovvie limitazioni: background genetico eterogeneo, influenza di svariati fattori ambientali, scarsa disponibilità di tessuto pancreatico umano per studi istologici ed immunoisto-

Per la prevenzione secondaria del T1DM sono state saggiate varie strategie immunologiche. Tuttavia, il 90% dei malati di T1DM non ha familiari affetti dalla malattia e, di conseguenza, la prevenzione primaria del T1DM nella popolazione generale rimane l'obiettivo finale. Nessuna delle terapie fino ad ora impiegate combina tutte le caratteristiche (efficacia, sicurezza, specificità, bassi costi ed applicabilità alla popolazione generale) richieste

per la prevenzione primaria. Esistono evidenze immunologiche che indicano che è possibile prevenire lo sviluppo di malattie autoimmuni attraverso la somministrazione orale ripetuta di determinate dosi di autoantigene associato alla malattia. Tale protezione dipenderebbe dall'induzione di un meccanismo immunologico noto come tolleranza orale. L'induzione della tolleranza orale potrebbe soddisfare i requisiti per una prevenzione di tipo primario.

Essendo l'isoforma da 65 kDa della decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD65) il maggiore autoantigene umano associato con il T1DM, gli studi di induzione della tolleranza orale con la somministrazione di questa proteina sarebbero estremamente significativi. A causa degli alti costi di produzione di hGAD65 ricombinante, questi studi sono a tutt'oggi praticamente non proponibili. Piante transgeniche esprimenti l'autoantigene potrebbero essere di valido aiuto in quanto abbasserebbero notevolmente i costi e potrebbero essere usate nella prevenzione primaria in quanto impiegabili come alimento da ingerire fresco nella dieta, evitando l'uso di procedure costosissime di purificazione proteica.

Recenti risultati del nostro gruppo dimostrano che è possibile esprimere la GAD65 umana, immunoreattiva e correttamente conformata, in piante transgeniche di tabacco e carota a livelli simili a quelli di altre proteine ricombinanti. In Fig. 19.54 è riportata la rappresentazione schematica della GAD65 umana.

Il meccanismo responsabile dell'induzione di tolleranza orare è fortemente dipendente dalla dose di autoantigene somministra-



Fig. 19.54 – Rappresentazione schematica della GAD65 umana: sono evidenziati il segnale di ancoraggio alle membrane, il sito catalitico e gli epitopi immunoreattivi della proteina.

to. Infatti, alte dosi possono indurre delezione o anergia di cloni T-cellulari specifici, mentre dosi basse o intermedie possono attivare cellule T regolatrici responsabili di una soppressione attiva. La dose orale di GAD65 necessaria per indurre tolleranza orale è sconosciuta, ma risultati ottenuti con topi NOD dimostrano che somministrazioni ripetute di milligrammi/settimana/topo di autoantigene ricombinante sono necessarie per ridurre l'incidenza di T1DM.

Piante di tabacco trasformate con il cDNA della GAD65 umana hanno dimostrato di produrre correttamente il trascritto corrispondente al transgene e la proteina ricombinante. Studi di immunolocalizzazione, mediante tecniche di immunogold labelling e di microscopia elettronica, hanno dimostrato che la proteina ricombinante si trova ancorata alle membrane dei tilacoidi e dei mitocondri (Fig. 19.55). La GAD65 umana espressa nelle piante transgeniche risulta, inoltre, immunoreattiva nel senso che è in grado di reagire con gli anticorpi presenti nel siero di pazienti malati di T1DM e presenta livelli di espressione massimi pari allo 0,04% delle proteine solubili totali. Tali livelli però sono inadeguati per programmare studi di induzione di tolleranza orale nel modello animale dei topi NOD.

In uno studio successivo, allo scopo di aumentare i livelli di espressione della proteina ricombinante, la GAD65 è stata ingegnerizzata per il mantenimento nello spazio citosolico. Esistono, infatti, evidenze che i livelli di espressione di proteine eterologhe mantenute nel citosol sono maggiori rispetto ai livelli di espressione delle stesse ancorate alle membrane. Sono stati, quindi, modificati i residui critici della GAD responsabili dell'ancoraggio della proteina alle membrane, localizzati nella regione N-terminale dell'enzima. È stata costruita una molecola chimerica per la produzione di piante transgeniche esprimenti una forma citosolica della GAD attraverso la sostituzione della regione N-terminale della GAD65 con la corrispondente regione della GAD67 di Rattus norvegicus. L'isoforma da 67 kDa della GAD non è un autoantigene del T1DM e non presenta nella regione N-terminale i residui responsabili della localizzazione sub-cellulare della GAD65. È stato quindi realizzato un cDNA chimerico GAD67/65 in cui i primi 87 amminoacidi della GAD65 sono stati sostituiti con i corrispondenti amminoacidi della GAD67. È importante notare che tale sostituzione non dovrebbe alterare l'immunoreattività della mo-



Fig. 19.55 – Immagine al microscopio elettronico del tessuto fogliare di piante transgeniche di tabacco che evidenzia la localizzazione subcellulare della hGAD65 a livello di cloroplasti e mitocondri. La immuno-marcatura in situ è stata condotta utilizzando anticorpi specifici per la hGAD65.

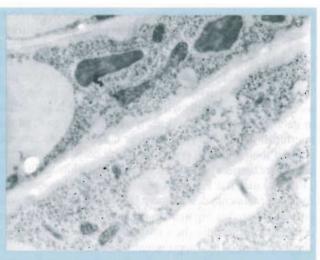


Fig. 19.56 – Localizzazione sub-cellulare della GAD67/65: la fotografia, ottenuta tramite microscopia elettronica del tessuto fogliare di piante transgeniche di tabacco dopo immuno-marcatura con anticorpi specifici per la GAD67/65, mostra segnali a livello citosolico.

lecola, in quanto gli epitopi riconosciuti dagli anticorpi di pazienti affetti da T1DM sono localizzati nella regione centrale e carbossi-terminale della proteina.

La tecnica di immunogold labelling con anticorpi specifici per la GAD67/65 combinate con l'analisi mediante microscopia elettronica dei tessuti fogliari di piante transgeniche di tabacco hanno evidenziato segnali a livello citosolico (Fig. 19.56). Nelle foglie delle piante transgeniche la quantità di proteina immunoreattiva risulta in media compresa tra 0,05% e 0,03% delle proteine solubili totali e i livelli di espressione massimi sono pari allo 0,2% delle proteine solubili totali. Ciò dimostra che le piante trasformate stabilmente con la GAD67/65 hanno livelli massimi di espressione che sono cinque volte più alti rispetto a quelli massimi ottenuti con la GAD65 umana (0,04% delle PST). Dal confronto fra la quantità di proteina prodotta e l'accumulo del trascritto corrispondente sembra che la GAD umana sia molto più stabile nel comparto citosolico che in associazione alle membrane. Non va neppure trascurata l'ipotesi che le piante analizzate possano avere una diversa efficienza di traduzione.

Parallelamente è stato utilizzato un sistema per l'espressione transiente della hGAD65 basato su un vettore virale modificato: il Potato Virus X (PVX). Tramite RIA sono stati misurati livelli medi di hGAD65 presente nelle foglie di piante di N. benthamiana infette pari al 2,16% delle PST. Tali livelli di espressione di proteina ricombinante sono dieci volte superiori ai massimi livelli di espressione ottenuti con la trasformazione stabile (0,19% delle PST). Questa strategia si è dimostrata essere molto promettente se si considerano i livelli di espressione di proteina ricombinante ottenuti, ma non è applicabile su larga scale a causa del difficile contenimento del virus.

La ricerca è finanziata dal Progetto della Comunità Europea "Pharma-Planta" e attualmente grazie a questo finanziamento sono allo studio nuove strategie per incrementare i livelli di espressione della proteina ricombinante. In particolare, tali strategie si basano sull'ingegnerizzazione molecolare della GAD65 per lo smistamento in differenti comparti sub-cellulari con lo scopo di aumentare la stabilità della proteina e di conseguenza innalzarne i livelli di espressione.

#### Bibliografia

Porceddu A., Falorni A., Ferradini N., Cosentino A., Calcinaro F., Faleri C., Cresti M., Lorenzetti F., Brunetti P., Pezzotti M. (1999). Transgenic plants expressing human glutamic acid decarboxilase (GAD65), a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Molecular Breeding*, 5: 553-560.

Avesani L., Falorni A., Tornielli G.B., Marusic C., Porceddu A., Polverari A., Faleri C., Calcinaro F., Pezzotti M. (2003). Improved in planta expression of the human islet autoantigen glutamic acid decarboxylase (GAD65). Transgenic Research, 12: 203-212.

#### Sommario

## Tecnologia del DNA ricombinante

La tecnologia del DNA ricombinante è stata sviluppata in seguito alla scoperta delle nucleasi e delle ligasi, due classi di enzimi in grado di agire sul DNA. Le nucleasi possono tagliare la molecola in corrispondenza di punti terminali (esonucleasi) oppure interni (endonucleasi). Le nucleasi più importanti per l'ingegneria genetica sono le endonucleasi di restrizione, enzimi di origine batterica in grado di intervenire nei punti delle molecole lineari o circolari di DNA a doppio filamento che presentano una determinata sequenza nucleotidica lunga generalmente da 4 a 6 pb (palindromo).

Il numero di nucleotidi che la compongono determina la frequenza di taglio di una endonucleasi: maggiore è la lunghezza della sequenza di riconoscimento e minore è la frequenza di restrizione teorica di una endonucleasi. Inoltre, le endonucleasi possono tagliare la sequenza al centro del palindromo producendo frammenti di restrizione con estremità piatte (*blunt ends*) oppure in maniera asimmetrica verso il 5' o verso il 3' originando pertanto frammenti di restrizione con un'estremità sporgente rispetto all'altra di 2-4 nucleotidi (*sticky ends*). Tra queste due classi, quelle che producono estremità sporgenti sono le endonucleasi maggiormente impiegate per il clonaggio dei frammenti di restrizione. Attraverso l'azione della ligasi è infatti possibile saldare le interruzioni tra due frammenti di restrizione con estremità complementari ripristinando così il sito di restrizione nel DNA chimerico.

# Vettori di clonaggio

La tecnologia del DNA ricombinante ha reso possibile analizzare genomi e caratterizzarne i geni trasferendo frammenti di DNA di un organismo in appropriati vettori di clonaggio: molecole di DNA a doppia elica costruite artificialmente in cui è possibile inserire un frammento di DNA esogeno e che possono replicarsi autonomamente in una cellula ospite. I primi vettori di clonaggio impiegati sono stati derivati dai plasmidi batterici, molecole circolari di DNA a doppio filamento capaci di duplicarsi in modo indipendente dal cromosoma batterico poiché possiedono la sequenza di origine necessaria per la propria replicazione. Un vettore di clonaggio moderno derivato da plasmidi di *E. coli* contiene una regione sintetica (polylinker) con molti siti unici di restrizione ed una sequenza di origine della replicazione (ori). Inoltre, un gene marcatore selezionabile che conferisce resistenza ad un antibiotico permettendo di riconoscere le cellule trasformate di *E. coli* e il gene lacZ che consente di distinguere le colonie trasformate contenenti il plasmide con inserto (ricombinante) da quelle trasformate ma contenenti il plasmide senza inserto.

I plasmidi consentono di clonare efficientemente frammenti di DNA di poche chilobasi. Quando i frammenti sono eccessivamente lunghi i plasmidi sono infatti spesso

instabili, vanno incontro a riarrangiamenti e tendono a perdere l'inserto durante la fase di replicazione. Al fine di clonare frammenti di DNA più lunghi sono stati quindi sviluppati vettori basati sul batteriofago λ. Il DNA di λ è una molecola lineare a doppio filamento dalla quale può essere rimossa la parte centrale, ottenendo così un vettore fagico costituito da due braccia laterali tra le quali può essere inserito il DNA esogeno. Anche i vettori fagici devono quindi contenere una regione polylinker con siti unici di restrizione e un gene che permette di distinguere le placche ricombinanti da quelle non ricombinanti, in genere il gene lacZ. Inoltre, entrambe le braccia del vettore fagico terminano con sequenze coesive (siti cos) di 12 nucleotidi a filamento singolo che sono tra loro complementari in modo che la molecola di DNA fagico possa assumere la forma circolare. La dimensione massima dei frammenti di DNA esogeno che possono essere clonati in un vettore  $\lambda$  è di circa 18 kb. Per clonare frammenti di dimensioni maggiori, compresi tra 35 e 44 kb, sono stati sviluppati i cosmidi, vettori che non si trovano in natura e che combinano le caratteristiche di un plasmide con quelle di un fago. Tali vettori includono una sequenza di origne della replicazione (ori), un gene per la resistenza ad un antibiotico, un sito cos e una regione polylinker con siti unici di restrizione. Dai cosmidi sono stati derivati i fosmidi, caratterizzati da un più basso numero di copie in E. coli e quindi da minore problemi di stabilità. Vettori di clonaggio sono stati sviluppati impiegando oltre a λ anche il batteriofago P1 che, avendo un genoma più grande, consente di clonare frammenti ancora più lunghi (fino a 125 kb).

In alternativa ai vettori plasmidici e fagici, possono essere impiegati i cromosomi artificiali di lievito o YAC (Yeast Artificial Chromosomes) e i cromosomi artificiali batterici o BAC (Bacterial Artificial Chromosomes). I primi vengono propagati in S. cerevisiae e permettono di clonare frammenti di DNA lunghi oltre 100 kb, mentre i secondi sono basati sul plasmide F di E. coli e permettono di clonare frammenti lunghi 300 kb o più. Le unità funzionali principali di un vettore YAC sono: un centromero, i telomeri e una o più sequenze di origine della replicazione. A queste componenti cromosomiche sono associati siti unici di restrizione e i geni marcatori selezionabili per visualizzare le cellule contenenti i vettori con il frammento di DNA esogeno. I vettori BAC invece comprendono: una sequenza di origine della replicazione (oriS), i geni che controllano la replicazione (repE) ed il numero di copie del plasmide F(parA,parB e parC), il gene marcatore selezionabile codificante per la cloramfenicolo acetiltransferasi  $(CAT^{R})$ , il gene lacZ e una regione polylinker con un sito unico di restrizione (ad esempio, HindIII) per il clonaggio dei frammenti di DNA esogeno e con una sequenza di riconoscimento rara, come NotI, per l'excisione degli inserti.

## Librerie genetiche

I vettori di clonaggio rendono possibile la caratterizzazione dei genomi, la determinazione della composizione, dell'espressione e della funzione dei loro geni attraverso la costruzione di genoteche. Una genoteca o libreria genetica è una collezione di moltissimi vettori di clonaggio, ciascuno dei quali contiene un particolare frammento di DNA genomico (libreria genomica) o di DNA complementare (libreria trascrittomica) di un determinato organismo. Una libreria genomica contiene quindi frammenti di restrizione di DNA genomico che nel loro insieme sono rappresentativi dell'intero genoma di un organismo, oltre alle sequenze esoniche, include anche le sequenze introniche, le sequenze di regolazione e le sequenze ripetute. Una libreria trascrittomica contiene invece i frammenti di cDNA ottenuti per retrotrascrizione degli mRNA che nel loro complesso sono rappresentativi del solo trascrittoma di un organismo o di un suo specifico organo o tessuto, contiene cioè unicamente le sequenze espresse nel tipo cellulare da cui sono stati isolati i messaggeri maturi.

Lo screening di una libreria genetica consente di identificare ed isolare singoli geni o singole sequenze nucleotidiche adottando procedure diverse a seconda del tipo di libreria ma tutte basate sull'impiego di sonde nucleotidiche opportunamente marcate. Il tipo di sonda dipende dalle informazioni disponibili sul gene di interesse. Qualora il gene sia, infatti, già stato clonato in parte, si può usare il frammento noto come sonda omologa al fine di isolare il gene completo o un suo paralogo, mentre se è già stato clonato in un altro organismo è possibile sintetizzare una sonda eterologa per tentare di isolare il clone contenente il gene ortologo. Quando invece il gene che codifica per il carattere di interesse non è mai stato clonato prima si può ricorrere alle procedure di differential display per ottenere la sonda da impiegare nello screening della libreria genetica. Lo screening di librerie trascrittomiche può essere condotto anche utilizzando vettori di espressione ed anticorpi specifici. In questo caso si evidenzia il clone di cDNA corrispondente all'mRNA che codifica per la catena polipeptidica riconosciuta dall'anticorpo. Infine, quando il prodotto genico non è noto, un approccio che può essere usato per l'isolamento di geni prevede la marcatura molecolare secondo una metodologia definita gene tagging. In questo caso, la ricerca di geni è connessa a fenomeni di mutagenesi inserzionale che determinano una manifestazione evidente a livello fenotipico. Gli elementi trasponibili delle piante e i T-DNA plasmidici di agrobatterio rappresentano le sequenze genetiche più utilizzate per la marcatura molecolare dei geni.

## Sequenziamento del DNA

Il sequenziamento del DNA oggi è una procedura completamente automatizzata che tuttavia segue ancora il metodo sviluppato da F. Sanger e collaboratori basato sulla sintesi enzimatica di molecole di DNA complementari che terminano in corrispondenza di specifici nucleotidi (metodo dideossi). Secondo il metodo originario, il sequenziamento di un clone prevede quattro differenti reazioni di sintesi ognuna delle quali avviene in presenza dei quattro deossiribonucleosidi trifosfati (dNTP) e di uno specifico dideossiribonucleoside trifosfato (ddNTP) che quando viene incorporato determina l'arresto dell'allungamento del filamento. Poiché l'integrazione del dideossiribonucleoside al posto del corrispondente deossiribonucleoside è casuale, il risultato di ciascuna delle quattro reazioni è un insieme di nuovi filamenti di DNA di diversa lunghezza, tutti terminanti però con lo stesso nucleotide. I prodotti di sintesi delle quattro reazioni sono quindi separati mediante elettroforesi in un gel di poliacrilammide usando quattro pozzetti adiacenti. Il gel essiccato viene infine esposto contro una lastra autoradiografica, dopo di che la sequenza del DNA può essere letta direttamente su di essa nella direzione  $5' \rightarrow 3'$ . La procedura per il sequenziamento a terminazione di catena attualmente impiegato si avvale dell'impiego della PCR, dei metodi di marcatura fluorescente e dei sequenziatori capillari automatici. La sequenza del DNA può essere desunta valutando la successione di picchi di colore diverso che compongono l'elettroferogramma, convenzionalmente nero per G, blu per C, verde per A e rosso per T.

## Piante geneticamente modificate

Un gene dopo essere stato isolato da un qualsiasi organismo, sia animale che vegetale, clonato in un vettore e caratterizzato, può essere trasferito, tal quale o modificato con tecniche di ingegneria genetica, in cellule vegetali dalle quali si possono rigenerare piante transgeniche: nel loro genoma sono stati incorporati geni esogeni (transgeni)

senza la mediazione del processo sessuale. La transgenesi finalizzata all'ottenimento di piante geneticamente modificate (PGM) può essere condotta impiegando metodi di trasferimento mediato oppure diretto.

Nel trasferimento genico mediato da vettori virali la pianta non è modificata geneticamente ma è soltanto l'ospite temporaneo del virus (espressione transiente), mentre in quello mediato da vettori agrobatterici i transgeni possono esprimersi solo dopo essere stati integrati stabilmente nei cromosomi della pianta (espressione stabile). I vettori virali di trasformazione attualmente disponibili derivano sia da virus a singola elica di RNA che da quelli a doppia elica di DNA, in entrambi i casi modificati attraverso tecniche di ingegneria genetica. Il loro impiego offre la possibilità di ottenere elevati livelli di espressione transiente dei geni trasferiti. I vettori batterici impiegati nella trasformazione genetica sono rappresentati dai plasmidi Ti e Ri di A. tumefaciens e l'A. rhizogenes. In entrambi i plasmidi è presente una regione che in seguito all'infezione viene integrata nel cromosoma delle cellula ospite. In tale regione, delimitata dalle sequenze LB (left border) e RB (right border) indispensabile per la sua excisione ed integrazione, sono contenuti i geni responsabili della patogenesi. In particolare, nel T-DNA sono inclusi i geni responsabili della sintesi di ormoni e opine, mentre esternamente al T-DNA sono localizzati i geni per il catabolismo delle opine, la sequenza di origine della replicazione (ori), le sequenze preposte alle funzioni di coniugazione e la regione di 30 kb contenente i geni per la virulenza (vir). Affinché il plasmide Ti potesse essere impiegato come vettore per il trasferimento genico è stato necessario rimuovere dal suo T-DNA i geni responsabili della biosintesi dei fitormoni (vettore disarmato). Inoltre, sia nel plasmide Ti che in quello Ri, sono stati deleti tutti i geni non necessari per svolgere la funzione di vettore ed inseriti un gene marcatore selezionabile in grado di conferire resistenza ad un antibiotico oppure ad un erbicida, un polylinker con siti unici di restrizione e un gene reporter che conferisce specifiche attività enzimatiche. L'impiego di vettori disarmati e ingegnerizzati per il trasferimento di geni nelle piante prevede che i plasmidi Ti ed Ri possano essere caricati dei geni da trasferire, clonati in E. coli ed inseriti in Agrobacterium mediante coniugazione, dopo di che il loro T-DNA viene trasferito ed integrato nel genoma vegetale. Tale fase richiede la presenza di diversi geni per la virulenza e la colonizzazione batterica, delle sequenze RB e LB, e della regione vir. Inoltre, può avvenire sia quando T-DNA e regione vir sono combinati in uno stesso plasmide (vettori cointegrati) che quando sono clonati in due plasmidi distinti (vettori binari).

Il trasferimento genico mediato da *Agrobacterium* non può essere applicato in tutte le specie vegetali. È stato pertanto necessario sviluppare metodi chimico-fisici di trasferimento genico diretto sia in cellule integre (espianti e calli) che in cellule private della parete (protoplasti): elettroporazione, microiniezione, bombardamento e fusione dei liposomi. Tra questi metodi il bombardamento delle cellule vegetali con microparticelle rivestite di DNA plasmidico (metodo biolistico) mediante un apposito dispositivo (*particle gun*) è certamente quello più usato. Recentemente questo metodo è stato impiegato anche per inserire geni dentro i cloroplasti, fornendo così nuove possibilità di trasformare il plastoma.

Al momento i metodi più usati per la produzione di piante transgeniche nelle dicotiledoni sono quelli basati sulla trasformazione mediata da vettore batterico (plasmidi Ti e Ri), mentre nelle monocotiledoni è quello biolistico.

L'efficienza della trasformazione diretta o mediata da agrobatterio dipende da molteplici fattori e può essere valutata in base alla frequenza di espressione transiente di geni reporter, osservabile a livello delle cellule dell'espianto vegetale nelle prime 3-4 settimane successive all'infezione con *Agrobacterium* o al trasferimento diretto. Tuttavia, l'attività dei geni reporter non può essere utilizzata come prova conclusiva dell'integrazione stabile dei transgeni. Affinché possano essere ottenute piante tra-

sformate è necessario che il transgene sia stabilmente integrato nei cromosomi della cellula ospite (transgenesi) la quale a sua volta deve essere totipotente in modo da poter rigenerare la pianta completa (morfogenesi). Sotto questo punto di vista i tessuti vegetali possono essere considerati dei mosaici per la competenza ai due processi: solo un piccolissimo numero di cellule risulta competente sia per l'integrazione che per la rigenerazione. Inoltre, le cellule dei vari tessuti delle piante di solito reagiscono con risposte differenti agli stimoli cui vengono sottoposte. Una volta che il DNA esogeno è stato introdotto all'interno delle cellule queste devono potersi sviluppare e differenziare in vitro fino a rigenerare piante complete. Successivamente, sono necessarie approfondite indagini per stabilire se effettivamente il transgene è stato incorporato nei cromosomi delle plantule rigenerate da tali cellule. Comunque, non sempre un transgene realmente e stabilmente integrato nel cromosoma dell'organismo ospite è in grado di esprimersi. Infatti, si può assistere ad un totale o parziale silenziamento del transgene dovuto a molteplici cause. È stato dimostrato che in tutti i casi di silenziamento genico la perdita di espressione dei transgeni non è dovuta alla loro eliminazione fisica ma alla loro inattivazione molecolare a livello trascrizionale o traduzionale attraverso diversi meccanismi tra i quali: la metilazione, la co-soppressione, l'effetto posizionale e l'integrazione multipla. Gli studi compiuti su tali meccanismi hanno chiaramente indicato che le strategie migliori per avere una integrazione stabile ed una espressione regolare del transgene sono quelle basate sulla preparazione di costrutti con inserti semplici di DNA esogeno che non includano sequenze duplicate o elementi ripetuti con sequenze invertite. Inoltre, quando possibile è preferibile adottare i metodi di trasformazione genetica mediata da vettori agrobatterici in quanto generalmente consentono di trasferire gli inserti in singola copia (raramente in doppia copia).

Le prime piante geneticamente modificate sono state costituite con gli obiettivi di incrementare la produttività, migliorando le difese contro patogeni e avversità ambientali, di ridurre i costi e di facilitare le pratiche agronomiche (PGM di I generazione). Un altro obiettivo è stato quello di migliorare la qualità dei prodotti finali: composizione dell'amido o dell'olio, la produzione di zuccheri e di particolari proteine o amminoacidi, la colorazione dei fiori e numerosi altri caratteri (PGM di II generazione). Attualmente, notevoli aspettative sono riposte nelle piante transgeniche capaci di produrre vaccini, componenti del sangue, vitamine, ormoni e enzimi terapeutici di origine umana o animale, cosmetici e bioplastiche (PGM di III generazione). In questo senso le piante cominciano ad essere viste sempre più come bioreattori, cioè come organismi utilizzabili per realizzare reazioni biologiche finalizzate alla sintesi di prodotti specifici. Nella produzione di anticorpi monoclonali (plantibody), così come di altre proteine ad uso terapeutico, uno dei principali problemi è la loro bassa concentrazione nei tessuti vegetali. Per aumentare il livello di espressione dei geni codificanti le proteine ricombinanti, molto promettente è la trasformazione del genoma plastidiale, sistema che minimizza anche i rischi ambientali (gene escape).

# Bibliografia di riferimento e approfondimento

Bajaj, Y.P.S. (1999). Biotechnology in Agricolture and Forestry, 46: Transgenic crops. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Chawla, H.S. (2002). Introduction to Plant Biotechnology. Second Edition. Science Publishers, Inc. Enfield, NH (USA).

Cogoni, C., Macino G. (2000). Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. Genes Development, 10: 638-643.

- Dalla Penna, D. (1999). Nutritional genomics: manipulating plant micronutrients to improve human health. Science, 285: 375-379.
- Daniell, H., S.J. Streatfield, K. Wicoff (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends in Plant Science, Vol. 6, No. 5, pp. 219-226.
- De La Riva, G., J. González, R. Vázquez-Padrón, C. Ayra-Pardo (1998). Agrobacterium tumefaciens: a natural tool for plant transformation. Journal of Biotechnology, 1(3):118-133.
- Ellstrand, C.N. (1999). Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. Annual Reviews of Ecology and Systematics, 30: 539-563.
- Falcinelli, M., D. Rosellini (1999). Semi suicidi: un'applicazione dell'espressione genica inducibile nelle piante e sue possibili implicazioni. Sementi Elette, 5: 5-9.
- Glick, B.R., J.J. Pasternak (1998). Molecular biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. American Society for Microbiology.
- Hamilton, A.J., Baulcombe DC (1999). A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. Science, 286: 950-952.
- Hammond, S.M., Caudy AA, Hannon GJ. (2001). Post-transcriptional gene silencing by doublestranded RNA. Nature Reviews Genetics, 2: 110-119.
- Herrera-Estrella, L. (2000). Genetically modified crops and developing countries. Plant Physiology, 124: 923-925.
- Herrera-Estrella, L., A. Depicker, M. Van Montagu, J. Schell (1983). Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti plasmid-derived vector. Nature, 303: 209-213.
- Larrick, J.W., D.W. Thomas (2001). Producing proteins in transgenic plants and animals. Current Opinion in Biotechnology, 12: 411-418.
- Ma, J., A. Hiatt, M. Hein, M.D. Vine, F. Wang, P. Stabila, C. Van Dolleweerd, K. Mostov, T. Lehner (1995). Generation and assembly of secretory antibodies in plants. Science, 268: 716-719
- Martinez-Trujillo, M., J. Simpson, L.R. Herrera-Estrella (2002). Transgenic plants in modern agricolture. J. New Seeds, Vol. 4(3): 1-23.
- Maxam, A.M., W. Gilbert (1977). A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 560-564.
- Sanford, J.C. (1988). The biolistic process. Trends in Biotechnology, 6: 299-302.
- Nap, J.P., P.L.J. Metz, M. Escaler, A.J. Conner (2003) The release of genetically modified crops into the environment. The Plant Journal, 33: 1-18.
- Sanger, F., S. Nicklen, A.R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467.
- Monaco, A.P., Z. Larin (1994). YACs, BACs, PACs e MACs: artificial chromosomes as research tools. Trends Biotechnology, 12: 280-286. [Recensione sui vettori di clonaggio]
- Pogna, N. (2002). Le nuove tendenze dell'agricoltura transgenica. L'informatore Agrario, 30: 35-38.
- Poli, G. (2001). Le biotecnologie innovative. Le Scienze, 10: 6-16.
- Poli, G., A. Cocilovo, P.A. Martino, F. Riva, S. Russo, S. Francesco, M. Tallacchini (2001). Biotecnologie. Conoscere per scegliere. UTET Periodici.
- Rotino, G.L., E. Perri, M. Zottini, H. Sommer, A. Spena (1997). Genetic engineering of parthenocarpic plants. Nature Biotechnology, 15: 1398-1401.
- Zamore, P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell, 101: 25-33.