

Biotecnologie ed *OGM*:
come vengono trasferiti i geni?



a cura di Leonardo Magneschi

Scuola Estiva di Orientamento

Volterra 2007

Venerdì 29 giugno 2007

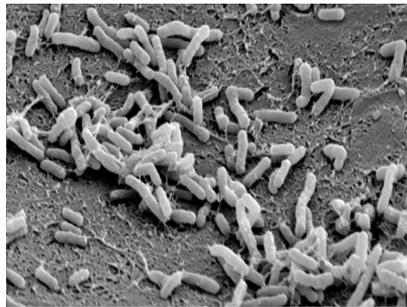
1 Introduzione all'*Ingegneria Genetica*

L'ingegneria genetica è una tecnica che permette di trasferire porzioni di DNA, più frequentemente *geni*, da un organismo ad un altro. A differenza delle convenzionali tecniche di miglioramento genetico basate sugli incroci, la *tecnologia del DNA ricombinante* – sulla quale si basa l'ingegneria genetica – ha permesso di superare le barriere che limitavano lo spontaneo trasferimento di geni fra organismi non sessualmente compatibili, espandendo notevolmente il numero ed il tipo di specie dalle quali è possibile “pescare” variabilità genica e geni di interesse.

Dal 1983, anno in cui è iniziato lo studio sul processo di trasferimento genico, diversi progressi sono stati fatti nelle tecniche utilizzate dall'ingegneria genetica, che hanno portato all'aumento sia dell'efficienza di trasformazione che della qualità degli OGM ottenuti.

Mentre le prime trasformazioni di piante venivano eseguite “bombardando” tessuti vegetali con particelle microscopiche rivestite col DNA da trasferire, da qualche anno è possibile sfruttare la trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens*.

Il sistema basato sull'Agrobatterio sfrutta le capacità che *naturalmente* possiede questo organismo di infettare le piante e trasferire all'interno delle loro cellule geni batterici. Il trasferimento di questi geni “obbliga” la pianta infettata a sintetizzare specifici zuccheri che il batterio può utilizzare come fonte di nutrimento, ed in pratica grazie a questa trasformazione la pianta può essere utilizzata dal microrganismo come una sorta di “fabbrica metabolica”.



(a)



(b)

Figura 1: (a) Agrobatteri ingranditi al microscopio (b) galla su fusto provocata dall'infezione di *Agrobacterium tumefaciens* e successiva proliferazione delle cellule vegetali

Manipolando il genoma del batterio è stato possibile eliminare le regioni responsabili della sintesi degli zuccheri e rimpiazzare queste regioni con il segmento di DNA di interesse; il batterio conserva così le sua caratteri-

stiche di virulenza nei confronti della pianta da infettare ma trasferisce il “*nostro*” gene di interesse al posto di quelli che sarebbero necessari per la colonizzazione della pianta e l’infezione!

2 Come “preparare” il vettore-agrobatterio?

Attualmente esistono in commercio Agrobatteri già pronti ad accogliere il gene di interesse che facilitano notevolmente il lavoro del biologo molecolare. Ma come fare per *isolare* il gene di interesse da “donare” al batterio?

Ipotizzando di avere già le idee chiare sul gene da trasferire, è necessaria una *amplificazione* preliminare prima di poterlo trasferire all’interno del vettore batterico. Stiamo infatti parlando di frammenti di DNA, cioè molecole che non possiamo vedere e che hanno una dimensione infinitesima rispetto anche solo a quella dello stesso Agrobatterio.

Una delle tecniche di biologia molecolare più diffuse, la *PCR* (Polymerase Chain Reaction), permette di amplificare frammenti di DNA *compresi fra due regioni* da noi scelte. In sostanza si tratta di una reazione di replicazione del DNA *in vitro* del solo “pezzo” di di DNA che ci interessa.

2.1 Amplificazione del gene di interesse: la PCR in breve

Poichè il nostro scopo è amplificare un frammento di DNA, la prima cosa da fare è estrarre il DNA dalla pianta o dall’organismo che contiene nel suo DNA il gene di interesse. Per questa operazione vengono utilizzati composti chimici caratterizzati da una diversa affinità con le molecole presenti nella cellula (proteine, amminoacidi, zuccheri, ecc.) e, senza farla troppo lunga, quello che si ottiene alla fine del processo di estrazione è essenzialmente DNA dissolto in un piccolissimo volume di acqua.

Fra le migliaia di informazioni contenute nel codice genetico, dobbiamo essere capaci quindi di selezionare ed amplificare solo quella di nostro interesse, in modo da poterla poi separare dalle altre.

La reazione di PCR si basa sulle stesse reazioni che hanno luogo anche nelle nostre cellule quando esse si devono replicare; a partire da un filamento di DNA, un enzima (la *DNA polimerasi*) catalizza l’aggiunta di basi azotate (adenina, timina, guanina e citosina) in modo da produrre il *complementare* del filamento, cioè una stringa capace di appaiarsi al filamento stampo tramite complementarietà delle basi azotate (A con T e G con C).

Abbiamo detto in precedenza che la PCR permette di amplificare una porzione di DNA *compresa fra due regioni note*. Poichè la polimerasi sintetizza il nuovo filamento di DNA a partire da un innesco che deve essergli fornito, scegliendo degli inneschi (o *primer*) idonei si può controllare il processo di amplificazione e limitarlo alla sola porzione da noi desiderata.

La scelta di questi inneschi è fondamentale, in quanto la “somministrazione” nella miscela di reazione di inneschi che non sono capaci di appaiarsi

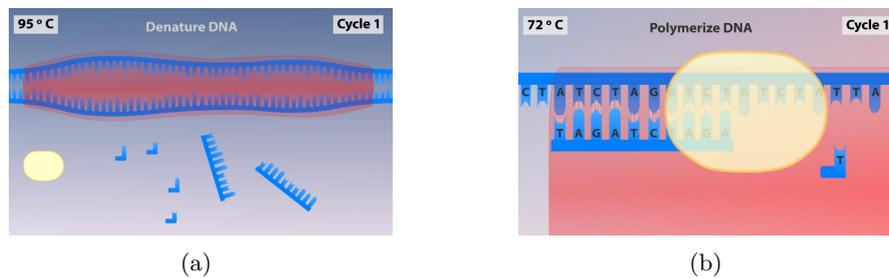


Figura 2: due delle fasi caratterizzanti la PCR (a) separazione del doppio filamento di DNA per produrre singoli filamenti sui quali può agire la DNA polimerasi (b) estensione del filamento di DNA mediato dalla polimerasi, che sintetizza un filamento di DNA complementare per aggiunta di basi azotate complementari a quelle presenti nel filamento stampo

alla regione di DNA scelta non consente la corretta amplificazione del gene desiderato e conduce ad amplificati indesiderati.

Il sequenziamento di alcuni genomi (cioè la conoscenza della composizione in basi di tutto il loro DNA) permette di conoscere a priori la sequenza del gene di nostro interesse, e di conseguenza di andare a somministrare inneschi specifici per il frammento da amplificare. Sottolineamo ancora una volta che la *specificità* degli inneschi è essenziale se non si vuole incorrere in errori di amplificazione.

Una prima verifica che viene effettuata dopo l'amplificazione del gene target è l'analisi del peso molecolare dell'amplificato in modo da evidenziare eventuali errori dovuti ad un appaiamento errato degli inneschi che conduce alla sintesi di un frammento (o parte di esso) diversa da quello atteso. L'analisi del peso molecolare dell'amplificato viene effettuata attraverso una prima separazione del DNA sulla base del peso molecolare, definita *corsa elettroforetica*, seguita da colorazione del DNA e visualizzazione ai raggi ultravioletti. In breve, questa tecnica consente di separare e visualizzare come "bande" frammenti di DNA di uguale peso molecolare, indipendentemente dalla sequenza che li compone (figura 3). Per risalire al peso delle bande visualizzate si ricorre ad una comparazione delle stesse con frammenti di dimensione nota (detti *marker*) che vengono separati anch'essi attraverso elettroforesi; per motivi dovuti al principio di separazione, bande di peso molecolare maggiore saranno localizzate più in alto nell'elettroforesi, mentre quelle di peso molecolare inferiore si troveranno in basso (vedi esempio del marker, figura 3(c)).

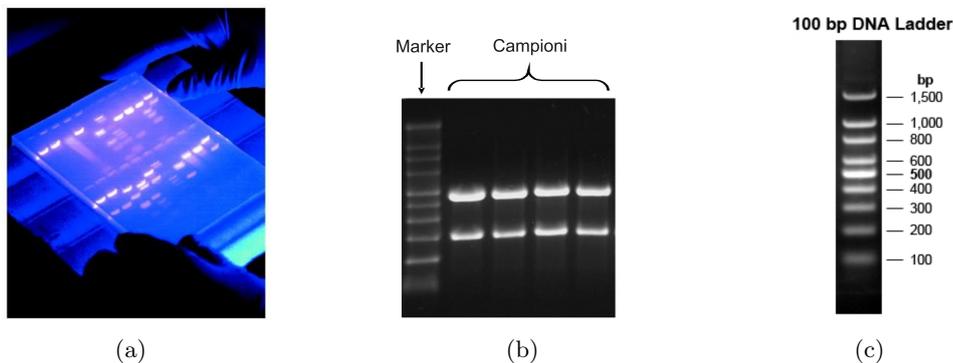


Figura 3: (a) visualizzazione di un gel di agarosio ai raggi ultravioletti; notare la presenza di bande separate di DNA di diverso peso molecolare (b) fotografia di gel elettroforetico in cui è presente il marker con bande di peso molecolare noto (sinistra) e gli amplificati dei campioni (c) esempio di marker utilizzato per la comparazione dei pesi molecolari; notare che la dimensione delle bande (in paia di basi azotate, bp) diminuisce andando verso il basso

2.2 Inserimento del gene prescelto in Agrobatterio

Una volta eseguita la prima verifica del peso molecolare ed ulteriori verifiche (fra cui il *sequenziamento*) per confermare che l'amplificato corrisponda effettivamente al gene desiderato, esso viene “inserito” attraverso vari passaggi in Agrobatterio.

Una volta effettuato la selezione dei batteri che hanno acquisito il gene, vengono prelevati diversi campioni della pianta (es. pezzi di giovani foglioline) e messi a contatto con l'*Agrobacterium* per un lasso di tempo variabile in modo da permettere l'infezione.

Il batterio ingegnerizzato, ancora capace di infettare i tessuti vegetali ma costretto a trasferire alle cellule solo il gene da noi fornito, andrà ad inserire nel genoma della cellula *una o più copie* del gene in posizioni *casuali* del genoma.

Normalmente l'efficienza di trasformazione è molto bassa (circa l'1% degli espianti rigenera un trasformato), ed in aggiunta a questo problema vi sono anche tutte le *variabili* legate all'inserimento del gene estraneo nel genoma della pianta ospite.

Una buona parte del genoma degli eucarioti, infatti, è costituito da *regioni non codificanti*, cioè quelle regioni che non contengono geni trascritti. Se il nostro transgene si inserisse in queste regioni, con grosse probabilità diverrebbe parte del DNA della cellula, ma non sarebbe nè trascritto nè tradotto in proteine, di conseguenza non produrrebbe effetti visibili. Una ulteriore differenza all'interno della popolazione di OGM creati potrebbe

risiedere nel *numero* di copie del gene inserite, con risultati anche molto differenti fra loro nel *fenotipo* (cioè nelle caratteristiche visibili) dei transgenici. In linea di massima, quindi, è bene tener presente che *ogni evento di trasformazione è una storia a sè*, cioè che ogni pianta trasformata può variare anche molto dalle altre piante ottenute con lo stesso procedimento.

Una volta avvenuta l'infezione, il tessuto infettato deve essere ripulito dal batterio e deve essere messo in condizione di poter originare una pianta intera. Il processo di *rigenerazione* di un'intera pianta a partire da un piccolo pezzo di foglia tipico delle piante ed è dovuto al fenomeno della *totipotenza*, cioè alla capacità delle cellule di un tessuto di formare tutti gli altri tipi di tessuti necessari ad originare la pianta intera.

Le tecniche di *coltivazione in vitro* sfruttano proprio questa peculiarità e, a partire dal tessuto infettato dall'Agrobatterio, permettono la formazione dell'apparato radicale e di quello fogliare (vedi esempio di figura 4).



Figura 4: esempio di coltura *in vitro* di tessuti vegetali; notare la formazione delle nuove foglioline alla base dell'espianto. Il processo si basa sulla crescita delle piante su di un substrato artificiale ottimale provvisto di tutti gli elementi nutritivi e gli ormoni necessari.

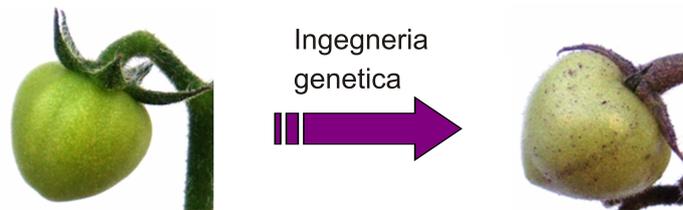
Una volta ottenute le piantine rimane da selezionare (lavoro di *screening*) quelle che sono state effettivamente trasformate ed in particolare quelle che presentano le migliori caratteristiche fenotipiche e metaboliche.

3 L'esperimento tipo: voi cosa fareste?

Quelli che seguono sono i dati ottenuti durante un esperimento di transgenesi in cui l'obiettivo era quello di aumentare il contenuto in pigmenti violacei (gli *antociani*), associati ad effetti benefici sulla salute umana.

In pratica si è andati ad amplificare un gene chiave per la biosintesi di questi metaboliti colorati dalla pianta *Arabidopsis* e si è cercato di ottenere piante di pomodoro che esprimessero questo gene in tutti i tessuti, in modo da ottenere piante caratterizzate da un colore violaceo più o meno uniforme (vedi figura seguente).

In realtà il livello di espressione di un gene *non* è necessariamente proporzionale alle funzioni da esso codificate perchè spesso i sistemi biologici agiscono con *meccanismi di compensazione* che non sono sempre prevedibili.



Quello che dovrete fare voi sarà analizzare le diverse soluzioni proposte e scegliere sulla base di un ragionamento logico quella che più probabilmente conduce ad un risultato. Chiaramente dovrete spiegare anche il perchè delle vostre affermazioni

3.1 Amplificazione

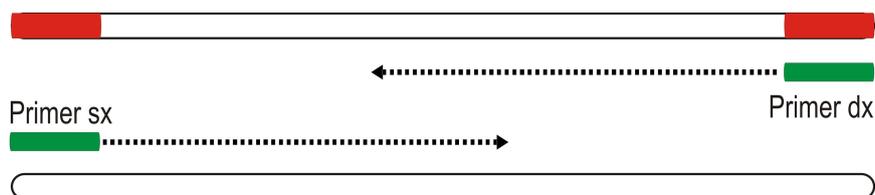
3.1.1 Disegno dei primer

La scelta dei giusti primer (o inneschi) è fondamentale per una corretta amplificazione del segmento target di DNA. Immaginate di aver a disposizione la sequenza del gene da amplificare (qui sotto riportata come singolo filamento. . .) e di dover scegliere la sequenza dei primer che si appaiano alle regioni in grassetto (agli estremi della sequenza). Quale delle coppie di primer riportate sotto scegliereste? Perchè?

```
ATGCATCACCCAGTGCAGGGGATGATCCATCCATCCAGCTGCC  
ACCACCAAAACTGTTGAAATTGGTAAAGTCAAGAGAGATGTACAC  
TGACATGTGTCCGGTACTCCTACTCTGGATTTGTGATTCAAAGT  
TCGTCTCGTCTACTCTATACATATTTTGTATTATTTTGTCTTCTTT  
TATTGTTTCGTCTCCTTTTGAATGTGAACGAATTGGTAGGGATTG  
GTGCCCGCTAATCTAAAGTCAAGAGAGATGTACACTGTACATGTG  
TCCGGTACTCCTACTCTGTATCAATTATAAATAAATCGTGTATTCT  
CCTAATTTGATGGATGGATTCATCAATTCATCATT
```

- | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> A | <input type="checkbox"/> B | <input type="checkbox"/> C |
| ATGCATCTGACAGTG | ATGCATCACCCAGTG | ATGCATCACCCAGTG |
| CATCAATTCATCATT | CATCAATTCATCATT | AATGATGAATTGATG |

Per aiutarvi un pochino potete ragionare sul disegno qui sotto. Le due barre vuote rappresentano i due filamenti complementari di DNA; i primer (destro e sinistro) sono rappresentati dai rettangolini verdi e le sequenze che vi abbiamo fornito sopra in grassetto sono evidenziate in rosso. Le frecce puntate rappresentano la direzione in cui agisce la DNA polimerasi. Per convenzione, le sequenze dei primer fornite sotto sono “lette” nel senso in cui lavora la polimerasi. . . fate attenzione!



3.1.2 PCR

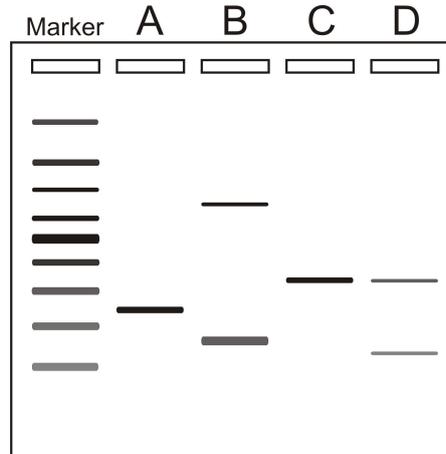
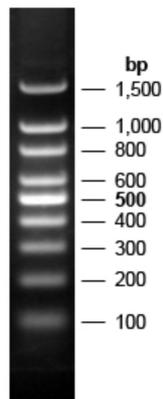
Quelle che seguono sono diverse possibili composizioni della mix di amplificazione, escluso il DNA ed altri cofattori specifici. Marcate la lettera corrispondente alla combinazione che secondo voi potrebbe condurre ad un prodotto di amplificazione e spiegate il perchè della vostra scelta.

- | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> A | <input type="checkbox"/> B | <input type="checkbox"/> C | <input type="checkbox"/> D |
| Primer destro | Primer destro | Primer destro | Primer destro |
| Primer sinistro | DNA polimerasi | RNA polimerasi | Primer sinistro |
| DNA-polimerasi | Basi azotate | Primer sinistro | Basi azotate |
| Amminoacidi | Amminoacidi | Basi azotate | DNA polimerasi |

3.1.3 Analisi dell'amplificato: elettroforesi

Qui sotto sono riportate alcune rappresentazioni grafiche di quanto visualizzato ai raggi ultravioletti durante l'analisi degli amplificati di PCR; quale fra i campioni analizzati (A, B, C o D) corrisponde alla corretta amplificazione del nostro gene (di lunghezza pari a 350 bp)? Sapreste ipotizzare a cosa potrebbero essere dovuti gli errori di amplificazione presenti negli altri campioni? I pesi molecolari delle bande del marker (100 bp DNA Ladder) sono riportati qui sotto.

100 bp DNA Ladder



4 Trasformazione e screening dei transgenici

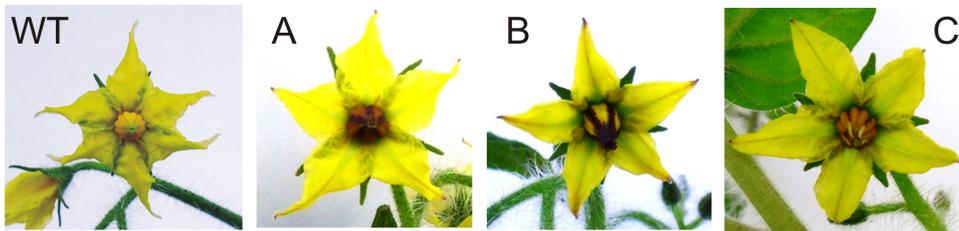
Una volta amplificato e trasferito il nostro gene in Agrobatterio, siamo pronti per la trasformazione: non ci resta che lasciare qualche minuto il nostro Agrobatterio a contatto con la porzione di tessuto vegetale e permettere poi che questa rigeneri l'intera pianta. Il processo di coltura in vitro è molto delicato in quanto gli espianti vegetali, i mezzi di crescita e gli ormoni vegetali somministrati sono tutti sterili: anche una piccolissima contaminazione può inficiare il lavoro di mesi!!! E' per questo motivo che è necessario lavorare in ambienti strettamente controllati, con flussi di aria sterile.

Poniamo che la trasformazione e la rigenerazione degli espianti sia andata a buon fine; quello che dobbiamo fare adesso è selezionare fra le centinaia di trasformati ottenuti quello che si avvicina di più alle caratteristiche da noi desiderate. Come abbiamo detto, infatti, non basta inserire un gene

per ottenere un fenotipo: i sistemi biologici sono regolati da un numero incredibile di variabili!

Qui sotto riportiamo alcune foto dei pomodori transgenici ottenuti nel nostro laboratorio, che ci aspettavamo presentassero un colore violaceo più o meno uniforme in tutte le parti della pianta, fiori compresi. Come potete osservare, nonostante in ogni pianta sia stato inserito lo stesso gene, il fenotipo dei fiori risulta completamente diverso.

Poichè nell'effettuare l'opera di selezione è fondamentale distinguere le caratteristiche di ciascun trasformato, sapreste individuare le differenze fra fiori dei transgenici (A, B, C) e quelli della pianta non trasformata (WT)? Notate delle differenze, oltre che rispetto al controllo, anche fra gli stessi trasformati?



Sulla base di quanto detto finora, sapreste indicare alcune delle possibili cause di tale variabilità?
