

Trasformazione genetica delle piante

Ingegneria genetica delle piante

- Il DNA deve entrare nelle cellule della pianta
- Il DNA deve integrarsi nel genoma (i plasmidi usati non vengono duplicati con le divisioni cellulari)
- Le proteine codificate dal DNA integrato devono esprimersi nelle parti volute della pianta

- In teoria la **trasformazione genetica** offre l'opportunità di introdurre geni di qualunque origine nelle cellule vegetali. Queste cellule vengono, quindi, rigenerate producendo **piante transgeniche** che contengono ed esprimono la nuova informazione genetica.
- La maggior parte delle piante transgeniche viene generata usando due metodi generali che sono:

1) La trasformazione mediata da

Agrobacterium

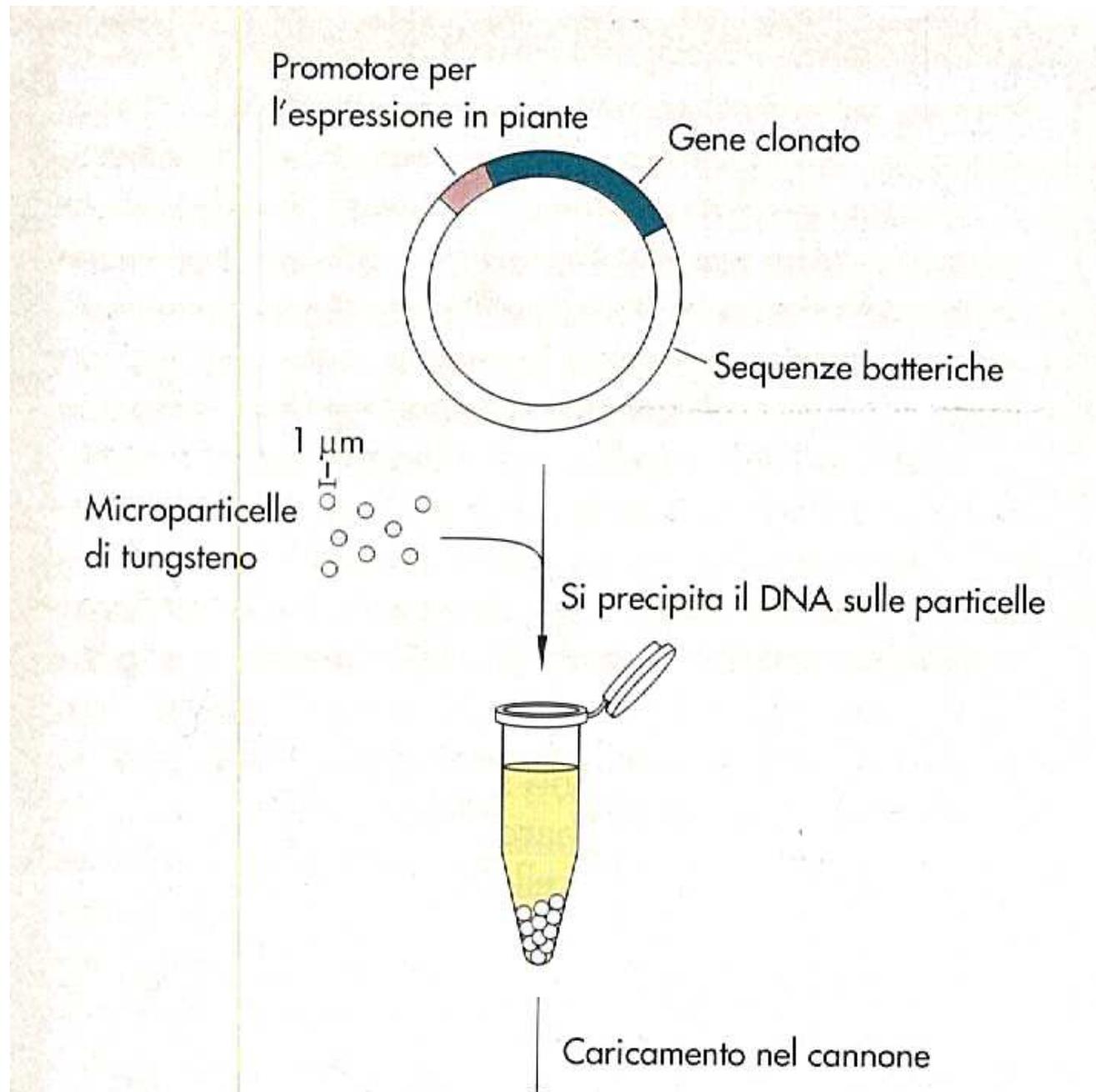
2) La trasformazione diretta con DNA

(tecniche biolistiche, elettroporazione, permeabilizzazione di protoplasti mediata da PEG)

Cannoncino biolistico ("gene gun")

Particelle metalliche
microscopiche
ricoperte di DNA e
sparate ad alta
pressione direttamente
nelle cellule

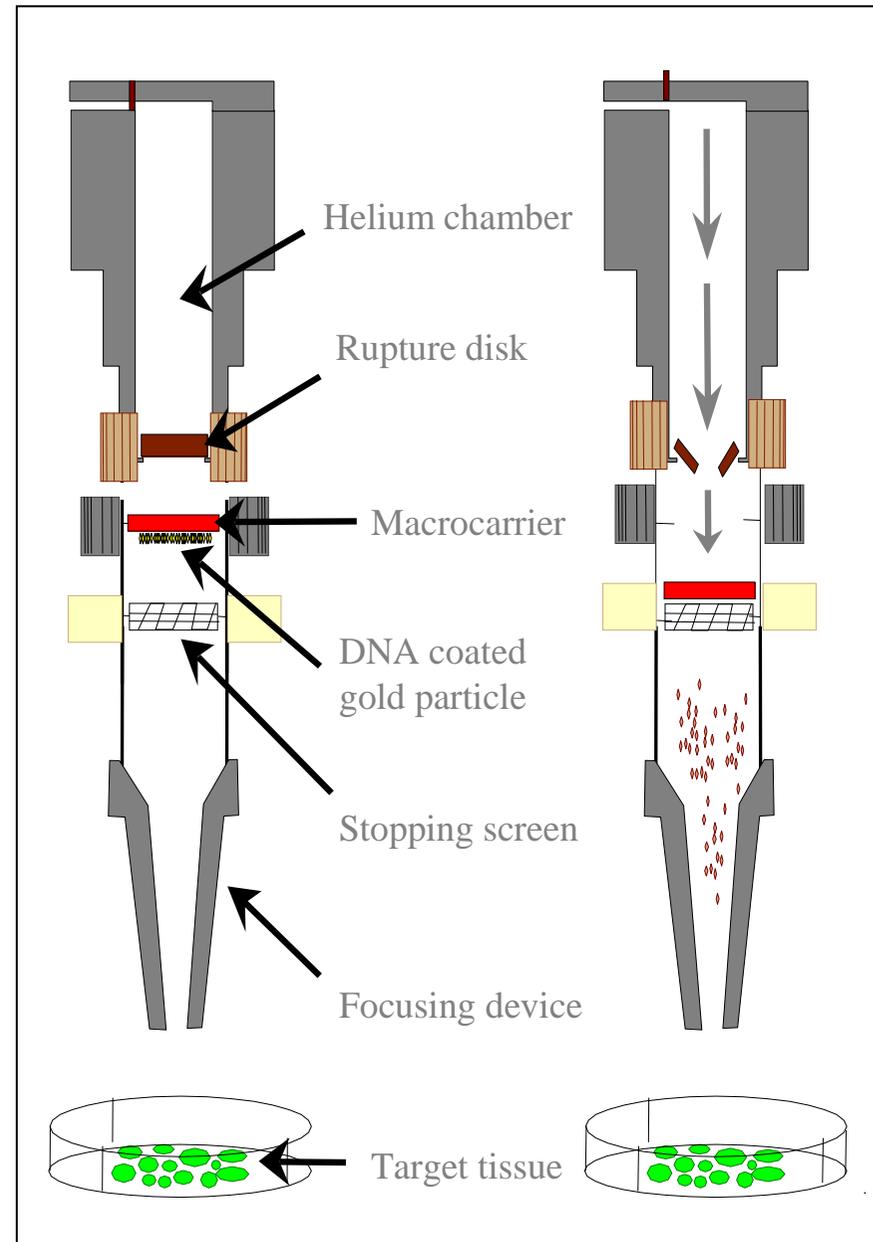




Cannoncino biolístico ("gene gun")



PDS1000 Microparticle Delivery System



Agrobacterium tumefaciens

- Batterio del suolo
- Infetta piante attraverso ferite
- Causa galle o tumori del colletto
- La formazione di tumori dipende dalla presenza di un plasmide, detto **plasmide Ti** ("Tumor-inducing")



Agrobacterium tumefaciens

- batterio Gram-negativo del suolo che è in grado di infettare numerose piante dicotiledoni, inducendo, in corrispondenza di una lesione, caratteristiche alterazioni morfologiche e differenziali, tumorali, come:

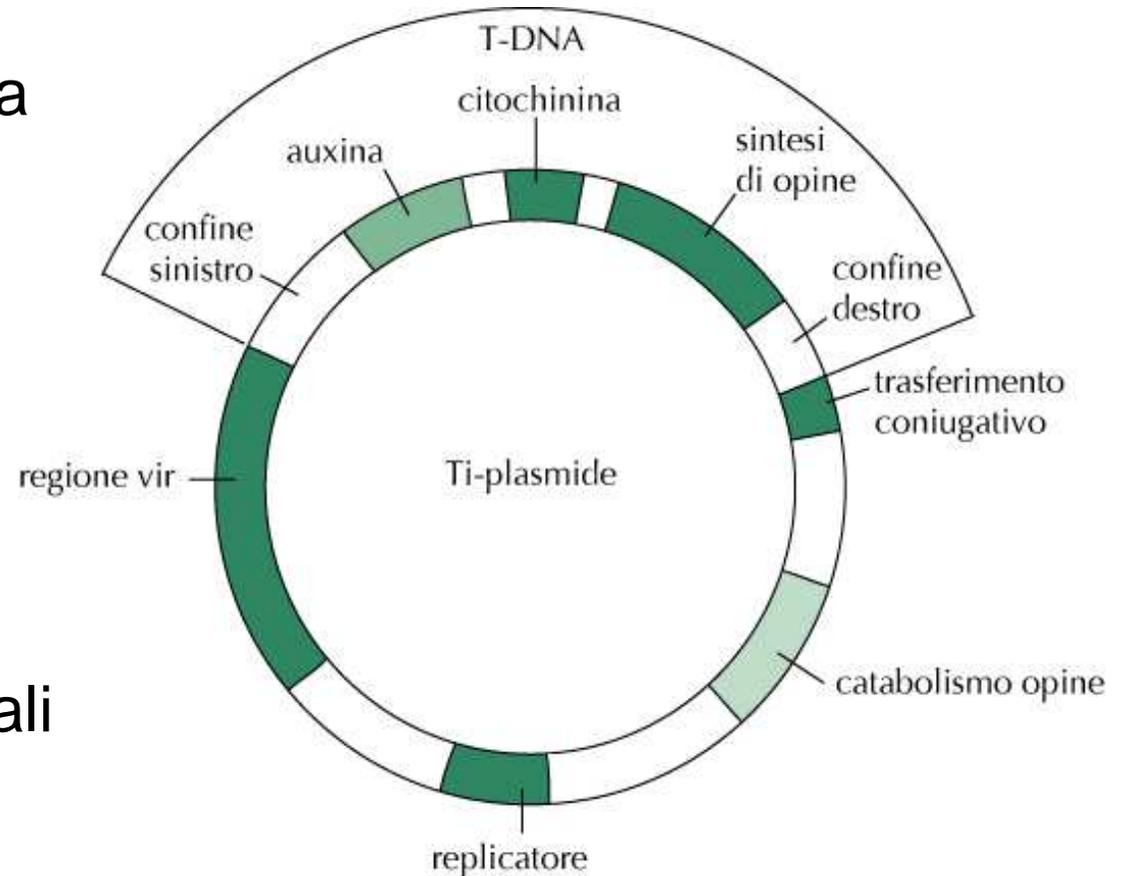
- “crown gall” o galla del colletto

- La virulenza di questi ceppi è associata alla presenza di un grosso plasmide, chiamato:

- Ti (“Tumor inducing”) - *A. tumefaciens*

Plasmide Ti

- Tutto il DNA compreso tra i bordi L (left) ed R (right) viene trasferito alla pianta
- I geni sul T-DNA sono necessari per la sintesi di opine (aminoacidi non proteici) e di ormoni vegetali (auxine e citochinine)



La sindrome "crown gall"

L'analisi molecolare del T-DNA integrato nelle cellule vegetali ha rivelato sempre la presenza di almeno tre classi di geni:

- geni che codificano per l'ormone vegetale auxina
- il gene che codifica per l'ormone vegetale citochinina
- uno o più geni che sintetizzano degli inusitati zuccheri coniugati ad aminoacidi detti opine

La sindrome "crown gall"

I fitormoni auxina e citochinina sono sintetizzati utilizzando vie metaboliche di origine batterica. L'IAA è sintetizzata dai geni *IaaM* e *IaaH* che codificano per la triptofano mono-ossigenasi e per la 3-indol acetamide idrolasi, mentre la CK è sintetizzata dal gene *ipt* che codifica per la isopentenil-transferasi.

La presenza di queste attività enzimatiche permette la proliferazione delle cellule trasformate (e la proprietà delle cellule in coltura di crescere in vitro senza ormoni).

La sindrome "crown gall"

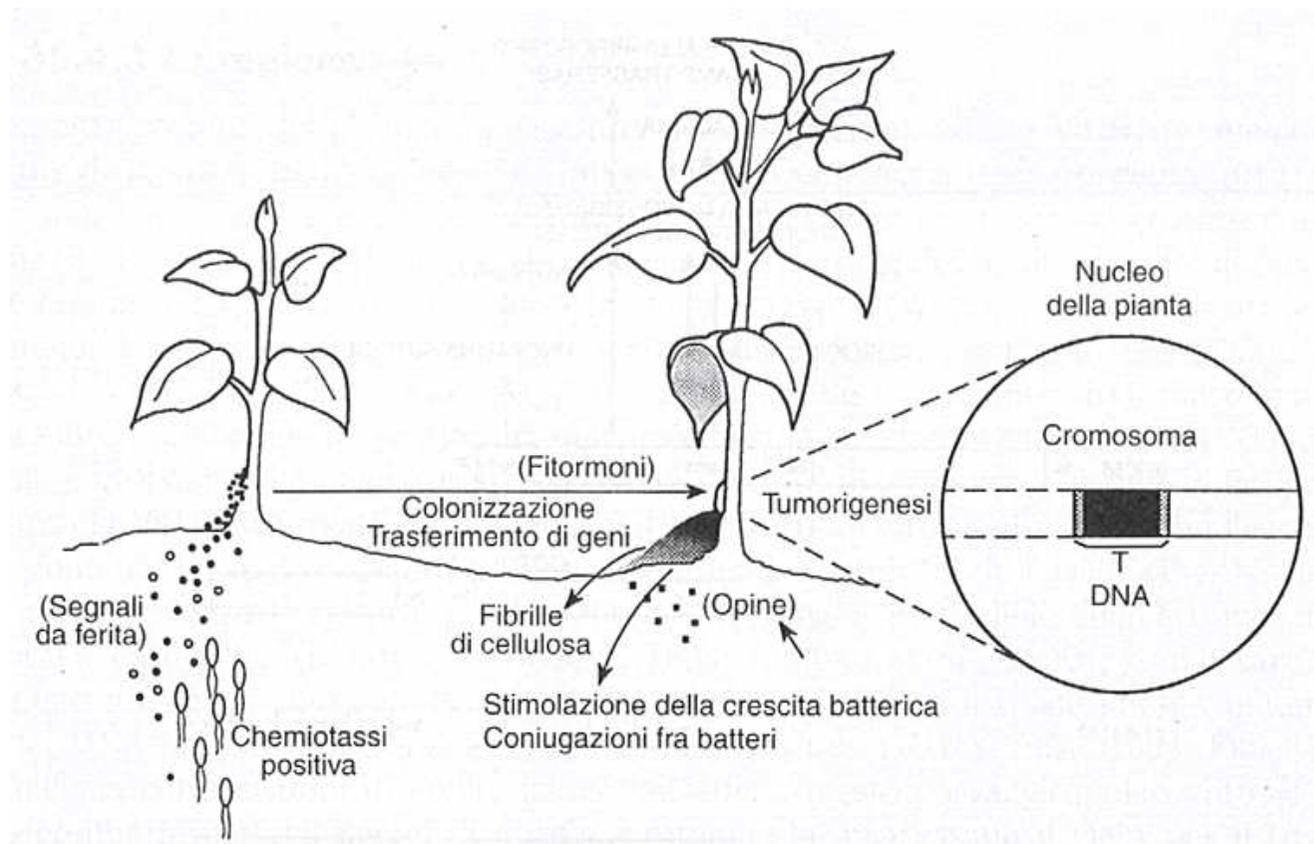
Le cellule trasformate sintetizzano anche le **opine**, aminoacidi non proteici che solo gli Agrobatteri utilizzano come fonte di energia

- Ceppi avirulenti non possegono il plasmide Ti; tuttavia se questo plasmide viene trasferito nei ceppi avirulenti per coniugazione o trasformazione, questi ceppi diventano virulenti.

- La formazione del tumore è dovuta alla trasformazione della cellula vegetale:

un frammento di DNA batterico (T-DNA) viene trasferito dal batterio alla cellula vegetale e si integra STABILMENTE nel genoma della pianta, inducendo nelle piante infettate le caratteristiche modificazioni morfologiche e differenziative.

La trasformazione genica delle piante mediata da *Agrobacterium* è un processo che avviene in natura



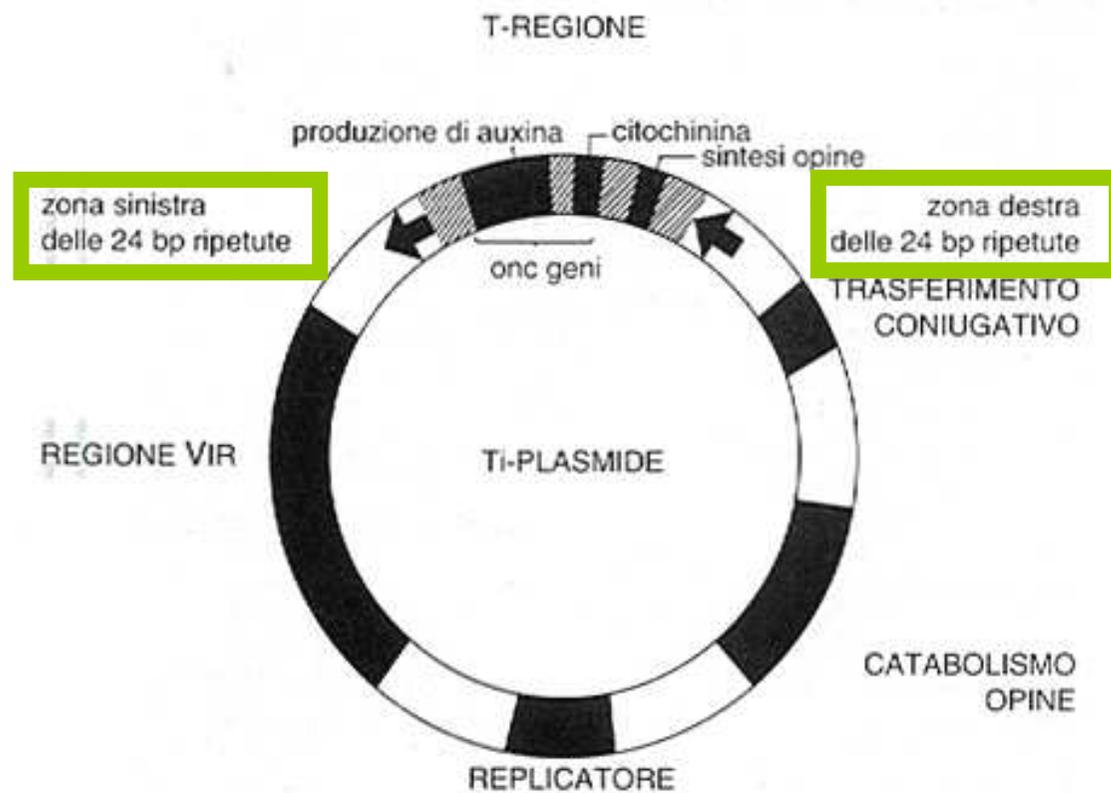
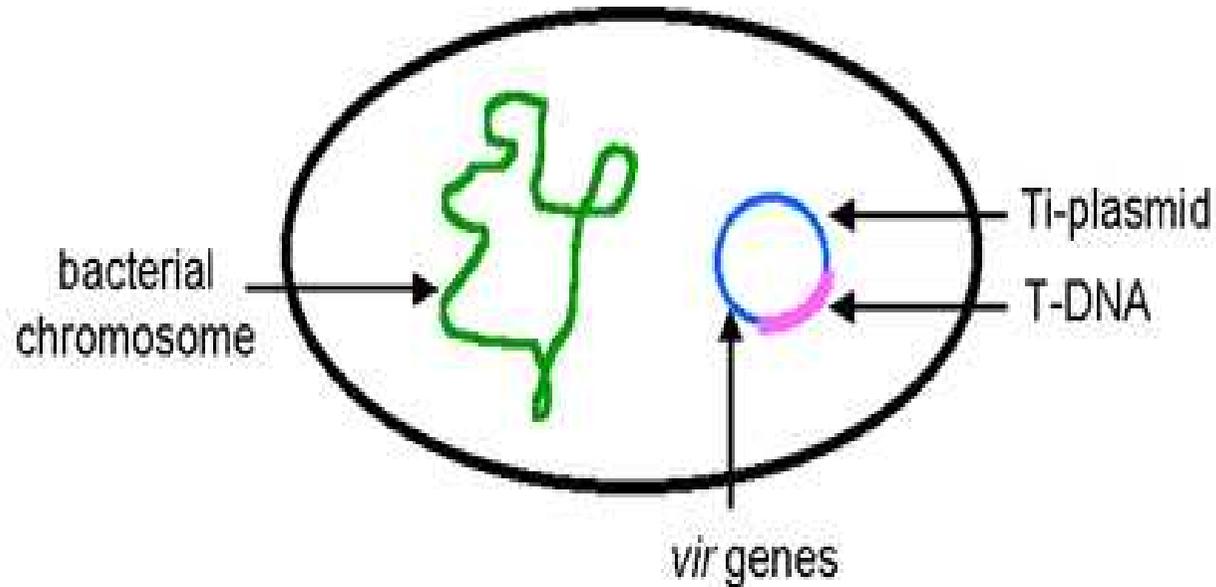


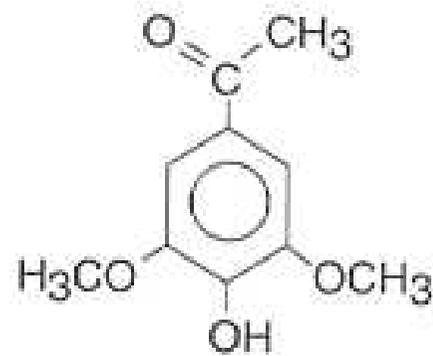
Fig. 12.4. Rappresentazione delle diverse aree che costituiscono il plasmide Ti. (Modificato da L. S. Melchers e P. J. J. Hooykaas, 1987).

Biologia di *A. tumefaciens*

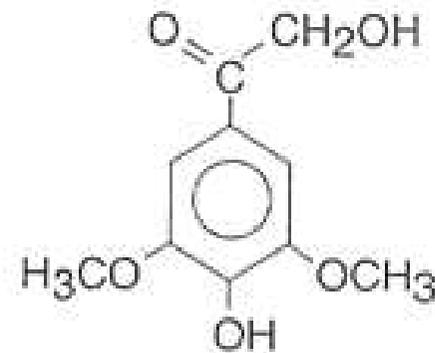


Il plasmide Ti contiene:

- **T-DNA** = sequenza che si integra nel genoma della pianta
- **geni di virulenza** => proteine che servono per la mobilizzazione del T-DNA



acetosiringone

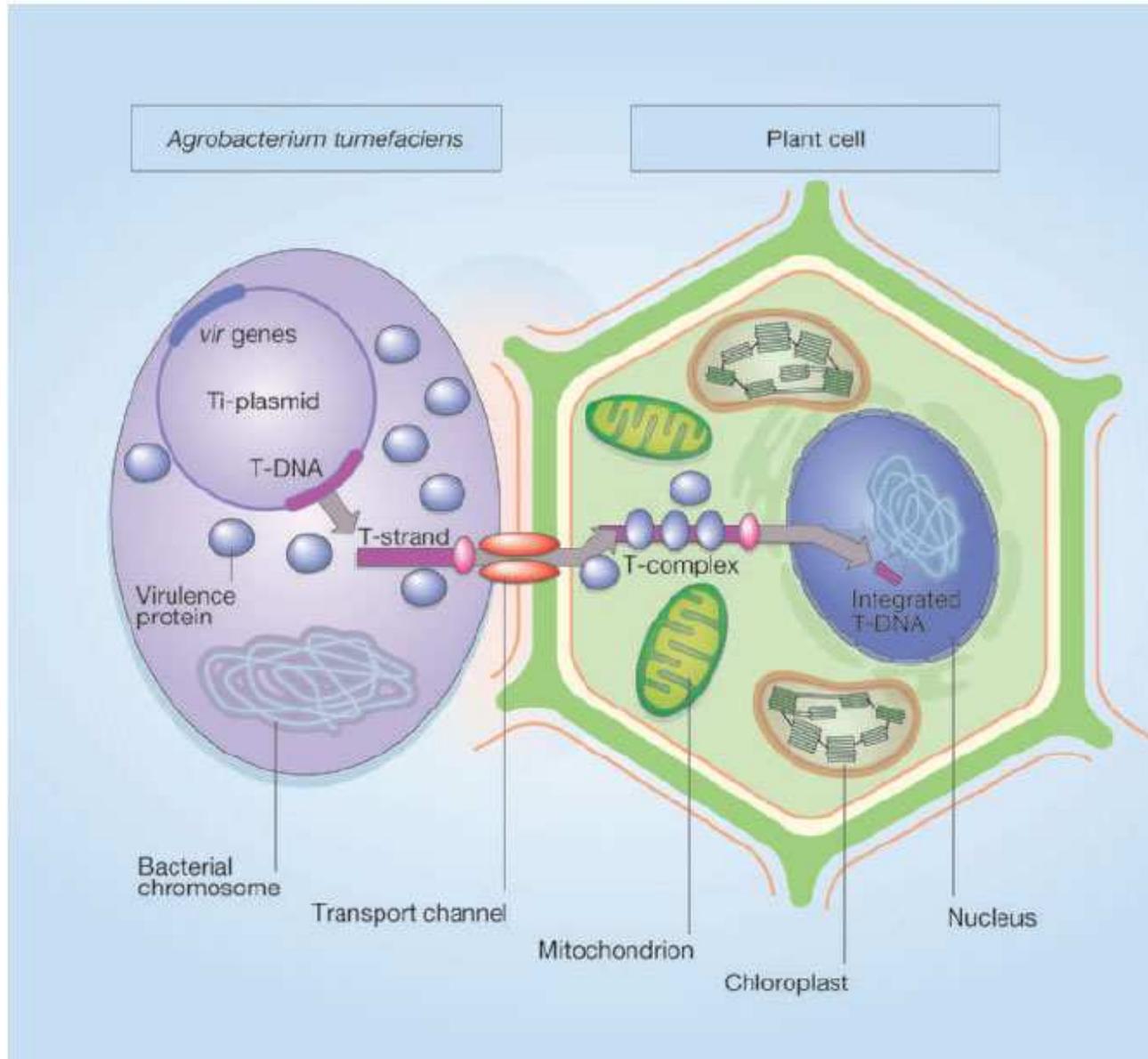


α -idrossiacetosiringone

Fig. 12.6. Formule strutturali delle molecole che inducono i geni *vir*.

lenza (fig. 12.5). Per questo loro ruolo essenziale sono definite come sequenze *cis*-attivanti. Nel tessuto tumorale i geni portati dal T-DNA sono responsabili dell'oncogenicit  (geni *onc*) e della sintesi delle auxine e delle citochinine. Nel T-DNA sono anche compresi i geni che controllano la sintesi delle opine.

Trasformazione di cellule vegetali da parte di *A. tumefaciens*

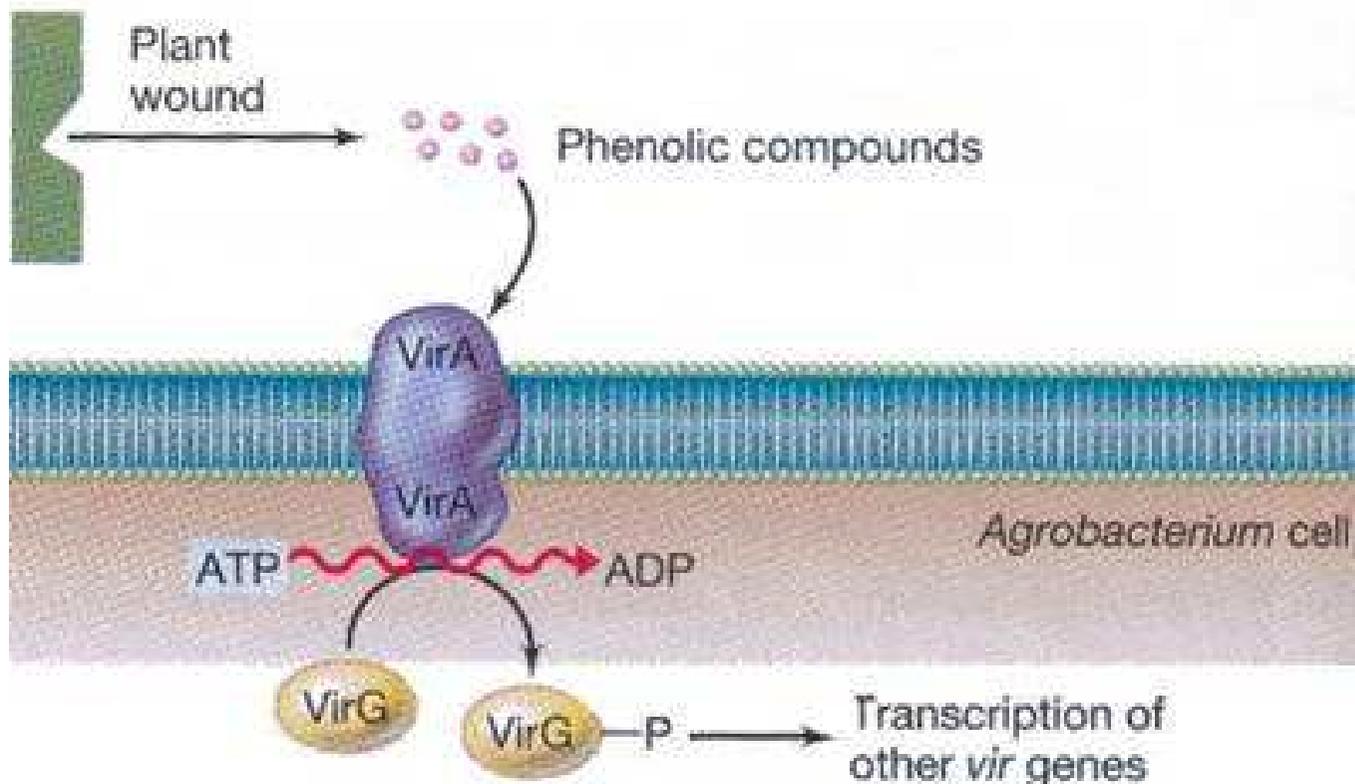


Il meccanismo del trasferimento del T-DNA

contatto cellulare mediato dalla interazione di proteine batteriche di adesione superficiale (prodotti dai geni **chv**) con specifici recettori della cellula vegetale (proteine simili alla vitronectina).

Il sistema di percezione-trasduzione del segnale utilizzato da *Agrobacterium*

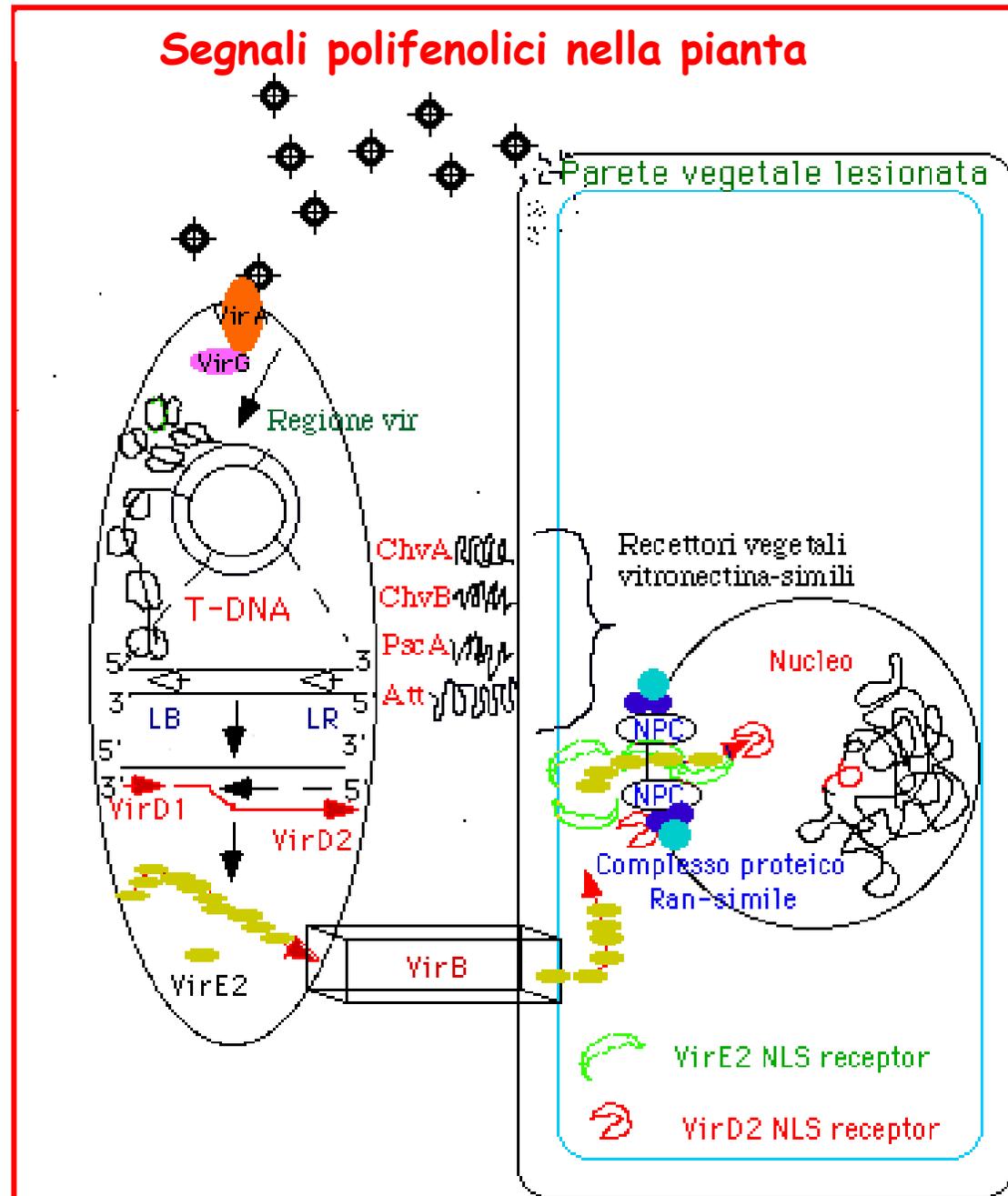
- classe di regolatori batterici a due componenti in cui una **istidina chinasi recettoriale (VirA)**, dopo aver percepito il segnale specifico (**acetosiringone**), si autofosforila e trasferisce un residuo fosfato ad un secondo componente indipendente attivandone le proprietà di attivatore trascrizionale (**VirG**). In seguito all'attivazione di VirG questi attiva tutti i geni vir legandosi a specifiche **Vir box** presenti sui loro promotori.



- L'induzione dei geni vir induce la formazione di una copia a singolo filamento del T-DNA, **T-strand**.
- Il T-strand, complementare al filamento codificante del T-DNA, si forma ad opera di due endonucleasi specifiche rispettivamente per LB e RB: **VirD1** e **VirD2**. Le due endonucleasi rimangono attaccate all'estremità 5' del filamento.
- In seguito alla **ricostituzione del filamento complementare del T-DNA**, ad opera del sistema di riparo della cellula batterica, si excide un filamento a singola elica del T-DNA con la proteina **VirD2** attaccata all'estremità 5' che le conferisce una polarità distinta.

- Il T-strand viene immediatamente ricoperta da **ss-DNA binding proteins** codificate da **VirE** che proteggono il T-strand dall'attacco di proteasi e gli conferiscono una forma bastoncellare che ne facilita la fuoriuscita dalla cellula batterica e l'ingresso in quella vegetale, utilizzando un **canale** e un **pilus** formati dall'assemblaggio di numerose proteine codificate dal locus **VirB**.
- L'intero processo di attraversamento del canale richiede energia probabilmente fornita dall'attività **ATPasica** di **VirB4** e/o **VirB11**

• La traslocazione del complesso-T al nucleo sembra essere mediato sia da **VirD2** che da **VirE2**. Entrambe le proteine, infatti, presentano **Nuclear Localization Signals (NLS)** funzionali. Dopo aver raggiunto la membrana nucleare, il complesso-T entra nel nucleo e, una volta dentro il nucleo, il T-strand si integra casualmente nel genoma vegetale con un meccanismo in gran parte sconosciuto, che sicuramente coinvolge numerose proteine vegetali e, forse, **VirD2 e VirE2**.



Dai plasmidi Ti vengono derivati vettori di trasferimento in cellule vegetali

- I plasmidi Ti e Ri non sono adatti ad essere usati come vettori di trasferimento, perché:
 - sono troppo grandi
 - non hanno siti di restrizione adatti per i clonaggi molecolari
 - inducono tumori vegetali non rigenerabili come piante fertili.
- L'analisi molecolare dei plasmidi Ti ha dimostrato che, mentre **RB e LB sono essenziali per il trasferimento del T-DNA**, paradossalmente il T-DNA stesso non lo è.
- E' stato dimostrato sperimentalmente che qualunque sequenza di DNA inclusa tra le border repeats (LB e RB) viene trasferita nelle cellule vegetali dall'apparato di trasferimento di *Agrobacterium*

Modificazione del plasmide Ti

- Vengono rimossi i geni vir
- Dal T-DNA vengono rimossi i geni che codificano per enzimi della biosintesi di ormoni ed opine
- I bordi L ed R sono mantenuti
- Il DNA da integrare nel genoma della pianta viene inserito tra i bordi L ed R
- Viene anche inserito nel T-DNA un **marcatore di selezione** (es. resistenza a kanamicina)
- Richiesto anche un altro plasmide, che contiene i geni vir ma non il T-DNA (**plasmide helper**)

Cassetta di trasformazione



-> tra i bordi L ed R del T-DNA

Contiene:

1. Gene d'interesse

- Regione codificante e sequenze regolatrici

2. Marcatore di selezione

- Distingue i trasformanti dai non trasformanti

3. Sequenze di inserzione

- Favoriscono l'inserzione da parte di Agrobacterium

Gene di interesse



Promotore: controlla dove, quando e quanto un gene è espresso.

Es.:

- promotore del gene **35S di CaMV** (Cauliflower Mosaic Virus)
-> alta espressione in tutti i tessuti
- promotore della glutelina 1 di riso: espressione solo in semi in via di sviluppo

SS= Sequenza segnale: indirizza la proteina verso la corretta localizzazione subcellulare.

Es.: sequenza segnale di RbCS (RUBISCO small subunit) -> cloroplasto

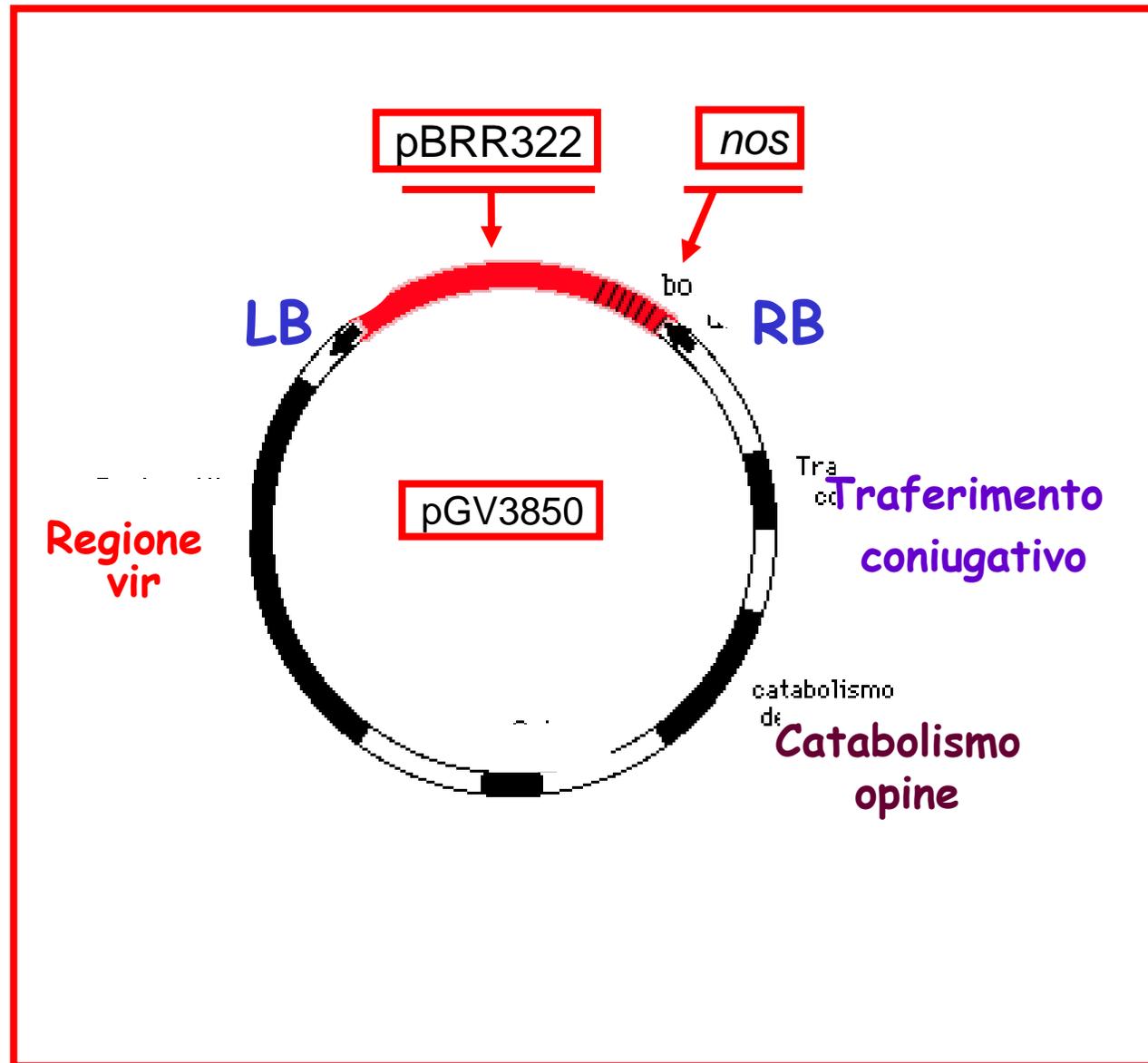
Regione codificante: codifica il prodotto proteico del gene.

Evoluzione dei vettori di trasferimento vegetale

Le principali modifiche consistono in:

- Origini di replicazione a più alto numero di copie
- Repliconi più stabili
- Dimensioni più piccole
- Polilinker più grandi e maggior numero di siti unici per enzimi di restrizione
- Maggior numero di possibili marcatori di selezione
- Possibilità di utilizzare diversi geni reporter (GUS, GFP, YFP, Luc)
- Vettori completamente sequenziati

Un vettore Ti disarmato (non oncogenico)



Trasformazione con *Agrobacterium*: Tipi di Vettori

Vettori Binari:

Il T-DNA e la regione vir risiedono in **plasmidi separati** all'interno dello **stesso ceppo** di *Agrobacterium*.

La regione del T-DNA è limitata al LB e RB.

Vettori co-integrati:

Derivano dalla **ricombinazione** tra un piccolo vettore plasmidico (es: di *E. coli*) che porta i geni marcatore e d'interesse e un plasmide Ti disarmato.

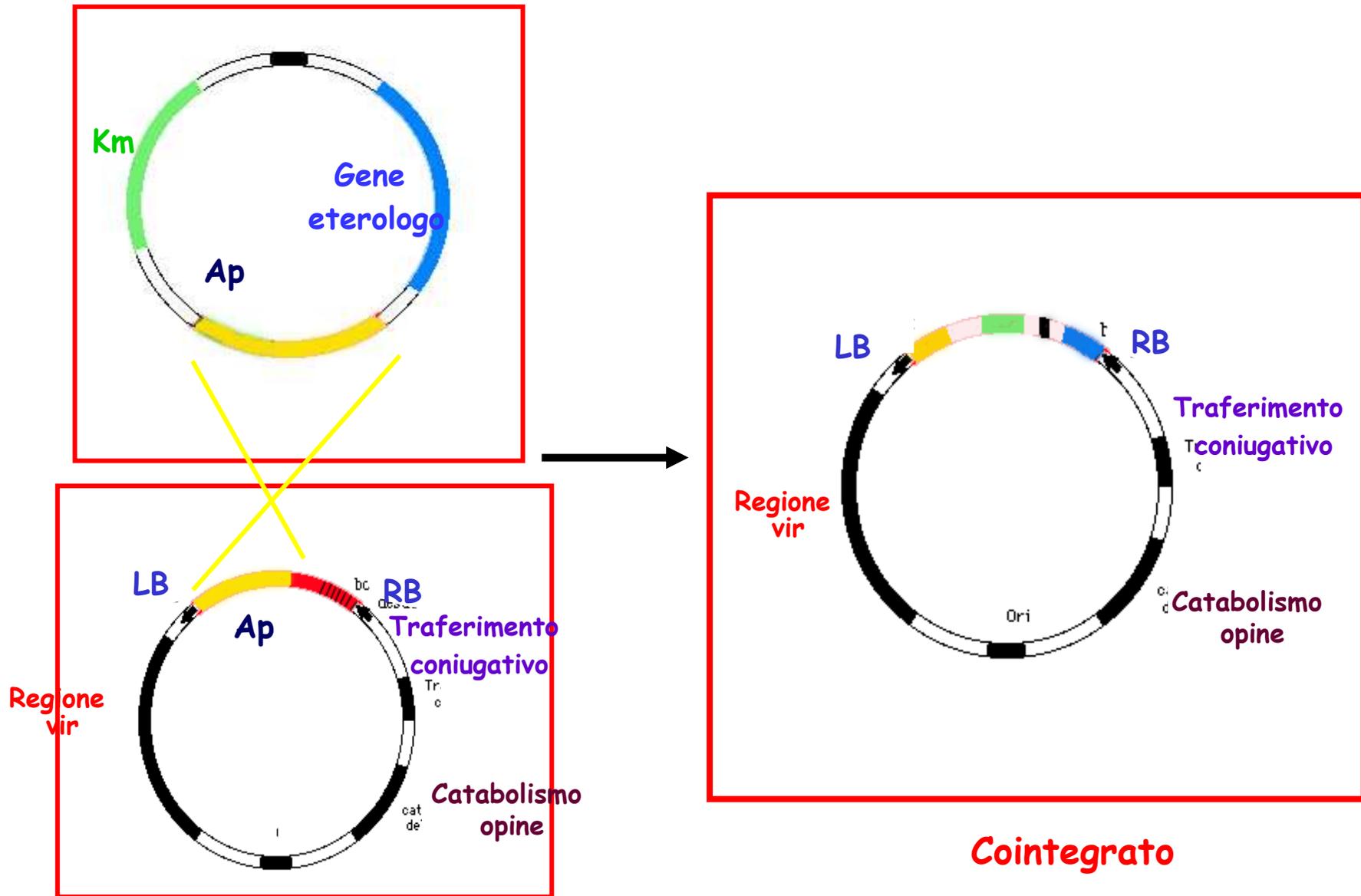
La ricombinazione avviene attraverso una regione omologa presente in entrambi i plasmidi.

Trasformazione con *Agrobacterium*: Vettori co-integrati

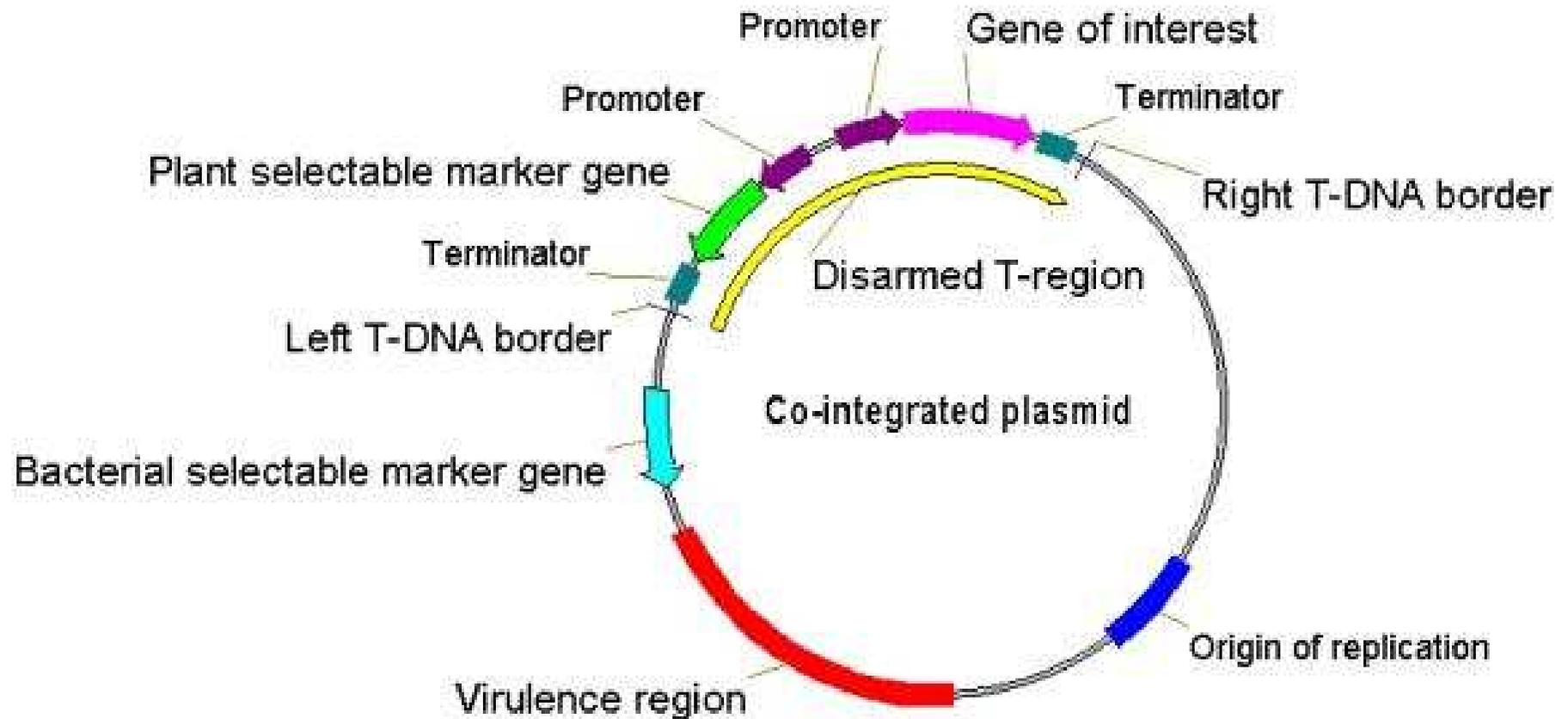
Questi vettori derivano dalla combinazioni di 3 vettori:

- Plasmide Ti disarmato. Il T-DNA è sostituito da DNA esogeno
- Vettore intermedio. Sono plasmidi basati sul pBR322 e contenenti il T-DNA. Vengono utilizzati per superare i problemi derivanti dalle grandi dimensioni del plasmide Ti e dalla mancanza di siti di restrizione. Vengono replicati in *E. coli* e trasferiti ad *A. tumefaciens* mediante coniugazione. Non si possono replicare in *A. tumefaciens* e trasportano segmenti di DNA omologo al Ti disarmato per consentire la ricombinazione e formare una struttura di T-DNA co-integrata.
- Vettore helper. Sono plasmidi mantenuti in *E. coli* e che contengono i geni di trasferimento (*tra*) e mobilitazione (*mob*) che consentono il trasferimento dei vettori intermedi in *A. tumefaciens*.

Trasferimento genico per ricombinazione omologa e cointegrazione



Trasformazione con *Agrobacterium*: Vettori co-integrati



Trasformazione con *Agrobacterium*: Vettori co-integrati

Possibili svantaggi:

- Richiede estese regioni di omologia tra il Ti e il plasmide di *E.coli*
-
- Trasferimento genico meno efficiente rispetto ai vettori binari

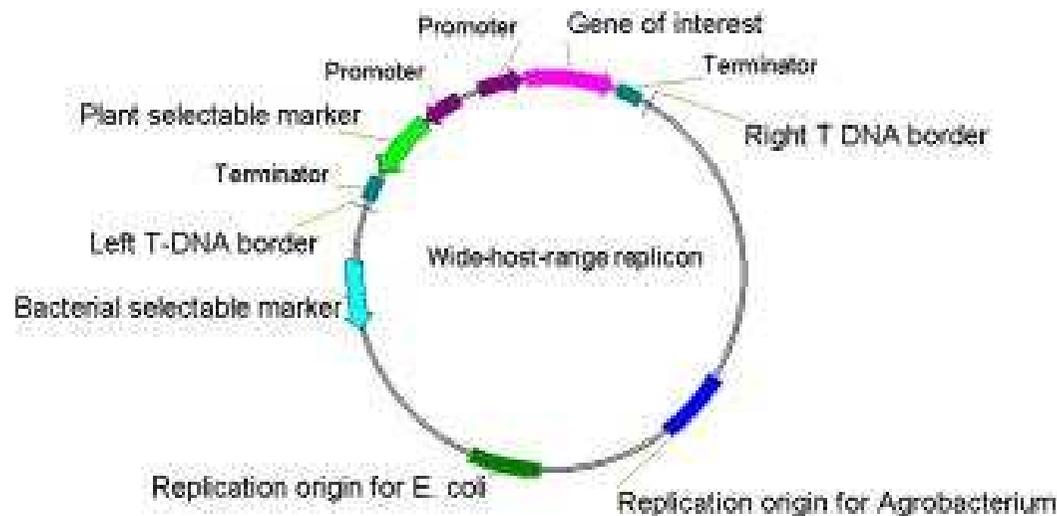
I vettori binari

- I vettori binari sfruttando la capacità dei geni vir di agire *in trans* utilizzano due vettori separati:
- uno contenente solo i geni **vir**, generalmente residente in un *Agrobacterium tumefaciens* "disarmato"
- un altro contenente essenzialmente i due border repeats, un polilinker e un marker di selezione.

Trasformazione con *Agrobacterium*: Vettori Binari

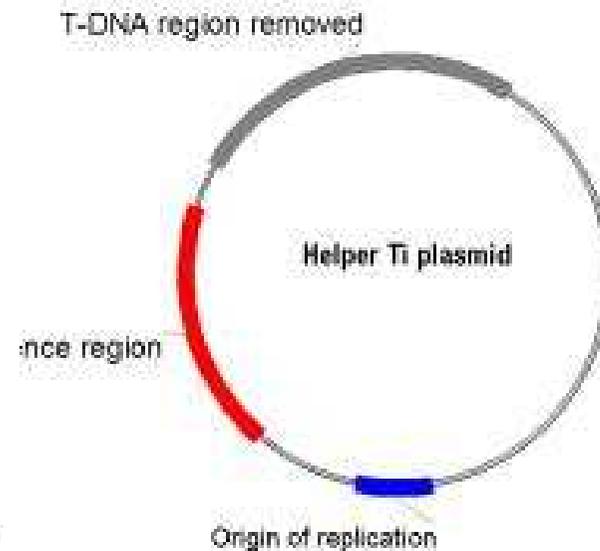
A) piccolo plasmide ad ampio spettro d'ospite:

- DNA di interesse al posto del T-DNA
- LB e RB
- Marcatori per la selezione e mantenimento in *E. coli* e *A. tumefaciens*
- Marcatore di selezione per le piante



B) Plasmide Ti helper

- Privo del T-DNA
- Contiene i geni Vir



Trasformazione con Agrobacterium: Vettori Binari

In generale la procedura di trasformazione è la seguente:

- Inserimento del gene di interesse nel plasmide piccolo
- Trasferimento di questo in Agrobacterium contenente il plasmide Ti helper
- Co-coltivazione del tessuto o cellule vegetali con Agrobacterium, per consentire il trasferimento del T-DNA
- Selezione delle cellule trasformate

Trasformazione con *Agrobacterium*: Vettori Binari

Possibili svantaggi:

Possibile instabilità del plasmide ad ampio spettro d'ospite, dovuto alla contemporanea presenza delle origini di replicazione per *E. coli* e *A. tumefaciens*

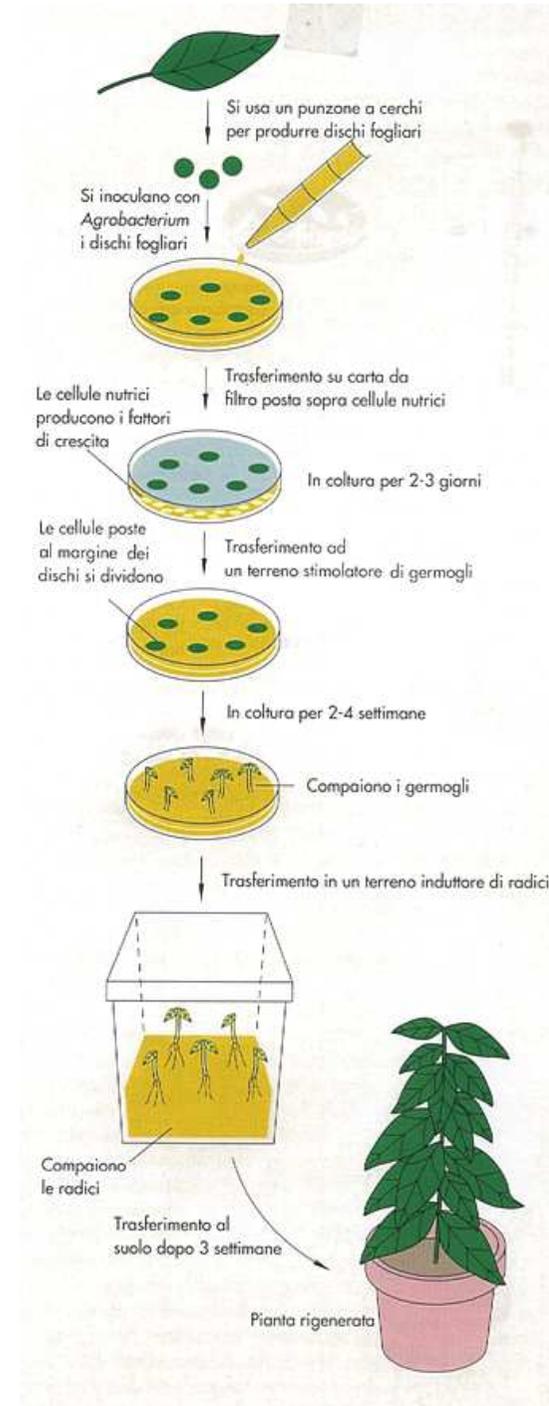
Rispetto ai vettori co-integrati presenta diversi vantaggi:

- Non richiede ricombinazione tra le molecole implicate
- Utilizza vettori di dimensioni piccole molto più efficienti dei grandi plasmidi Ti disarmati nel trasferimento da *E. coli* ad *A. tumefaciens*

La **totipotenza** delle cellule è alla base della possibilità di ottenere piante transgeniche

- Nelle piante cellule di qualunque tessuto possono rigenerare una pianta intera
- *in vitro* variando il rapporto di auxina e citochinina, due ormoni vegetali che regolano proliferazione e differenziamento, si ottengono
 - CALLI
 - GERMOGLI
 - RADICI

Trasformazione di espianti fogliari con Agrobacterium e rigenerazione delle piante



Effetto del marcatore di selezione

Non transgenico = *manca il marcatore*

La pianta muore in presenza di composti chimici selettivi (es. antibiotici)



Transgenico = *ha il marcatore*

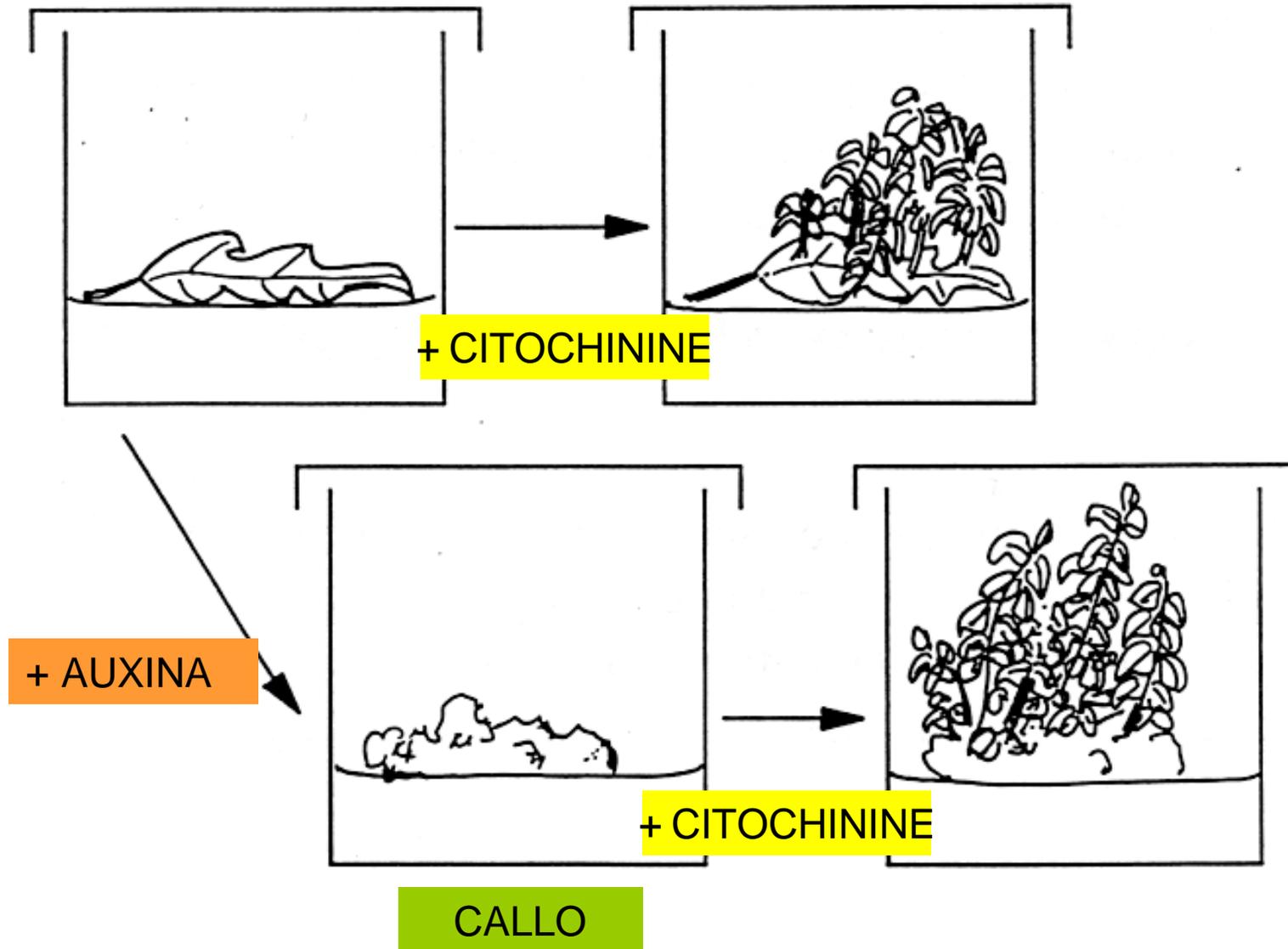
La pianta cresce in presenza di composto selettivo



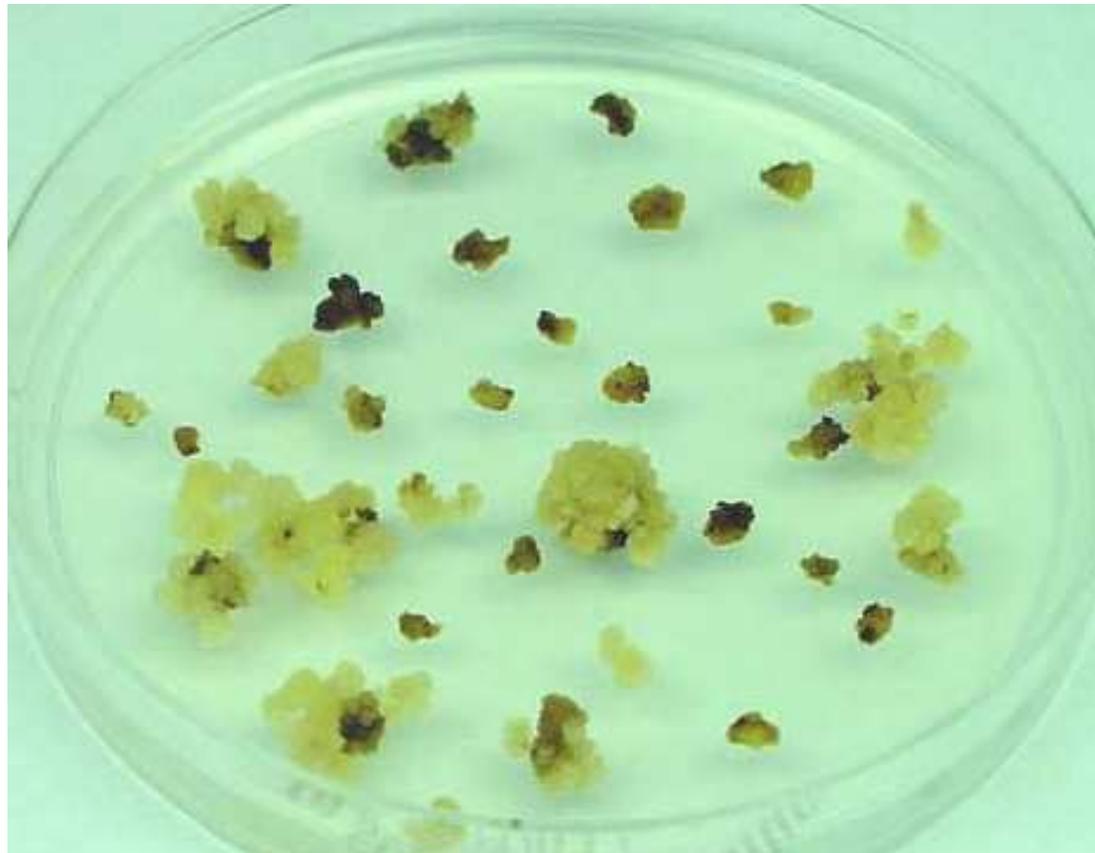


Infezione di dischetti di tessuto fogliare con *Agrobacterium* -> dopo un certo tempo, i batteri sono uccisi con un antibiotico

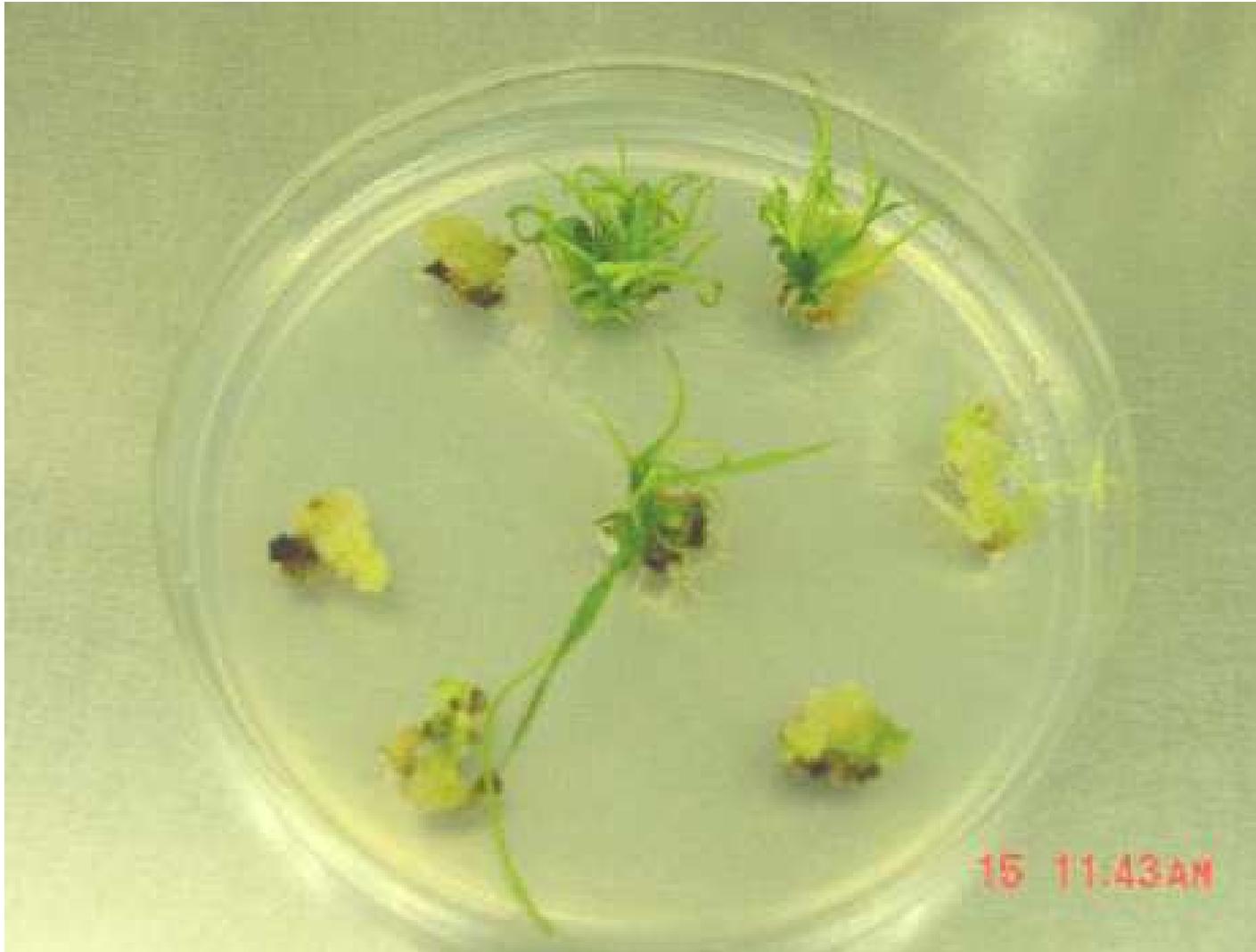
Il tessuto trasformato con il T-DNA viene messo in coltura in presenza di ormoni (-> formazione di calli = tessuto indifferenziato) e di kanamicina



Solo le cellule trasformate danno origine a calli resistenti all'antibiotico -> trasformanti primari



Rigenerazione di piantine da calli trasformati -> se il transgene si è integrato stabilmente nel genoma, viene trasmesso alla progenie -> linea transgenica



Trasformazione di Arabidopsis tramite “floral dip”



Prove in campo

-> efficacia del transgene in condizioni naturali

Resistenza ad erbicidi



Non-transgenico

Transgenico

Metodi alternativi di trasferimento genico vegetale: elettroporazione

- E' possibile trasformare specie monocotiledoni con *Agrobacterium* ma, in generale l'efficienza è molto bassa, dunque, nonostante l'interesse agronomica di molte specie monocotiledoni, l'uso di *Agrobacterium* non è consigliabile.

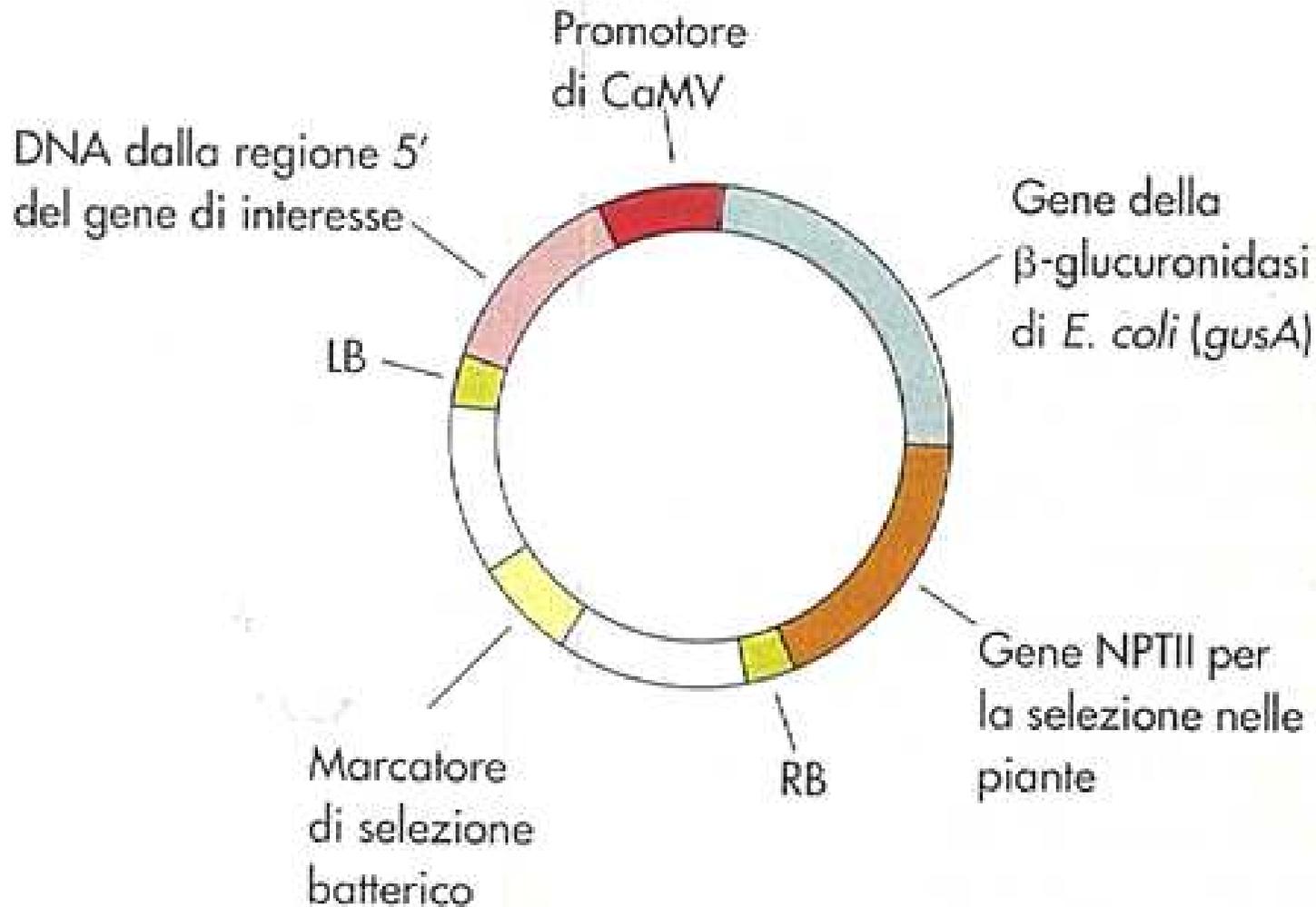
- Un metodo possibile, ma poco efficiente, consiste nell'ottenere protoplasti per poi trattarli sostanzialmente come cellule di mammifero trattandole, per esempio, con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Un modo per superare questo ostacolo consiste nell'introduzione diretta del DNA nelle cellule vegetali usando metodi fisico-chimici, piuttosto che biologici.

- Il metodo più efficace è l'elettroporazione a partire da protoplasti. Un' alta concentrazione di DNA plasmidico contenente il gene di interesse viene mescolata a una sospensione di protoplasti e sottoposti per pochi secondi ad un intenso campo elettrico dell'ordine di 250-500 V/cm.

- Efficienze di trasformazione tra lo 0,1 e l'1% x protoplasti di riso e di mais

Analisi dell'espressione genica mediante l'uso di geni reporter



Le piante sono sensibili a fattori ambientali

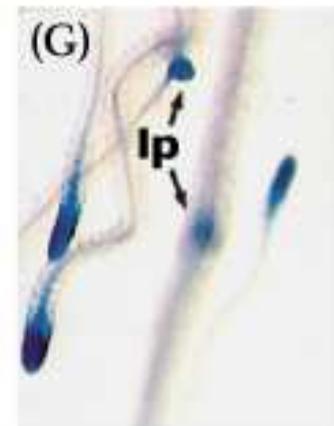
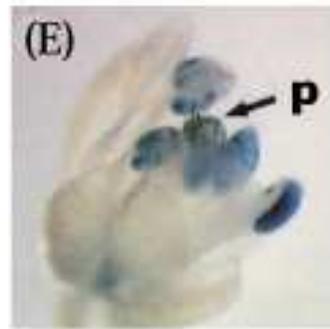
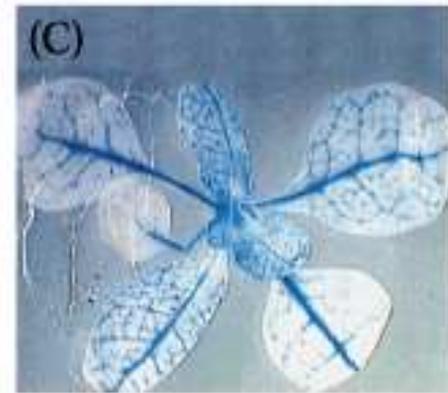
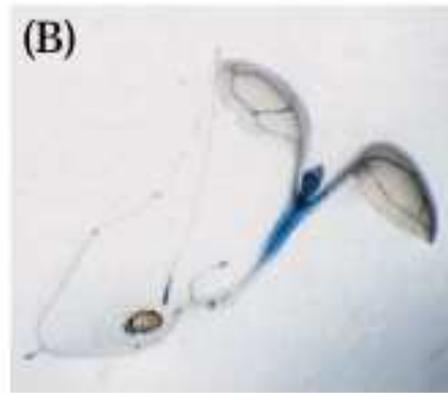
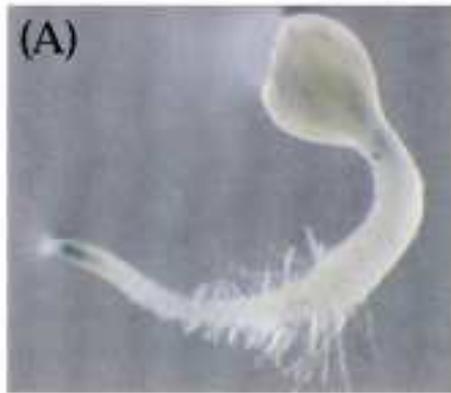
Questi fattori inducono cambiamenti dell'espressione genica (analisi quantitativa e tissutale)

- Geni reporter per analizzare il controllo dell'espressione genica

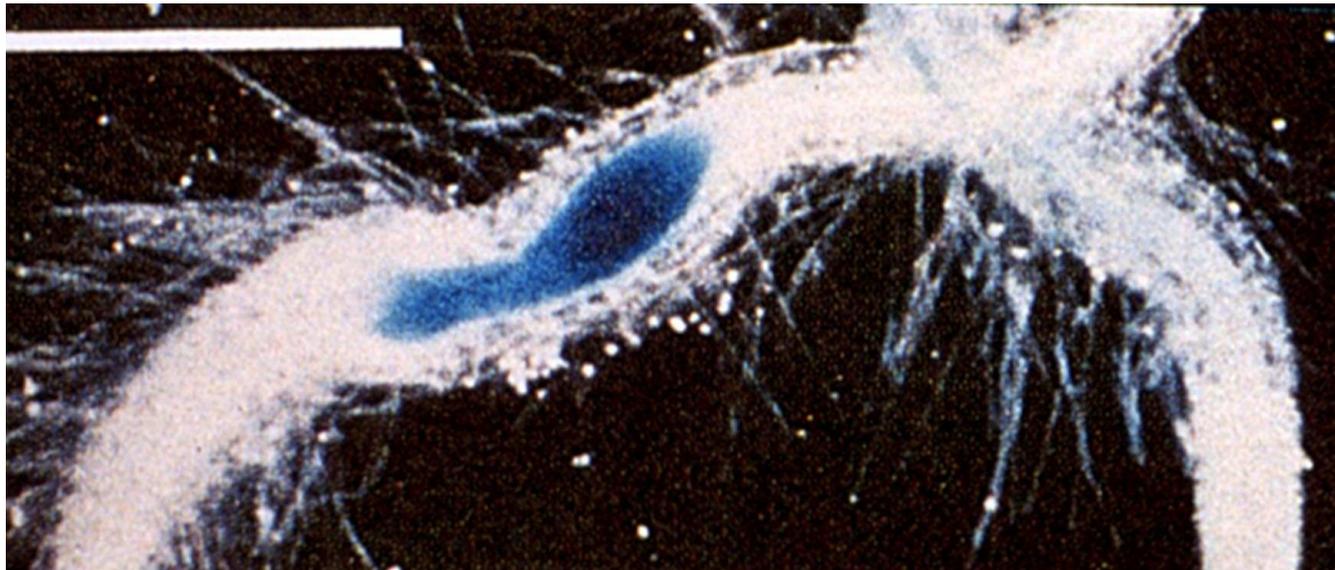


- Gene di E.coli per la β -glucuronidasi (GUS)

La presenza di GUS può essere controllata con un saggio enzimatico a livello tissutale



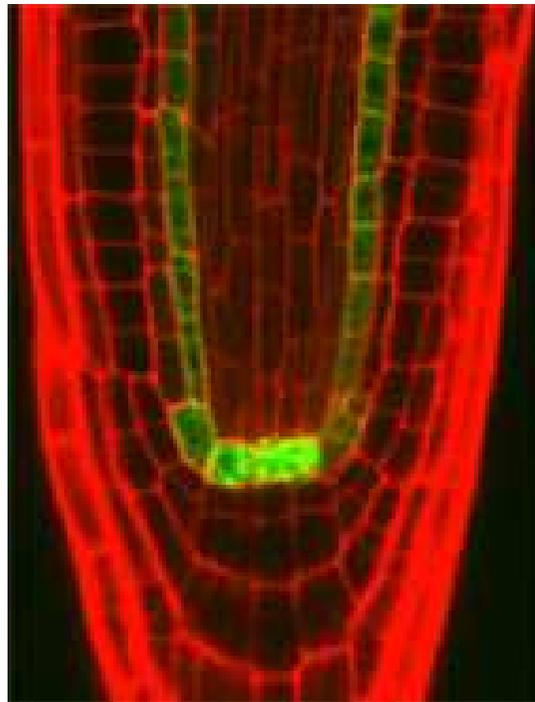
Espressione di un gene reporter quando la pianta è attaccata da nematodi



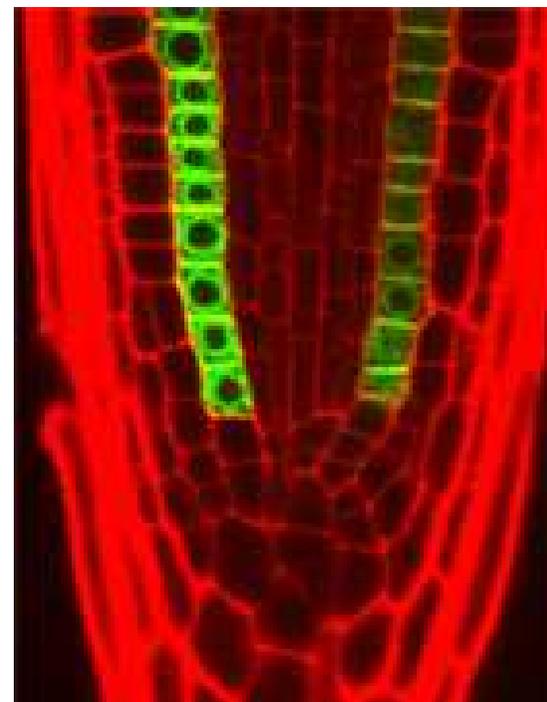


Proteina verde fluorescente ("Green fluorescent protein" o GFP

clonata da una medusa



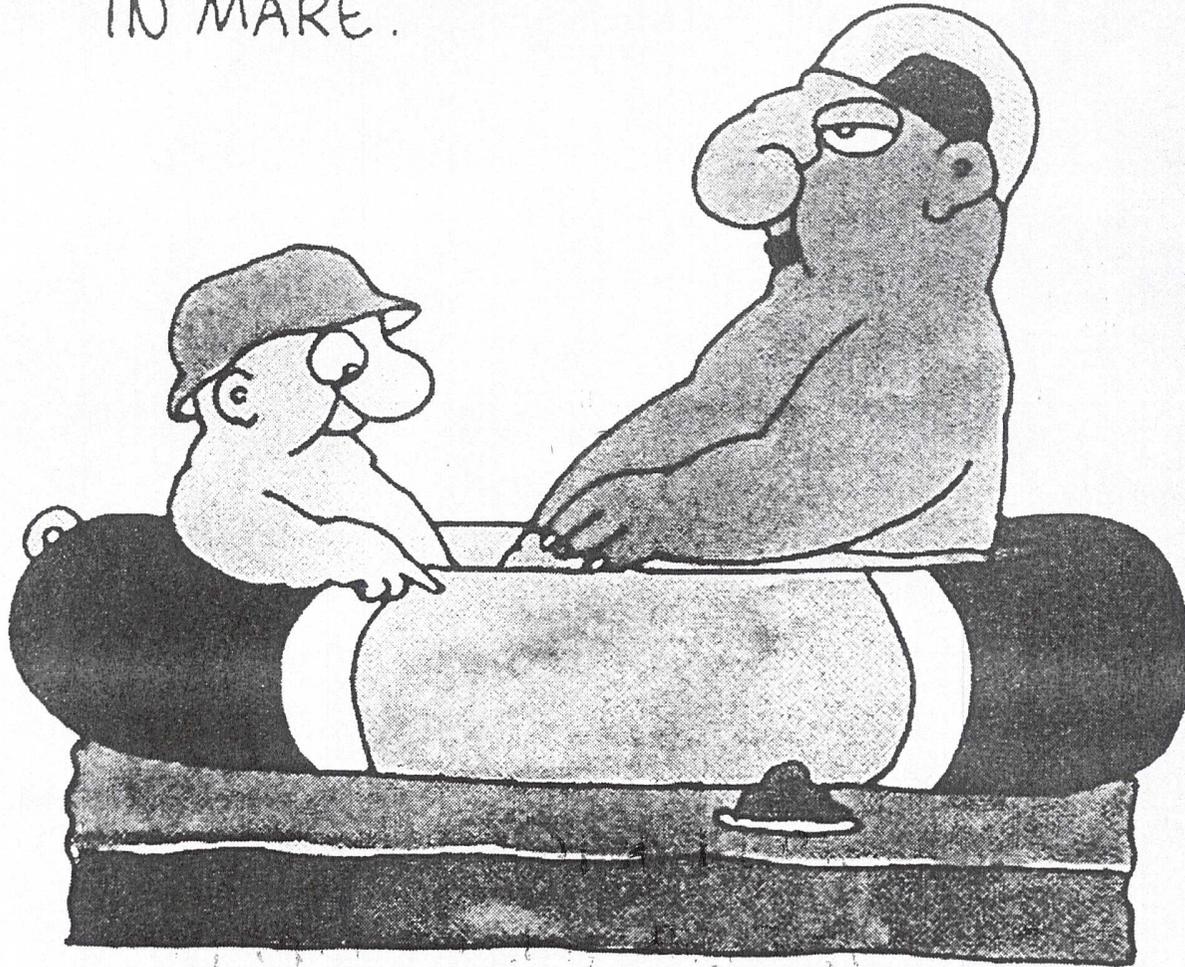
wt / pSCR::GFP



scr-1 / pSCR::GFP

C'È UNA
CACCA
IN MARE.

NON TOCCARLA, CHE
PUO' ESSERE
TRANSGENICA.



ALTAN.