

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

FACOLTÀ DI AGRARIA

Laurea Specialistica in Biotecnologie Vegetali e Microbiche

Titolo:

“Valutazione dell’efficienza di espressione di diverse varietà di *Nicotiana tabacum* per l’utilizzo nel Molecular Farming come produttrici di molecole ricombinanti ad azione terapeutica”

Candidato:

Michele Pisani

Relatore:

Prof. Sergio Miele

ANNO ACCADEMICO 2005 - 2006

Alla mia famiglia

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 CENNI GENERALI	5
1.1.1 Anticorpi policlonali e monoclonali.....	7
1.1.2 Animali transgenici per la produzione di biofarmaci.....	13
1.1.3 Piante transgeniche per la produzione di biofarmaci	14
1.1.4 Il Tabacco (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	14
1.1.4.1 Caratteri botanici e biologia.....	16
1.1.5 Maschiosterilità	19
1.1.5.1 Maschio-sterilità genetica.....	19
1.1.5.2 Maschiosterilità citoplasmatica.....	20
1.1.5.3 Maschio-sterilità genetico-citoplasmatica.....	21
1.1.6 Trasformazione diretta e indiretta	23
1.1.6.1 Metodo biolistico	23
1.1.6.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
1.1.7 Micropropagazione (coltura <i>in vitro</i>).....	31
1.2 STATO DELL'ARTE.....	35
1.3 COSTI E RISCHI PER L'AMBIENTE.....	45
2. SCOPO DELLA RICERCA	48
3. MATERIALI E METODI.....	50
3.1. Preparazione del materiale vegetale da trasformare.....	50
3.2 La trasformazione.....	51
3.3 Saggio per l'espressione del gene nelle singole linee "trasformate"	54
3.4 Produzione degli F1	55
3.5 Terreni di crescita.....	57
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	61

5. CONCLUSIONI.....	79
6. Ringraziamenti	84
7. BIBLIOGRAFIA	84

1. INTRODUZIONE

1.1 CENNI GENERALI

Parlare di piante geneticamente modificate evoca, nell'immaginario collettivo, scenari inquietanti di coltivazioni in cui il processo produttivo è stato in qualche modo modificato per raggiungere obiettivi i cui vantaggi risultano di difficile comprensione da parte dei consumatori. I sondaggi confermano, infatti, come la maggior parte dei cittadini europei nutra una forte diffidenza nei confronti delle piante transgeniche che vengono percepite principalmente come una minaccia perpetrata dalle grosse multinazionali nei confronti della sicurezza alimentare e ambientale di tutti.

L'introduzione di geni "estranei" all'interno delle piante, infatti, ha portato, fino ad ora, alla creazione di nuove linee vegetali modificate solo nelle loro proprietà agronomiche (tolleranza a erbicidi e resistenza a insetti) e la cui coltivazione porta vantaggi tangibili esclusivamente agli agricoltori.

Le aspettative sulla possibilità che l'ingegneria genetica possa portare ad un miglioramento delle caratteristiche qualitative degli alimenti ad uso umano, sia dal punto di vista delle proprietà organolettiche che, soprattutto, da quello delle proprietà nutrizionali (maggior apporto di vitamine o di fibre, grassi più salubri ecc.), di fatto, non si sono ancora concretizzate.

I caratteri obiettivo della manipolazione genetica, infatti, possono essere raggruppati essenzialmente in due categorie: caratteri di output e caratteri di input. Questi ultimi si contraddistinguono per avere effetti sulla coltivazione e sul raccolto senza andare ad incidere sulla qualità del prodotto finale. Incrementano, invece, la resa produttiva, riducono i costi di produzione e, dunque, sono di notevole importanza per allevatori e coltivatori. Di tutt'altra natura sono i caratteri di output, il cui obiettivo primario deve risultare in un vantaggio addizionale per l'industria alimentare e per i consumatori modificando sostanzialmente la qualità

del prodotto agricolo (ad esempio eliminando sostanze indesiderate, aggiungendo sostanze importanti dal punto di vista nutrizionale o migliorando le proprietà di lavorazione). Parlare di questa seconda tipologia di modificazioni, però, crea comunque forti dubbi nell'opinione pubblica, soprattutto quando le piante modificate rientrano, in modo più o meno diretto, all'interno della catena alimentare. La chiave di volta per far sì che anche i consumatori possano apprezzare, nella quotidianità, i vantaggi dei prodotti derivanti da piante bioingegnerizzate potrebbe derivare dalla Plant Molecular Farming.

Molte delle attuali ricerche biotecnologiche nell'ambito medico/terapeutico sono dirette allo sviluppo di nuovi farmaci e si focalizzano prevalentemente sulla produzione di quelli di natura proteica.

Sfruttando le tecniche del DNA ricombinante è possibile clonare in microrganismi i geni codificanti per proteine di interesse terapeutico per ottenerne così una produzione su larga scala. Ma non tutti i farmaci possono essere ottenuti utilizzando cellule procariotiche: è questo il caso dei cosiddetti "biofarmaci". I "biofarmaci" sono farmaci proteici complessi che, per raggiungere la forma matura e quindi attiva, necessitano modificazioni che avvengono esclusivamente nelle cellule di eucarioti superiori. In funzione di ciò per la loro produzione si è ipotizzato di sfruttare, come bioreattori, animali o piante transgeniche (Poli G., 2001; Larrick J.W. e Thomas D.W., 2001).

Tali vettori di espressione sarebbero in grado di sintetizzare le proteine d'interesse con le corrette modificazioni post-traduzionali. Inoltre, piante e animali presentano alti potenziali di sintesi che permetterebbero una produzione di farmaci molto importanti per l'uomo, a costi ridotti. In più, la produzione in allevamento o per coltivazione risulterebbe senza dubbio più semplice che non la produzione da colture cellulari.

1.1.1 Anticorpi policlonali e monoclonali

L'uso di anticorpi risale a circa 100 anni fa, quando si scoprì che iniettando dosi sub-letali di una tossina in animali da laboratorio, questi acquisivano gradualmente una "immunità" anche nei confronti di dosi letali di quel composto. Si scoprì inoltre che l'immunità acquisita dagli animali trattati poteva essere trasferita ad altri animali tramite la somministrazione di sangue o di siero proveniente dagli animali immunizzati.

Era quindi chiaro che la somministrazione di piccole dosi di sostanze estranee all'organismo causava una risposta da parte dell'organismo stesso; questa risposta si concretizzava con la produzione di alcune molecole che si ritrovavano nel siero degli animali trattati. Queste molecole furono definite *anticorpi* (*anti*=contro, *corpi*=corpi estranei). Le sostanze estranee che causavano la produzione di anticorpi furono definite *antigeni* (*anti*-corpo *generatrici*).

Successivamente fu dimostrato che gli anticorpi sono proteine presenti nella frazione gamma-globulinica, da cui il sinonimo gammaglobuline o immunoglobuline, queste presentano una struttura simmetrica ad Y la cui peculiarità è data dalla capacità di legare (non covalentemente) con elevata specificità la molecola che ha provocato la loro stessa produzione nell'animale in cui è stato iniettato l'antigene.

In breve, esse sono costituite da due catene glicoproteiche di circa 450 amminoacidi, definite *catene pesanti* e da due catene polipeptidiche di circa 215 amminoacidi, dette *catene leggere*. Le catene pesanti e leggere sono unite tra di loro da legami covalenti (ponti disolfuro) e da legami non covalenti.

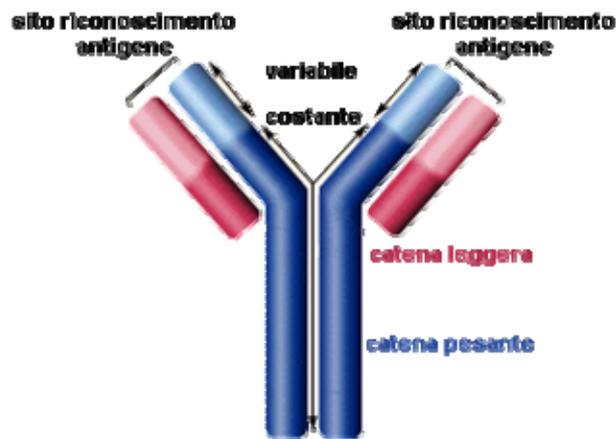


Figura 1. Struttura ad Y degli anticorpi mostrante le due catene leggere e le due catene pesanti divise nelle sue regioni costanti e variabili; al termine di quest'ultime è possibile notare i siti di riconoscimento per l'antigene.

Al vertice di ciascuno dei due bracci della Y si trovano i siti di legame tra antigene e anticorpo: il sito combinatorio (o sito di riconoscimento per l'antigene) è definito *idiotipo* anche se il termine *paratopo* è più appropriato. L'idiotipo è rappresentato da una incavatura delle dimensioni massime di 3,6 x 1,7 x 0,7 nm e minime di 2,5 x 1,0 x 0,6 nm; in questa incavatura avviene il legame (di tipo non covalente) tra antigene ed anticorpo.

Considerando le piccole dimensioni dell'idiotipo, si deduce che l'anticorpo non riconosce l'intero antigene, ma solo una sua piccola parte: l'*epitopo*.

Per antigene si intende qualsiasi sostanza in grado di indurre la produzione di anticorpi specifici contro se stessa; possono infatti avere capacità antigeniche sia composti proteici che carboidrati, a patto che abbiano dimensioni sufficienti a suscitare una risposta da parte del sistema immunitario.

Tuttavia, non è tutta la molecola dell'antigene ad essere riconosciuta dall'anticorpo, bensì solo una piccola parte di essa: quando una molecola di grosse dimensioni penetra in un organismo animale, questa viene immediatamente attaccata da organismi cellulari, i macrofagi, che frammentano la molecola "invasore" ed espongono i piccoli frammenti sulla loro membrana cellulare; sono questi frammenti di piccole dimensioni ad essere riconosciuti dal sistema immunitario e ad essere determinati come antigenici o epitopi.

Nonostante sia necessario iniettare molecole di grosse dimensioni per ottenere una risposta anticorpale, è possibile ottenere anticorpi in grado di riconoscere anche molecole di piccole dimensioni. In questo caso è necessario "veicolare" la piccola molecola (definita *aptene*) su di una molecola proteica (definita *proteina carrier*) di grande dimensione ed in grado quindi di stimolare la produzione di anticorpi.

Una molecola di questo tipo viene detta *immunogeno* e nella sua preparazione l'aptene viene spesso allontanato dalla superficie della proteina carrier per mezzo di un'altra piccola molecola detta *ponte* o *spaziatore*, che ha la funzione di allontanare l'aptene dalla superficie della proteina carrier così da consentire un migliore riconoscimento dell'aptene da parte del sistema immunitario dell'animale.

La specificità di un anticorpo è tanto maggiore quanto maggiore è la sua capacità di discriminare l'antigene da molecole chimicamente e strutturalmente molto simili all'antigene stesso.

Un'altra peculiarità di ciascun anticorpo è l'affinità; tale parametro prende in considerazione il legame non covalente tra antigene ed anticorpo (che è reversibile) esprimendolo con una costante di associazione:

$$K = [Ag \cdot Ac] / [Ag] \cdot [Ac]$$

La costante di associazione, detta anche di equilibrio o di affinità, esprime la concentrazione minima di antigene in grado di saturare il 50% dei siti combinatori dell'anticorpo.

Gli anticorpi possono essere suddivisi in: anticorpi policlonali e anticorpi monoclonali; i primi sono caratterizzati da eterogeneità, bassa specificità, e possono essere prodotti in modo semplice ed economico ma in quantità limitate; i monoclonali invece hanno la caratteristica di avere omogeneità, alta specificità, alta affinità, si possono ottenere in quantità elevate ma il procedimento per ottenerli è più complesso rispetto ai precedenti.

Gli anticorpi policlonali si ottengono immunizzando (iniettando l'antigene) in animali (spesso conigli, capre o altri animali di media o grande taglia) circa una volta a settimana per un periodo di uno o due mesi. Quando il titolo (la concentrazione dell'anticorpo) è sufficientemente elevato l'animale viene salassato in bianco, gli viene cioè prelevato tutto il sangue, il siero viene separato dai globuli rossi e quindi caratterizzato per determinarne il titolo, l'affinità e la specificità nei confronti dell'antigene.

La risposta anticorpale del sistema immunitario nei confronti di un singolo antigene è estremamente eterogenea; questo è dovuto al fatto che ciascun tipo di anticorpo è prodotto da una diversa linea di linfociti ed ogni linea di linfociti, originatasi indipendentemente dalle altre in seguito al trattamento di immunizzazione, riversa gli anticorpi da essa prodotti nel sistema circolatorio. Per questo la produzione di anticorpi policlonali può dare ottimi risultati purchè l'antigene sia altamente purificato; in alcuni casi è però difficile poter disporre dell'antigene purificato, oppure si desidererebbe ottenere una popolazione totalmente omogenea di anticorpi dalle caratteristiche perfettamente descrivibili, questo si ottiene adottando una tecnica più complessa ossia la produzione di anticorpi monoclonali.

Il problema della eterogeneità degli antisieri potrebbe essere risolto selezionando e coltivando *in vitro* una sola linea cellulare di linfociti secernenti l'anticorpo che

ci interessa, ma questo però non è possibile in quanto i linfociti non sono in grado di crescere se coltivati *in vitro*.

La soluzione a questo problema venne nel 1976 quando Cesar Milstein e i suoi collaboratori riuscirono a fondere linfociti provenienti dalla milza di un topo immunizzato contro un certo antigene con cellule di mieloma di topo (cellule tumorali, in grado di crescere *in vitro*) ottenendo delle cellule ibride dette *ibridomi* aventi la caratteristica di poter crescere *in vitro* e di secernere *in vitro* anticorpi contro l'antigene iniettato.

La procedura per la produzione di anticorpi monoclonali prevede l'immunizzazione di un topo o un ratto (animali per i quali sono disponibili linee cellulari di mieloma) per mezzo di iniezioni intraperitoneali di antigene; il periodo di immunizzazione varia da 15 a 30 giorni durante il quale piccole dosi di antigene vengono iniettate una volta per settimana; terminato il periodo di immunizzazione, l'animale viene sacrificato e si esegue sterilmente il prelievo della milza (la milza è un organo con funzioni immunitarie, in cui si trovano i linfociti B responsabili della produzione di anticorpi); i linfociti vengono prelevati e fusi con cellule di mieloma per mezzo di una soluzione di glicol polietilenico (PEG); il risultato della fusione viene coltivato *in vitro*; in queste condizioni i linfociti che non si sono fusi muoiono, mentre sopravvivono gli ibridomi e le cellule di mieloma; quest'ultime vengono uccise per mezzo di un terreno di coltura selettivo che consente ai soli ibridomi di sopravvivere; al termine della selezione si hanno in coltura solo ibridomi, per quanto ancora eterogenei. Occorre individuare le linee di ibridomi in grado di secernere l'anticorpo contro l'antigene iniettato nell'animale, questo viene fatto saggiando la capacità degli anticorpi presenti nel terreno di coltura di legare l'antigene; per visualizzare l'avvenuto legame antigene-anticorpo si impiegano diverse tecniche che si basano, ad esempio, sull'uso di isotopi radioattivi, quali marcatori dell'antigene.

La linea di ibridomi secernente l'anticorpo viene quindi sottoposta a clonaggio, procedura con la quale si cerca la separazione di ogni singolo ibridoma dallo

sviluppo del quale si ottiene, successivamente, una linea cellulare composta da cloni di quella singola cellula.

Gli anticorpi monoclonali presentano spesso caratteristiche qualitative superiori a quelle degli anticorpi policlonali, oltre ad una maggiore specificità soprattutto se l'antigene è rappresentato da un aptene (P. Perata, P. Vernieri).

1.1.2 Animali transgenici per la produzione di biofarmaci

Gli animali ideali, scelti nei primi esperimenti di produzione di biofarmaci, sono specie con buona attitudine alla produzione di latte (bovini e ovini) in cui, mediante transgenesi, si vuole ottenere l'espressione del farmaco limitata alla ghiandola mammaria. In tal modo si può sfruttare l'imponente capacità di sintesi proteica di questo organo abbattendo i costi di estrazione del farmaco, che verrebbe secreto nel latte. Tale approccio sembra essere particolarmente promettente per la produzione di anticorpi e per la produzione di altre importanti proteine terapeutiche.

La transgenesi avviene mediante microiniezione di un costrutto contenente il gene per il farmaco in cellule uovo appena fecondate, in vitro oppure in vivo (in questo caso recuperate mediante lavaggio uterino). Con una microsiringa, vengono iniettati 1-2 picolitri di DNA contenenti circa 100-200 copie del gene, espresso sotto il controllo del promotore delle caseine. Gli oociti ingegnerizzati vengono poi trapiantati in femmine ospiti. Una metodica alternativa consiste nell'utilizzo di cellule embrionali coltivabili in vitro che, una volta ingegnerizzate, vengono reintrodotte nell'embrione nelle prime fasi di sviluppo facendogli acquisire in modo stabile le nuove caratteristiche.

L'utilizzo di animali come bioreattori per la produzione di biofarmaci è ancora nella fase iniziale di sperimentazione e molti sono i problemi da risolvere. Infatti, l'esperienza ha finora mostrato basse percentuali di ottenimento di animali transgenici insieme ad un'elevata variabilità nell'espressione del farmaco nel periodo di lattazione. Di conseguenza, i costi di questi biofarmaci sarebbero ancora troppo elevati per l'immissione sul mercato.

Un altro approccio molto recente, che si propone di superare le difficoltà incontrate nei tentativi di produzione di biofarmaci nel latte, è la produzione di proteine ricombinanti in uova di pollo. Gli studi in tal senso sono ancora, è il caso di dirlo, ad uno stato embrionale, ma questa via appare molto promettente.

1.1.3 Piante transgeniche per la produzione di biofarmaci

Anche le piante sono ottimi candidati per la produzione di biofarmaci, per diversi e validi motivi (Ma J. K. *et al.*, 2003). Come nel caso degli animali, infatti, l'utilizzo delle piante ingegnerizzate come bioreattori consentirebbe un notevole abbattimento dei costi di produzione. Ma l'aspetto più interessante è senz'altro la possibilità di ottenere biofarmaci edibili e molto sicuri poiché le cellule vegetali non ospitano i patogeni dell'uomo.

La prima proteina terapeutica prodotta in piante gm è stata l'ormone della crescita umano, espressa in tabacco nel 1986.

1.1.4 Il Tabacco (*Nicotiana tabacum*)

Il tabacco appartiene al genere *Nicotiana*; le numerose specie di questo genere sono originarie dell'America e dell'Oceania, dove si trovano allo stato spontaneo. I vari tipi di tabacco coltivato appartengono prevalentemente alla specie *tabacum* ed in minima parte alla rustica. Entrambe queste specie sembrano essere originarie dell'America, dove, all'epoca della sua scoperta, il tabacco veniva coltivato già da alcuni secoli e per questo si conosce poco sulle forme selvatiche di questa pianta.

Il prodotto veniva usato dagli indigeni per fumo, per fiuto, per essere masticato ed infine come medicamento. Gli indigeni fumavano le foglie arrotolate (sigari) o poste in speciali cannelli funzionanti da pipe: le une e gli altri erano chiamati "tabaco", da cui deriva il nome dato dagli europei alla pianta e al prodotto, mentre il tabacco era chiamato con nomi diversi a seconda della località: *petum* o *betum* nel Brasile o in altre zone dell'America meridionale, *cozoba* o *cohoba* o *yoli* nelle Antille, *hyelt* nel Messico, *upawoc* nella Florida. Il sigaro fu chiamato dagli spagnoli *cigarros*, da *cigarra*, *cicala*, per la sua forma.



Figura 2. Fiore di *Nicotiana tabacum* varietà Petite Havana SR1

Con la scoperta dell'America, il tabacco fu importato quasi subito in Europa, dove esisteva già da ere remote l'abitudine del fumo, per il quale si impiegavano oppio, haschisch, o comunque foglie e cime di erbe aromatiche. In breve tempo la nuova pianta si diffuse in tutto il vecchio continente: nel 1560 era certamente coltivato in Portogallo, in Francia, in Spagna, in Italia; man mano che l'uso del tabacco per fumo, per fiuto o per "medicinale" veniva conosciuto, si diffondeva la coltivazione di questa pianta.

Alla fine l'uso del tabacco è divenuto universale, e il suo consumo nel mondo è in continua ascesa. Nell'area della Comunità Economica Europea la coltura è praticata su 80.000 ettari, con una produzione di 170.000 t. L'Italia è il paese più interessato, con una produzione che supera il 60% della produzione complessiva di tabacco, e con la coltivazione di un numero di tipi e varietà che superano di gran lunga quello di tutti gli altri paesi della Comunità.

1.1.4.1 Caratteri botanici e biologia

Il tabacco appartiene alla famiglia delle Solanacee, al genere *Nicotiana*. A questo genere, secondo Goodspeed (1954) si devono ascrivere 58 specie, secondo altri Autori di più. Tali specie, in base alle caratteristiche morfologiche, alla distribuzione geografica e alle risultanze della analisi citologica, sono state raggruppate dal Goodspeed in 11 sezioni, riunendo nelle prime 10 le specie americane e nell'11^a quelle australiane. Le 11 sezioni sono state riunite, poi, in 3 sottogeneri: *Rustica*, *Tabacum*, *Petunioides*.

Tra le specie del genere *Nicotiana* due sole, la *tabacum* e la *rustica*, sono coltivate per la droga.

Nicotiana tabacum L. E' una specie polimorfa; il fusto è erbaceo, consistente; le foglie sono sessili, di rado subpicciolate, con due auricole basali, di forma che varia da lanceolata a ovata ellittica, disposte intorno al fusto secondo una determinata fillotassi; infiorescenza a pannocchia apicale; fiore con calice quinquefido, corolla actinomorfa imbutiforme con lembo di colore rosso, roseo o bianco; il frutto è una capsula ovato-conica superante il calice concresciuto, deiscente all'apice in due valve bifide; i semi sono reniformi, piccolissimi (circa 10.000-12.000 per grammo), di colore marrone chiaro più o meno intenso, contenenti dal 31 al 40% di olio; la radice è fittonante. Il numero aploide di cromosomi è 24.

Nicotiana rustica L. Il fusto è erbaceo; le foglie sono picciolate, di forma ovata, subcordata o cordata, disposte intorno al fusto secondo una determinata fillotassi; infiorescenza a grappolo; fiore con calice quinquefido, corolla con tubo cilindrico-ventricoso, di colore giallo-verdastro; il frutto è una capsula ovato-globosa, con apice ombelicato, più lunga del calice concresciuto, poco deiscente o quasi indeiscente; i semi sono reniformi, piccoli (circa 6.000 per grammo); la radice è fittonante. Il numero aploide di cromosomi è 24.

Per la germinazione dei semi del tabacco le condizioni ottimali si verificano quando i semi hanno sempre acqua a loro disposizione e la temperatura è compresa tra 25 e 30°C. Le temperature minima e massima per la germinazione sono rispettivamente 13 e 38°C. Per soddisfare queste esigenze, oltre che per l'estrema piccolezza dei semi e la scarsa competitività delle giovani piantine, generalmente il tabacco viene posto a germinare nei semenzai.

La fase di germinazione ha una durata variabile da 6-8 giorni a 25-30 giorni a seconda della freschezza dei semi e della temperatura del semenzaio. In genere, 10-12 giorni dopo la semina nel semenzaio emergono dal substrato le due piccole foglie cotiledonari, di forma arrotondata, che sono le prime a svolgere la funzione nutritiva autonoma.

Compare quindi la prima coppia di foglie caulinari che si dispongono in posizione alterna alle foglie cotiledonari (stadio di *crocetta*); successivamente nascono altre foglie e la piantina conserva per un breve periodo l'habitus *rosettiforme*, per assumere poi il tipico habitus *caulinare*.

Le foglie che, come è noto, costituiscono il prodotto principale di questa pianta, si dispongono sul fusto, apparentemente in posizione alterna, ma in effetti secondo una determinata fillotassi.

La "maturazione" delle foglie è graduale: ordinariamente tra la maturazione delle *basali* (le prime) e quella delle *apicali* (le ultime) passano 40 giorni. La durata effettiva di questo periodo dipende dalla cultivar e dall'andamento stagionale e può essere influenzata dalla tecnica colturale.

Spesso all'ascella delle foglie si ha l'emissione di germogli, i quali devono considerarsi dei veri succhioni, in quanto non sono capaci di fornire foglie di qualità apprezzabile, mentre sottraggono nutrimento alle foglie dell'asse principale. La tendenza ad emettere germogli varia con le cultivar, è accentuata nei terreni più ricchi di sostanze nutritive e da un andamento stagionale umido, è influenzata dalla tecnica colturale adottata.

Contemporaneamente alla “maturazione” delle foglie si ha la fioritura. Anche l’antesi è scalare: si aprono prima i fiori posti nella parte più elevata dell’infiorescenza e poi i sottostanti. L’apertura dei fiori ha inizio nelle ore più calde della giornata. I fiori sono forniti di nettari i quali richiamano molti insetti: pertanto nel tabacco, oltre alla fecondazione autogama, si verifica frequentemente quella incrociata.

Il frutto è una capsula che racchiude numerosissimi semi e che a maturità si apre in due valve bifide. Le capsule sono riunite in infruttescenze terminali (pannocchie di cima).

Con la formazione delle capsule si conclude il ciclo del tabacco che ha una durata variabile con la cultivar e con le condizioni climatiche, e che in media, nel nostro clima, dura 6-8 mesi.

Le cultivar destinate alla produzione di tabacco per fumo, appartengono alla specie *Nicotiana tabacum*; esse generalmente vengono raggruppate in base al colore delle foglie curate ed in base al metodo di cura al quale sono sottoposte dopo la raccolta. Tra queste varietà ce ne sono alcune che sono principalmente coltivate in Italia come ad esempio *Kentucky*, *Maryland*, *Burley*, *Virginia bright*.

Il *Kentucky* presenta forma quasi cilindrica, più marcata quando si pratica la cimatura, e può raggiungere l’altezza di 1,80-2,00 metri; le foglie raggiungono un notevole sviluppo e possono avere una lunghezza fino a 1 metro. E’ coltivato in Toscana e in Umbria, con linee i cui prodotti vengono impiegati per la produzione dei sigari Toscani, nonché in Campania, con linee raddolcite nella forza e nel gusto del fumo, i cui prodotti vengono anche trinciati ed impiegati nelle sigarette del tipo scuro e semi-scuro.

Il *Kentucky* è una varietà che presenta una caratteristica nota come maschio-sterilità. La sterilità, completa o meno, è l’incapacità di un individuo a produrre gameti o zigoti vitali: di qui la sterilità totale o parziale di tipo gametico o zigotico, o, rispettivamente, aplontica o diplontica. Si può avere sia in individui

femminili che maschili e in quest'ultimo caso si usa indicarla sinteticamente con il termine di andro- o *maschio-sterilità*.

1.1.5 Maschiosterilità

La sterilità può essere il risultato di fattori ambientali, di situazioni citoplasmatiche, di incompatibilità fra embrione ed endosperma, di fattori squisitamente genetici segreganti da eterozigoti ed il cui effetto rilevante è appunto il condizionamento della fertilità; la sterilità può derivare anche da poliploidia o da aneuploidia, ed allora, in contrasto alla precedente, detta genetica, è invece cromosomica. In alternativa ai fattori genetici che possono esplicitare la loro azione essenzialmente nei gameti ci sono fattori che danno luogo alla sterilità ibrida determinando sbilancio zigotico.

In contrasto alla sterilità vera, esiste una parasterilità o incompatibilità che dà luogo a sterilità per l'impossibilità di certi genotipi a procedere alla fecondazione quando si trovano a interagire con altri genotipi, come nel caso di certi granuli pollinici su certi stigmi: in simili circostanze, lo stesso polline si comporterebbe in modo del tutto normale se dovesse germinare su tessuti di altro genotipo (Reiger R. *et al.*, 1968).

Molto studiata e di particolare interesse, anche a scopi di miglioramento genetico delle piante coltivate è la sterilità maschile (maschio-sterilità).

A differenza dell'incompatibilità, la maschio-sterilità non è un regolare meccanismo di controllo dell'ibridismo in natura, ma si presenta sporadicamente nelle popolazioni vegetali. Sono conosciuti 3 tipi di maschio-sterilità: genetica, citoplasmatica e genetico-citoplasmatica.

1.1.5.1 Maschio-sterilità genetica. In molte specie è stata trovata una sterilità maschile di natura monogenica, mentre nell'orzo e nel pomodoro la sterilità è di

natura poligenica. La maschio-sterilità è normalmente una condizione recessiva, per cui, indicando con *ms* il fattore di maschio-sterilità e con *Ms* quello di maschio-fertilità, si hanno le seguenti condizioni:

- *MsMs*: maschio-fertile omozigote;
- *msms*: maschio-sterile omozigote;
- *Msms*: maschio-fertile eterozigote.

La maschio-sterilità, per motivi di ricerca o di applicazione pratica, può essere mantenuta sulla base di un semplice reincrocio (incrocio di piante sterili con piante fertili eterozigoti): in tale incrocio, in cui si usa come maschio *Msms* e come pianta porta-seme quella maschio-sterile, si ha metà della progenie sterile e metà fertile (eterozigote). Infatti:

$$msms \text{ (maschio-sterile)} \times Msms \text{ (maschio-fertile)} = 50\% msms + 50\% Msms$$

In alcuni casi il gene della maschiosterilità mostra un effetto pleiotropico per cui le piante maschio-sterili sono individuabili senza analizzare il proprio fiore; in altri casi, per facilitare l'individuazione di piante maschio-sterili, si possono usare geni a effetto visibile (marcatori) che siano strettamente associati al fattore di maschio-sterilità.

1.1.5.2 Maschiosterilità citoplasmatica. E' dovuta a fattori contenuti nel citoplasma; piante recanti questi fattori sono maschio-sterili e danno regolarmente seme se sono presenti piante impollinatrici (pollinator). I semi F1 così ottenuti danno tutte piante maschio-sterili, perché, com'è noto, il citoplasma viene trasportato solo dall'oosfera. Il mantenimento di piante maschio-sterili di questo

tipo è quindi semplicissimo: indicando con S e F i fattori di sterilità e fertilità (messi fra parentesi per indicare che sono trasportati dal citoplasma), si ha:

$$(S) \text{ maschio-sterile} \times (F) \text{ maschio-fertile} = 100\% (S)$$

1.1.5.3 Maschio-sterilità genético-citoplasmatica. Questo tipo differisce dal precedente per il fatto che le piante maschio-sterili non danno progenie maschio-sterile in ogni caso, ma possono dare piante maschio-fertili se impollinate da piante con un particolare genotipo, cioè per azione di geni capaci di ristabilire la produzione di polline in un citoplasma recante fattori di maschio-sterilità. Questi geni ristoratori (restorer, R), quindi, trasformano casi di maschio-sterilità citoplasmatica in fertilità genético-citoplasmatica.

In presenza di citoplasma per la maschio-sterilità il genotipo delle piante maschio-sterili è *rr* mentre quello delle piante con fertilità sarà *RR* o *Rr*. Le progenie di piante maschio-sterili citoplasmatiche (*rr*), possono essere di tipo differente a seconda degli alleli presenti al locus R del genitore maschile. Tale genitore può avere costituzione genetica *rr* se possiede citoplasma normale (N) ma deve essere per forza *Rr* o *RR* in presenza di citoplasma maschio-sterile S.

Dall'incrocio tra una pianta maschio-sterile ed una pianta maschio-fertile si ottengono piante figlie dotate tutte di citoplasma maschio-sterile perché, come abbiamo detto in precedenza, il citoplasma è trasmesso dalla madre; le piante figlie risultano:

- sterili per il 100%, se il genitore maschile non era dotato di geni ristoratori;
- fertili per il 100%, se il genitore maschile era omozigote per il gene ristoratore;
- sterili per il 50%, se il genitore maschile era eterozigote per il gene ristoratore.

(D'Amato F. *et al.*, 1987; Lorenzetti F. *et al.*, 1996)

Altra varietà interessante è il *Maryland*, essa presenta foglie di media grandezza, di forma ovato-ellittico, tessuti sottili, privi di gomme, di elevata combustibilità, con un aroma molto intenso. Il colore tipico delle foglie curate è rosso mattone. Si coltiva nelle province di Caserta e Salerno, sia con la cv. Maryland Benincasa, che con alcuni tipi americani.

Il lavoro di miglioramento genetico del tabacco in Italia, iniziato da Angeloni e Benincasa nell'Istituto sperimentale per il Tabacco di Scafati, fu rivolto, in un primo tempo, al superamento delle difficoltà di introduzione di nuove cultivar nei diversi ambienti italiani.

Dal 1961, in seguito ad un violento attacco di *Pernospora* tabacina che distrusse buona parte delle coltivazioni di tabacco, il miglioramento genetico è stato rivolto, con incroci intervarietali ed anche interspecifici e successive selezioni, a costituire, nell'ambito di ciascuna varietà, linee resistenti alla *pernospora*.

Gli obiettivi principali che in questi anni si è cercato di raggiungere e che sono in continuo miglioramento sono tre. In primo luogo la costituzione di linee a basso contenuto in nicotina e soprattutto in sostanze catramose nei prodotti di piroscissione, nel tentativo di limitare la pericolosità del fumo. Viene poi l'attività rivolta al miglioramento delle caratteristiche qualitative del prodotto, seguendo l'evoluzione del gusto dei fumatori. Ed infine il tentativo di costituire tipi di foglie a "maturazione" contemporanea o ravvicinata al fine di introdurre la raccolta meccanica (Baldoni R. e Giardini L., 1981).

Un altro obiettivo è stato introdotto negli ultimi anni, esso non vede la pianta di tabacco per le caratteristiche qualitative e quantitative descritte sopra bensì la vede come una fabbrica per la produzione di molecole ricombinanti di natura proteica ad azione terapeutica.

Di notevole interesse, non a scopo commerciale bensì a scopo sperimentale, è la varietà *Petit Havana SRI*, la cui caratteristica principale, che appunto la adatta all'impiego nei laboratori, è la sua precocità in termini di crescita e sviluppo

rispetto alle altre varietà di *Nicotiana*. Non a caso è considerata come pianta modello, come ad esempio *Arabidopsis thaliana*, su cui eseguire test e saggi al fine di ottenere dei risultati in tempi brevi prima di intervenire su una varietà di interesse commerciale.

1.1.6 Trasformazione diretta e indiretta

La possibilità di indurre direttamente singoli geni nelle piante potrebbe rendere i procedimenti di miglioramento genetico molto più rapidi, evitando che, insieme ai geni desiderabili, ne vengano trasferiti altri meno utili o dannosi per la produzione, la cui eliminazione non potrebbe essere effettuata mediante le lunghe e costose tecniche classiche di selezione.

Da qualche anno a questa parte la biologia molecolare ha aperto la possibilità di modificare il patrimonio genetico di molti organismi attraverso l'introduzione diretta di singoli geni.

Per la trasformazione delle piante destinate al Molecular Farming (così come per tutte le altre modificazioni) due sono i sistemi principalmente utilizzati: il metodo biolistico, principalmente per cereali e leguminose ed il metodo basato sull'*Agrobacterium tumefaciens* per piante dicotiledoni (come il tabacco).

1.1.6.1 Metodo biolistico

Il metodo biolistico (particle gun) rientra nei metodi di trasferimento diretto di DNA, esso prevede il bombardamento di cellule vegetali con microproiettili, generalmente in tungsteno o oro (1–4 µm di diametro), accelerati ad una velocità tale da consentire la penetrazione della parete cellulare. Il DNA esogeno è legato a tali particelle mediante spermidina e cloruro di calcio. Gli “spari” sono

generalmente effettuati sotto vuoto ed una particolare attenzione deve essere posta a minimizzare i danni sul tessuto bersaglio.

Lo svantaggio è che le piante che rigenerano dopo tale trattamento sono chimeriche (a macchia di leopardo) per il gene introdotto.

Vi è anche la possibilità di trasferimento di geni in organelli cellulari.

Parametri che condizionano l'efficienza di tale metodo:

- numero e velocità dei microproiettili;
- dimensione dei microproiettili (1-4 μm);
- quantità di DNA che riveste il microproiettile;
- velocità di impatto con il tessuto bersaglio (250 m/s);
- tipo di supporto e ancoraggio utilizzato per immobilizzare il tessuto;
- distanza tra il cannone e la cellula target;
- tipo di esplosione utilizzato per la trasformazione;
- tipo di danno causato dai microproiettili e dai frammenti del macroproiettile;
- concentrazione di spermidina e cloruro di calcio.

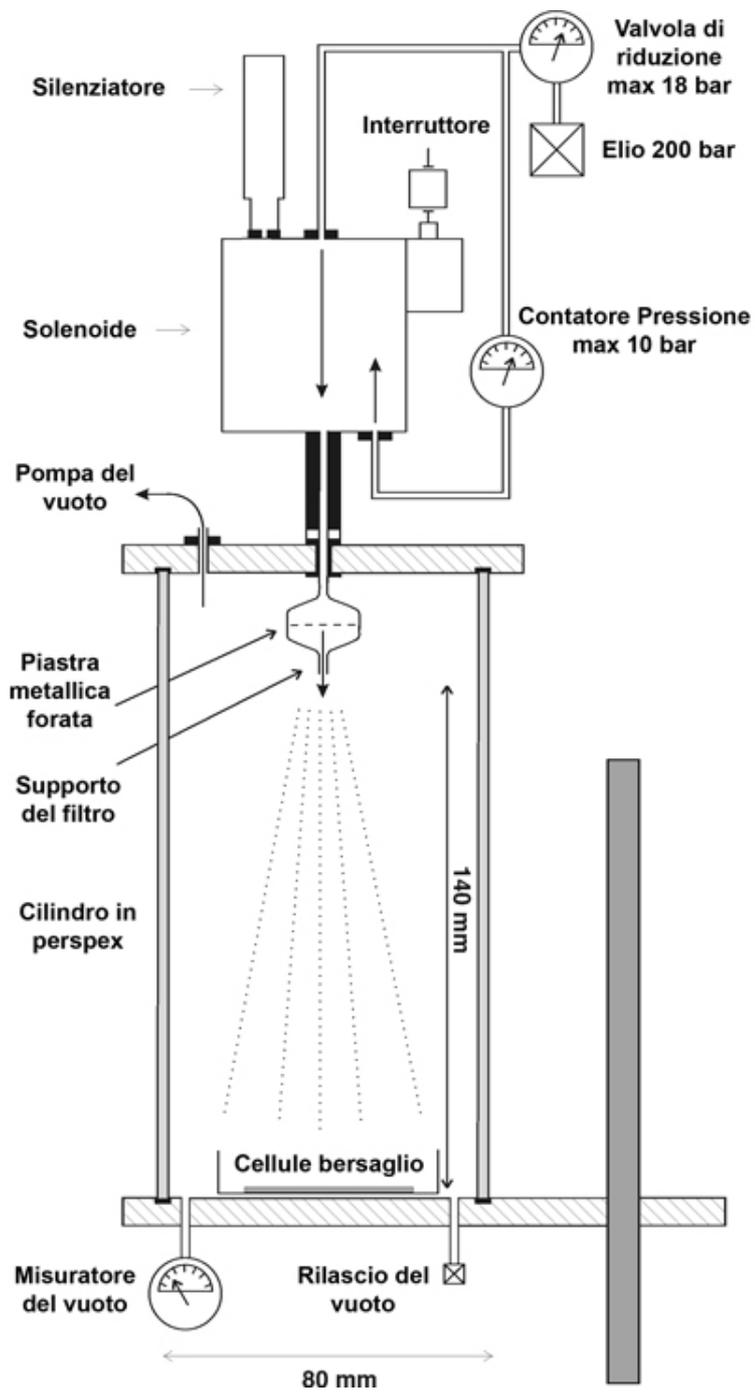


Figura 3. Rappresentazione schematica della struttura del particle gun

1.1.6.2 *Agrobacterium tumefaciens*

I metodi di trasferimento indiretto di DNA possono coinvolgere l'uso di vettori (batteri, virus).

In molte piante, l'*Agrobacterium tumefaciens* e l'*Agrobacterium rhizogenes* (comuni batteri del terreno), inseriscono geni estranei nelle piante e le inducono ad esprimere quei geni sotto forma di proteine. La manipolazione del DNA plasmidico dei batteri ha permesso di utilizzare tali organismi come vettori per l'introduzione di geni utili per il miglioramento genetico delle piante coltivate; un vantaggio è la possibilità di superare le barriere di incompatibilità e, quindi, di effettuare trasferimenti tra specie distanti dal punto di vista filogenetico, in considerazione del fatto che le piante trasformate sono fertili, provviste di un normale assetto cromosomico e, quindi, con un normale comportamento alla meiosi.

L'*Agrobacterium tumefaciens* e l'*Agrobacterium rhizogenes* sono batteri Gram- appartenenti alla famiglia delle Rhizobiacee. *Agrobacterium tumefaciens* è conosciuto come patogeno in grado di indurre quella malattia chiamata "crowl gall" o "galla del colletto", mentre *Agrobacterium rhizogenes* causa una malattia note come "radici aeree".

Negli agrobatteri, i geni responsabili della patogenicità sono localizzati in un plasmide (~200 kbp) detto "plasmidio Ti" (Tumor-inducing) per l'*A. tumefaciens* e "Ri" nell'*A. rhizogenes*. Tali plasmidi possono essere persi se i batteri sono cresciuti ad alta temperatura (>28°C) originando ceppi avirulenti.

Lo sviluppo tumorale delle cellule infettate da *Agrobacterium tumefaciens* è conseguenza, dal punto di vista fisiologico, di un alterato metabolismo ormonale.

Dal punto di vista genetico questa alterazione è determinata dall'integrazione, nel genoma delle cellule vegetali infettate, di un segmento di DNA ben definito (T-DNA), derivato dalla regione T del plasmidio Ti. Sulla cellula vegetale l'ospite

batterico non si limita a controllare l'induzione tumorale attraverso la sintesi di auxine e citochinine, ma si garantisce la sintesi di metaboliti tipici del tumore chiamati "opine", utilizzati come fonte di C, N ed energia.

Si conoscono almento 3 grandi famiglie di plasmidi Ti caratterizzate dal tipo di opina codificata dal loro T-DNA (octopina, nopalina, agropina).

- Organizzazione funzionale dei plasmidi Ti;
- Oncogeni (nella regione T del plasmide Ti);
- Sintesi di opine (nella regione T del plasmide Ti);
- Catabolismo opine;
- Trasferimento coniugativo del plasmide Ti;
- Controllo virulenza (regione *vir*);
- Controllo replicazione;

Sono state compiute ricerche su tabacco e sono stati individuati alcuni loci principali:

- *Tms*, comprende i geni 1 e 2 e dalla sua inattivazione il tumore è indotto alla produzione di germogli;
- *Tmr*, comprende il gene 4 e dalla sua inattivazione il tumore è indotto alla produzione di radici;
- *Tml*, influenzante le dimensioni del tumore;
- *Ocs*, coinvolto nella sintesi delle opine.

Le successive indagini molecolari hanno permesso di identificare la struttura fine del T-DNA nel quale possono essere distinte, nei ceppi di *Agrobacterium* che utilizzano octopina, 2 regioni:

T-Left-DNA;

T-Right-DNA.

Tale struttura, ad esempio per un plasmide specifico per l'octopina, individua i veri e propri oncogeni organizzati nella regione di sinistra (T-Left) del T-DNA la quale codifica in tutto per otto trascritti, indicati dai numeri 1, 2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 7. I prodotti degli oncogeni sarebbero derivati dai trascritti 1, 2, 4, 6° e 6b.

Altri geni coinvolti nell'oncogenesi hanno un ruolo più generale nel meccanismo che consente al batterio di "trovare" le piante; e un terzo elemento essenziale per il trasferimento e l'integrazione del T-DNA dai plasmidi Ti alle cellule vegetali è la presenza di sequenze laterali ripetute (sequenze di 25bp che fiancheggiano la regione T da entrambe le parti). La sequenza per il riconoscimento dei segnali e l'avvio del meccanismo di trasferimento è quella alla destra della regione T.

Il processo di trasformazione genetica coinvolge stadi distinti:

Inserzione;

Integrazione;

Espressione;

Eredità del nuovo DNA inserito.

Se l'obiettivo della manipolazione genetica delle cellule vegetali è quello di produrre piante modificate geneticamente, è necessario che le cellule, oggetto delle manipolazioni, rigenerino poi piante intere. Le cellule trasformate dal T-DNA dei plasmidi Ti sono abbastanza diverse dalle cellule normali; sono in grado di crescere indefinitamente *in vitro* in assenza di ormoni perchè il T-DNA provoca profonde alterazioni del metabolismo ormonale che si riflettono nell'incapacità delle cellule tumorali di rigenerare una pianta normale. Usando il T-DNA come vettore di un gene esogeno, il gene in questione sarebbe inserito stabilmente in una cellula, ma in una cellula tumorale molto riluttante a rigenerare l'intera pianta: le modifiche genetiche rimarrebbero quindi a livello delle cellule.

I tentativi di rigenerare organismi interi da cellule di galle del colletto hanno portato a piante più o meno deformi, incapaci di crescita autonome e generalmente sterili; perciò, per poter utilizzare il T-DNA come vettore occorre "disarmarlo", eliminare cioè i geni responsabili della genesi tumorale e lasciare intatte le sequenze ripetute ai bordi del T-DNA che sono responsabili del suo inserimento nel DNA della cellula infettata.

Il passo successivo è quello di posizionare il gene, che ci interessa trasferire, tra le sequenze laterali del T-DNA; ci sono 2 sistemi di vettori:

Sistema vettore co-integrato: il T-DNA e la regione *vir* sono sullo stesso plasmide
Ti al quale sono stati deleti i geni *onc*;

Sistema a vettore binario: dove il gene da trasferire è inserito tra le sequenze laterali ripetute del T-DNA con un gene "marker" dominante in un plasmide e su un altro plasmide ci sono tutte le altre funzioni per l'attivazione del processo di infezione.

Per l'espressione nelle cellule vegetali di geni estranei spesso di origine batterica o virale è necessario usare un promotore appropriato e una sequenza terminatrice della trascrizione per assicurare un'efficiente trascrizione, traduzione e stabilità dell'mRNA.

L'espressione di un gene estraneo in cellule di piante trasformate può essere saggiato determinando l'abbondanza con l'attività di un suo prodotto.

Schema di trasformazione tramite *Agrobacterium tumefaciens*

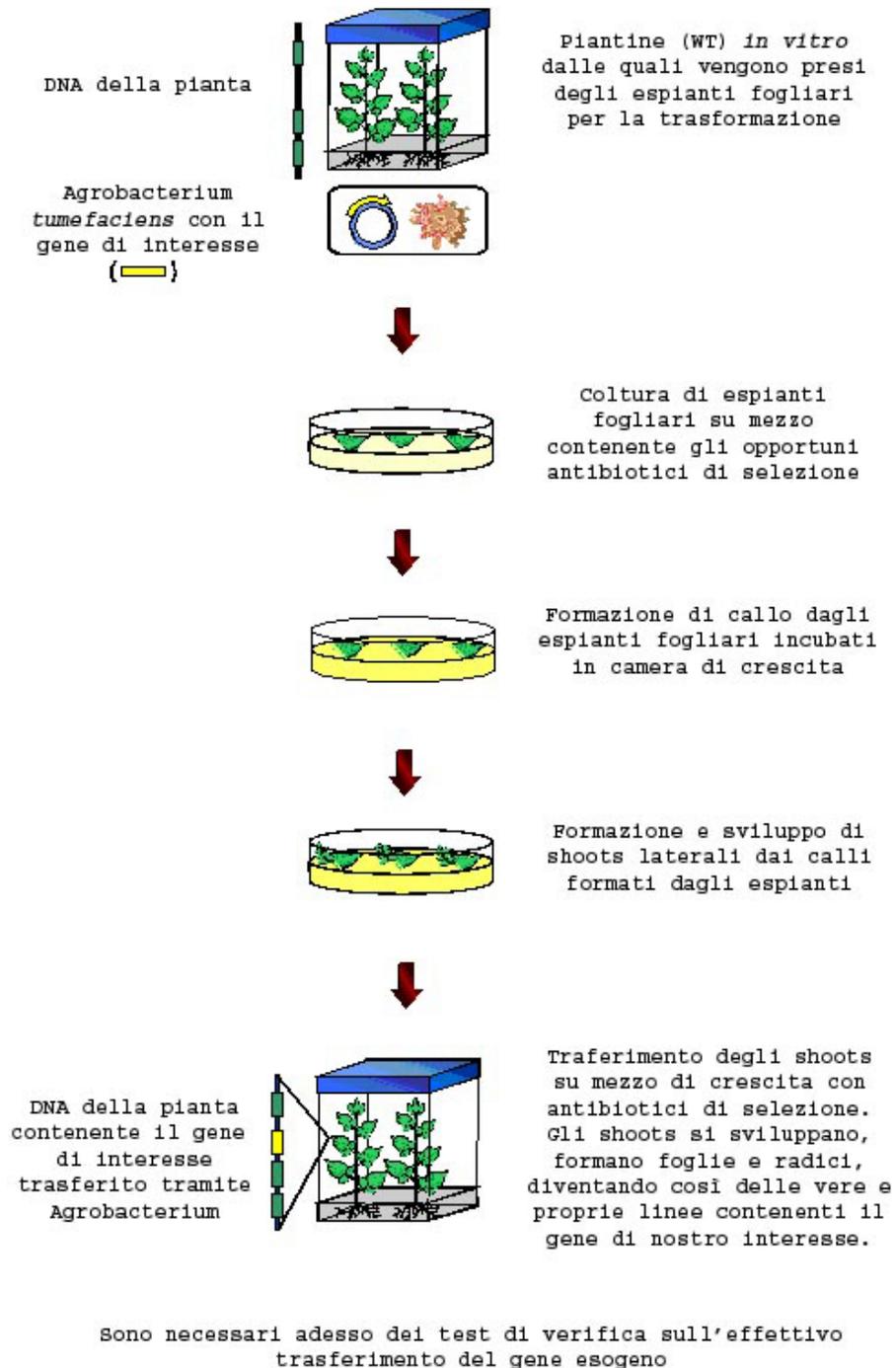


Figura 4. Schema di trasformazione tramite *Agrobacterium tumefaciens* e descrizione dei relativi passaggi.

1.1.7 Micropropagazione (coltura *in vitro*)

Attraverso la tecnica della micropropagazione è possibile ottenere, dal materiale trasformato, delle vere e proprie piante portanti il gene o il pool genico di interesse.

Le tecniche di coltura *in vitro* permettono sia una rapida propagazione clonale della specie di interesse, sia il superamento della stagionalità della produzione di metaboliti secondari, sia la risoluzione del problema della variabilità legata alle condizioni meteorologiche e all'area geografica di crescita (Minghetti, 2003). La coltura *in vitro* di cellule vegetali può, inoltre, essere assai interessante anche in materia di ricerca di base sul metabolismo e sul normale sviluppo delle cellule vegetali stesse (Berlin, 1988). La propagazione clonale delle piante si basa sul principio della totipotenza, formulato per la prima volta da Achleiden nel 1838 e reso celebre da Virchow con il suo famoso aforisma "*omnis cellula e cellula*"; fu proprio lo stesso Virchow che nel 1878 fu capace di mantenere la crescita di piante e parti di esse dopo una serie di suddivisioni sempre più minute.

La coltura *in vitro* può essere finalizzata alla propagazione di materiale vegetale, sia per la normale ricerca sperimentale, che per una massale propagazione con finalità commerciali. La propagazione di materiale vegetale può seguire due vie alternative:

1. propagazione per germogli ascellari;
2. propagazione per germogli avventizi e/o embrioni somatici:
 - a) direttamente da tessuti o organi;
 - b) indirettamente da callo, ottenuto dalla proliferazione cellulare dell'espianto.

Il primo sistema si basa sulla stimolazione delle gemme ascellari che si sviluppano e danno origine a nuovi germogli, mentre il secondo prevede la propagazione per organogenesi diretta o indiretta.

Nel caso di organogenesi diretta si ha la formazione di germogli direttamente dai tessuti dall'espianto senza passare attraverso la fase di callo. Questa capacità è propria di un numero ristretto di specie e può essere limitata ad alcuni tessuti o organi; in questo tipo di propagazione rientra anche l'embriogenesi diretta che prevede la formazione di embrioni direttamente dal tessuto senza formazione di callo; gli embrioni ottenuti sono detti embrioni somatici in quanto sono geneticamente simili alla pianta madre e si evolvono in plantule che vengono poi trasferite all'esterno.

Nel caso di propagazione per organogenesi indiretta, di contro, i germogli si formano indirettamente a partire dal callo (massa non organizzata di cellule vegetali differenziate in proliferazione); alcune specie hanno la capacità di generare callo, in grado di dare origine a germogli, con del materiale di partenza che può essere molto vario (foglie, fusti, radici, porzioni di organi di riserva come bulbi o tuberi, apici, embrioni, parti di infiorescenza, ecc.). Da tale materiale, in presenza di alti livelli di auxine, con o senza citochinine, si origina callo. Il callo può essere subcoltivato in terreno agarizzato e, successivamente diviso in più porzioni all'occorrenza, o subcoltivato in sospensione. Una volta trasferito in terreno con basso contenuto di auxina, dà origine a strutture avventizie dette "meristemoidi" che si differenziano in germogli. Questo tipo di propagazione prevede anche la formazione indiretta di embrioni da callo, con la differenza che in questo modo si ottengono piante geneticamente uguali fra loro.

In genere la maggioranza delle specie viene propagata attraverso il sistema di propagazione per germogli ascellari, in quanto è minore il rischio di indurre eventuali variazioni del materiale vegetale. Passando attraverso il callo, infatti, cresce la possibilità di indurre variabilità genetica o somaclonale giacché, le cellule, dopo aver subito una previa dedifferenziazione, devono riorganizzarsi in un nuovo tessuto. Una delle maggiori problematiche che si riscontrano nella propagazione *in vitro* è proprio la comparsa di mutazioni, di traslocazioni e amplificazioni geniche, di cambiamenti del numero di cromosomi e del livello di ploidia che appunto, possono interferire negativamente nei programmi di semplice

propagazione clonale; di contro, questi stessi fattori possono rappresentare una fonte importante di nuove linee cellulari con proprietà caratteristiche.

Le tecniche di coltura *in vitro* seguono protocolli ben specifici e studiati opportunamente per rendere più veloce e ottimizzata al meglio la crescita della specie di nostro interesse. Gli espianti possono essere considerati degli organismi eterotrofi che, per l'accrescimento, necessitano di tutti gli elementi necessari in forma prontamente assimilabile.

Le differenze in termini di esigenze nutrizionali variano tra le diverse specie e tra le diverse varietà di una stessa specie. Inoltre gli espianti di più grandi dimensioni richiedono mezzi di coltura più semplici rispetto a meristemi, cotiledoni e porzioni di tessuto per i quali, al contrario, la composizione del mezzo è un fattore critico.

Il mezzo di coltura è costituito per il 95% da acqua, macronutrienti e micronutrienti, fitoregolatori di crescita, vitamine, zuccheri e talvolta da altri materiali organici caratterizzati da una complessità più o meno elevata. Nel complesso circa venti componenti sono necessarie per costituire un mezzo di coltura.

Un programma di micropropagazione di materiale vegetale si articola in quattro fasi distinte, come esposto dall'International Association for Plant Tissue Culture (I.A.P.T.C.). Il primo stadio consiste nel prelievo di un organo o un tessuto da una pianta madre ed il successivo avvio della coltura asettica. Il secondo stadio prevede un fase di proliferazione dell'espianto cui segue nel terzo stadio, la radicazione. Infine nel quarto ed ultimo stadio si ha l'acclimatazione della pianta radicata.

In genere, tuttavia, prima dell'avvio della coltura asettica, la pianta madre dalla quale vengono prelevati i primi espianti vegetali, subisce una fase di trattamento più o meno prolungato con fungicidi ed altri fitofarmaci. In questo modo si garantisce, già in partenza, una selezione di materiale non contaminato, o comunque nel quale la contaminazione da parte di microrganismi è ridotta ai minimi termini.

La scelta della pianta da cui prelevare il materiale è essenziale per assicurare, a fine ciclo, una produzione di buona qualità. La pianta madre deve essere sicuramente rispondente allo standard della varietà e indenne da patogeni e, per quanto concerne i fruttiferi, esente da virosi. I risultati che si possono ottenere *in vitro* sono influenzati dal modo in cui sono state mantenute le piante e dall'ambiente nel quale sono cresciute. Per il prelievo sono preferibili piante sane e vigorose, ben concimate ed irrigate e che in particolare non abbiano subito stress di alcun genere.

1.2 STATO DELL'ARTE

Per diverse decine di anni, gli organismi geneticamente modificati (OGM), sono stati utilizzati per produrre molecole ad azione terapeutica in soggetti ricombinanti. Per un lungo periodo di tempo i soli organismi (OGM) utilizzati per la produzione sono stati *Escherichia coli*, lievito e cellule di mammifero. Durante gli ultimi 20 anni, sono state prodotte in piante transgeniche da raccolto e non, diverse proteine di interesse farmaceutico come albumina, aprotinina, enkephalina, emoglobina, antigeni per scopi di vaccinazione, fattori di crescita, ormoni, enzimi con potenziale terapeutico, proteine C, glucobrosidasi e anticorpi, come pure enzimi industriali, plastica biodegradabile e olii di lubrificanti (Cramer C. *et al.*, 1999; Fischer R. ed Emans E., 2000; Daniell H. *et al.*, 2001). Il termine molecular farming viene usato a volte anche per includere "gli alimenti funzionali" o "la nutraceutica" e piante a scopo alimentare con composizione alterata delle sostanze nutrienti.

Nel 1989-90, la fusione della biotecnologia molecolare della pianta e della medicina ha dimostrato che le medicine ed i vaccini molecolari potrebbero svilupparsi con successo nelle piante (Hiatt A. *et al.*, 1989; Düring K. *et al.*, 1990); questa tecnologia ora è sfruttabile a fini commerciali, anche se la maggior parte della ricerca è ancora alla fase sperimentale, alcuni prodotti, infatti sono già in commercio negli Stati Uniti.

Una vasta gamma di piante sono attualmente testate per un utilizzo nel molecular farming in America del Nord e non solo; queste includono piante coltivate per il raccolto quali mais, tabacco, riso, erba medica, colza, soia, frumento, orzo, fagiolo dall'occhio nero, patata, pomodoro, rapa, lattuga, cartamo, lino, spinaci e piante non da raccolto quali ad esempio *Arabidopsis* (Giddings *et al.*, 2000; Cramer C. *et al.*, 1999; Daniell H. *et al.*, 2001). Il tabacco è una delle colture più utilizzate come piattaforma per il molecular farming ed è stato geneticamente ingegnerizzato per la produzione di numerose sostanze come antibiotici, polimeri

(Ma J. K. *et al.*, 1995) e molecole anticancro come ad esempio interleukin-10, ecc.. (Brandle J. E. *et al.*, 2001).

Le terapie basate sull'uso di anticorpi monoclonali (immunoterapie) sono state sviluppate fortemente negli ultimi anni. Fin dal 1998, il 30% delle prove cliniche riguardanti le molecole derivate da tecniche biotecnologiche ha coinvolto gli anticorpi (Hudson P.J., 1998). Questa percentuale è aumentata negli ultimi 2 anni, con quasi 1000 anticorpi terapeutici che sono attualmente testati per immunoterapie contro le varie patologie quali, disordini del sistema immunitario, malattie infiammatorie, cancro, disordini del sistema nervoso centrale e malattie contagiose. Più di 10 anticorpi sono già stati convalidati clinicamente e più di 50 potranno essere somministrati clinicamente nei prossimi 5 anni. L'immunoterapia richiede spesso grandi quantità di anticorpi per il trattamento del cancro al seno, ad esempio è necessaria la somministrazione al paziente di 2-5 g dell'anticorpo "Herceptin" all'anno.

Attualmente, la maggior parte degli anticorpi ricombinanti approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) sono prodotti in colture cellulari di ovaia di criceto cinese (CHO). Questo processo è altamente costoso ed ha una resa limitata.

Le ditte farmaceutiche sono profondamente interessate a sistemi transgenici che permettono elevati livelli di produzione di anticorpi terapeutici.

Le cellule delle piante possono riprodurre la complessità di queste proteine, come evidenziato nel 1989 con la prima produzione di anticorpi funzionali in vegetali; da qui si è passati alla produzione di molti anticorpi o frammenti di anticorpo per scopi terapeutici in vari sistemi, in particolare anticorpi in piante diretti contro le immunoglobuline umane (Igs), contro un antigene da *Streptococcus mutans*, contro una chinasi umana della creatina, contro un antigene tumorale espresso nel cancro del colon e contro antigeni tumore-specifici.

Di conseguenza, l'uso delle piante transgeniche è stato visto come una soluzione all'esigenza di produrre anticorpi terapeutici su larga scala. Effettivamente, anche con livelli relativamente bassi di espressione delle proteine solubili totali, la

produzione degli anticorpi ricombinanti in piante transgeniche è quasi illimitata, poichè dipende soltanto dalla superficie dedicata alla coltivazione della pianta. Anche se dipendente dalla stabilità della proteina di interesse e dalla pianta utilizzata (tabacco, mais, soia o erba medica), il processo vede una pianta come un bioreattore che permetterà la produzione delle proteine ricombinanti nell'ordine di chilogrammi per ettaro, indipendentemente dal materiale vegetale considerato. Un altro vantaggio della produzione dell'anticorpo in piante transgeniche, rispetto alle metodiche di produzione classiche in colture cellulari di mammiferi, è il costo che si ridurrebbe di circa 500 volte. Tenendo conto dei costi e delle difficoltà di produzione di anticorpi attraverso i mezzi convenzionali, sembra che la produzione nelle piante coltivate sia una delle opzioni più promettenti per una produzione su larga scala di queste molecole. Soltanto i mammiferi transgenici hanno potuto presentare una resa di produzione dell'anticorpo equivalente a quella valutata per le piante transgeniche. L'efficienza di questo sistema di produzione è stata ben documentata, come circa 100 proteine ricombinanti che già sono state espresse nel latte degli animali transgenici; tuttavia, questo sistema presenta alcune limitazioni come ad esempio la produzione di alcune proteine ricombinanti, quali gli anticorpi terapeutici, che potrebbero disturbare il metabolismo dell'animale transgenico. Inoltre, le PMPs (plant-made pharmaceuticals) non possono essere contaminate da agenti patogeni umani, mentre ci sono ancora dubbi circa la contaminazione delle proteine ricombinanti, espresse nel latte dei mammiferi transgenici, da parte di agenti patogeni con caratteristiche umano-transmissibili.

Molte specie di piante sono state utilizzate con successo per produrre anticorpi biologicamente attivi. In tabacco, erba medica ed in altre specie, l'espressione è diretta nelle foglie, mentre in patata, mais, soia, frumento o riso, la produzione e l'accumulazione degli anticorpi ricombinanti si presenta nei tuberi o nei semi. Entrambe le strategie di produzione presentano i loro vantaggi e svantaggi. Le foglie presentano un metabolismo attivo e complesso che offre molte possibilità, ma contengono anche un'attività notevole delle proteasi che limitano l'accumulo

di alcune proteine. I semi presentano il vantaggio nell'aver un basso contenuto idrico e quindi rappresentano un luogo più stabile di accumulazione. Finora, la maggior parte degli anticorpi ricombinanti prodotti nelle piante sono stati prodotti nell'apoplasto basandosi sull'efficienza di un peptide di segnale per designare una proteina bersaglio per la secrezione. Tuttavia, i risultati recenti hanno indicato che il mediatore di H/KDEL nel reticolo endoplasmico (ER) potrebbe presentare parecchi vantaggi, compreso un forte aumento nella stabilità della proteina ricombinante (Pagny S. *et al.*, 2003) e prevenzione dell'aggiunta del complesso (esempio immunogeno) N-glycans su piante produttrici di anticorpi. Anche l'espressione di PMP(s) nel cloroplasto offre molti vantaggi, ad esempio unendo livelli elevati di espressione e bassa attività proteolitica, una proteina di interesse espressa in questo organello potrebbe rappresentare fino al 20% delle proteine totali del cloroplasto. Questo organello è adatto alla produzione di molecole in grado di legare antigeni semplici, quali ad esempio le VHH delle IgG ma, sorprendentemente, i cloroplasti del tabacco sono capaci legare proteine complesse con i ponti bisolfuro come somatotropina umana (Staub J.M. *et al.*, 2000) e altri anticorpi di grandi dimensioni (Daniell H. *et al.*, 2001). Una conoscenza migliore dei segnali e dei meccanismi responsabili della proteina per l'utilizzo del vacuolo come immagazzinamento aiuterà ulteriori indagini sui vantaggi e sulle limitazioni di accumulo di PMP(s) in questo scompartimento.

Le cellule vegetali sono in grado di riprodurre la complessità delle proteine umane. Le omologie riferite alla biosintesi e maturazione di proteine ottenute in sistemi vegetali e animali sono ben illustrate attraverso l'abilità della pianta di produrre vari tipi di anticorpi ricombinanti, quali IgGs o secretori dell'IgAs (sIgAs). Gli anticorpi sono molecole complesse. Le immunoglobuline della classe delle IgG sono tetrameri che consistono di due polipeptidi di 450 amminoacidi (catene pesanti) e di due polipeptidi di 250 amminoacidi (catene leggere). Questi quattro polipeptidi IgG-costituenti sono collegati insieme da ponti bisolfuro. La complessità di un'sIgA è ancora più grande, in quanto queste immunoglobuline si compongono di due molecole di IgA collegate insieme da due polipeptidi.

L'assemblaggio di un'sIgA richiede l'azione di due differenti tipi di cellule di mammifero. sIgA, IgGs ed IgAs sono state prodotte con successo in piante transgeniche e ciò illustra l'abilità presentata dalle cellule della pianta per assemblare le proteine "animali" anche quando quest'ultime sono estremamente complesse. Tuttavia, sono necessari altri studi per spiegare perché i secretori di IgA/IgGs sono stati trovati in scompartimenti sottocellulari differenti, quale il vacuolo ed il ER di tabacco, anziché nell'apoplasto, come era stato invece previsto che fosse (Frigerio L. *et al.*, 2000). Questa distribuzione eterogenea dell'anticorpo ricombinante nella cellula della pianta potrebbe derivare da una conformazione impropria o da un ospite inadatto. Purtroppo, l'induzione di grande eterogeneità strutturale nel PMP può essere dovuta a una differente maturazione proteolitica che avviene sulle proteine del ER, vacuolo e apoplasto. La maturazione di N-glycan è inoltre il riflesso della localizzazione di una glicoproteina nella via secretiva e l'eterogeneità osservata nella glicosilazione di IgGs prodotti in tabacco potrebbe essere spiegata con questa distribuzione eterogenea (Cabanes-Macheteau M. *et al.*, 1999; Bakker H. *et al.*, 2001). In contrasto, un IgG prodotto in erba medica presenta una struttura molto omogenea di N-glycan, che potrebbe essere spiegata da un'alta efficienza della secrezione e/o del tipo di assemblaggio delle proteine in questo sistema di espressione della pianta (Bardor M. *et al.*, 2003).

La corretta conformazione e assemblaggio delle molecole dell'anticorpo prodotte nella pianta all'interno del ER, attraverso interazioni con un certo numero di chaperoni, processi vari ed enzimi di glicosilazione, illustrano che gli eventi di maturazione co- e post-translazionale della proteina sono simili in piante e in mammiferi. Tuttavia, gli anticorpi prodotti in cellule di mammiferi differiscono nella loro N-glicosilazione da quelli prodotti in un sistema vegetale. Ciò è spiegato con l'anticorpo monoclonale Guy's 13, il quale è specifico per una adesina di *Streptococcus mutans*, l'agente patogeno principale che contribuisce allo sviluppo della carie dentale. Una volta prodotto in cellule di mammiferi, questo IgG1 è glicosilato su due siti dell'N-glicosilazione con strutture

oligosaccaridiche (N-glycans) che presentano un residuo α -(1,6)-fucose e circa il 10% di acido sialico terminale. Una volta prodotto in cellule transgeniche di tabacco, l'anticorpo del tipo Guy's 13 è inoltre glicosilato su entrambi i siti dell'N-glicosilazione. Tuttavia, l'N-glicano sopportato da questo anticorpo è del tipo alto-mannosio (strutture comuni alle piante ed ai mammiferi) e del tipo complesso, con caratteristiche tipiche per le piante, come β -(1,2)-xilosio e α -(1,3)-fucosio. L'eterogeneità glicano simile e le caratteristiche strutturali sono state descritte per un altro anticorpo monoclonale (Mgr48) prodotto in tabacco (Bakker *et al.*, 2001). Contrariamente agli IgG espressi nelle piante del tabacco, l'N-glicosilazione di un anticorpo derivato dall'erba medica (C5-1) si limita ad una catena matura predominante dell'oligosaccaride che ha un nucleo α -(1,3)-fucosio, una bisezione β -(1,2)-xylosio e due residui terminali di GlcNAc. Anche se l'omogeneità della glicosilazione potrebbe differire da un sistema di espressione della pianta all'altro, tutte le specie vegetali utilizzate finora per produrre PMPs hanno la capacità di associare i residui di α -(1,3)-fucosio e di β -(1,2)-xylosio sul complesso N-glicano (Bakker H. *et al.*, 2001; Bardor M. *et al.*, 2003; Samyn-Petit B. *et al.*, 2003).

Recentemente, gli esperimenti in vivo che usano cavie BALB/c hanno indicato che gli anticorpi prodotti in piante di tabacco non rispondono immunologicamente contro i loro glycans N-collegati dell'origine vegetale (Chargelegue D. *et al.*, 2000). Complessivamente, questi dati ottenuti in mammiferi da laboratorio sollevano il problema dell'utilizzo di questi glyco-epitopes nel contesto di una terapia umana basata su PMPs. Sono state svolte delle analisi per capire questo problema indagando la loro immunizzazione in roditori, ed è stato trovato che, in mouse C57BL/6 ed in ratti (non i mouse BALB/c) l'immunizzazione con una glicoproteina modello, perossidasi del rafano, ha provocato la produzione degli anticorpi specifici per i glyco-epitopes di ss(1,2)-xylosecontaining e di α -(1,3)-fucose. E' stato dimostrato che circa il 50% dei donatori umani non-allergici contengono nei loro anticorpi dei sieri specifici per i glycoepitopes di ss(1,2)-xylose, mentre il 25% hanno anticorpi contro l' α -(1,3)-glyco-epitope del fucose

(Bardor M. *et al.*, 2003). Questi anticorpi probabilmente derivano dalla sensibilizzazione agli antigeni ambientali. Anche se l'importanza immunologica degli anticorpi di anti-ss(1,2)-xylose e di anti- α -(1,3)-fucose è troppo speculativa al momento, la presenza di tali anticorpi può indurre un rapido sviluppo di glicosilato, che può notevolmente compromettere la loro efficacia come agenti terapeutici in vivo. Gli effetti clinici che derivano dalla risposta immunitaria causata tramite la gestione di prodotti pianta-derivati, le glicoproteine in pazienti allergici e non-allergici sono discutibili. Di conseguenza, dato che le preoccupazioni sulla sicurezza sono state riferite all'uso delle proteine terapeutiche pianta-derivate, ulteriori esperimenti dovrebbe essere effettuati in un modello animale adatto, come pure in volontari umani, somministrando una glicoproteina terapeutica prodotta in una pianta ed analizzando le risposte immunitarie ai glyco-epitopes della pianta in popolazioni allergiche e non-allergiche. Inoltre c'è da dire che anche quando gli anticorpi sono prodotti in sistemi animali di espressione, contengono residui non umani dello zucchero, quale la forma acida di N-glycosylneuraminic (Neu5Gc) dell'acido sialico (anticorpi prodotti in cellule di CHO ed in latte) o del terminale α -(1,3)-galactose (anticorpi prodotti in cellule murine). È stato indicato che gli anticorpi che contengono questi residui dello zucchero possono anche provocare effetti secondari indesiderabili, compresa una risposta immunitaria in esseri umani (Gomord V. *et al.*, 2004).

Sul discorso che le proteine vegetali hanno residui differenti dello zucchero dalle proteine umane o animali, il Freiburg greenovation Biotech GmbH, in collaborazione con il gruppo di ricerca del professor Reski all'università di Freiburg, ha indicato che questo problema può essere risolto con l'uso di *Physcomitrella patens*. Poiché gli scienziati coltivano il muschio in mezzo liquido in un tubo a forma di fotobioreattore, non hanno alcuna preoccupazione che il materiale geneticamente modificato possa essere rilasciato nell'ambiente.

Il Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology in Stuttgart sta focalizzando lo sviluppo e l'ottimizzazione dei fotobioreattori in cui le colture

cellulari della pianta sono utilizzate per produrre le proteine. A tal fine stanno valutando l'utilizzo dell'alga *Haematococcus pluviialis* in bioreattori come organismi di produzione.

Malgrado i problemi connessi con il rilascio e la produzione delle piante transgeniche, un numero considerevole di gruppi di ricerca sta studiando l'agricoltura molecolare su piante tradizionali da pieno campo. Il Dott. Gabi Krczal dell'istituto AIPianta per la ricerca della pianta in Neustadt sta lavorando con piante di tabacco che possono produrre il bryodin. Questa proteina, che è prodotta nelle radici del bryonia, disattiva i ribosomi; si sta esaminando il relativo effetto contro l'infezione da HIV e i T-linfomi.

Un vaccino ricombinante prodotto dalla glicoproteina di superficie S di TGEV porcine (virus trasmissibile di gastroenterite) è stato prodotto in piante di mais e tabacco. Questo è il primo esempio di una protezione riuscita a seguito di una vaccinazione somministrata agli animali attraverso il loro foraggio.

Un rapporto presentato negli Stati Uniti (Nevitt *et al.*, 2003), focalizzato solo sull'uso del tabacco come raccolto modello di PMF, ha trovato appoggio da parte di molte organizzazioni e rappresentanti agricoli di aziende biotecnologiche, ma le preoccupazioni sono state espresse circa gli impatti ambientali e la capacità regolatoria. Il Canada Biotechnology Secretariat ha richiamato le PMF nel relativo lavoro semiannuale di indagine sulla biotecnologia con due domande per sostenere due applicazioni di PMF: la produzione di interleukin, un enzima per i trattamenti di salute (80% ha sostenuto questa applicazione) e della produzione della plastica biodegradabile (78% ha sostenuto questa applicazione) (Einsiedel E. F. e Medlock J., 2005).

Scienziati della UCT stanno usando piante geneticamente modificate di tabacco per produrre vaccini contro il cancro cervicale. Mirano a generare vaccini che combattono il virus sviluppando piante di tabacco in serra umida. Queste piante sono geneticamente modificate e portano la "barriera" del virus umano del papilloma che causa il cancro cervicale che è considerato la causa maggiore di mortalità delle donne nell'Africa del sud; esso è particolarmente difficile da

identificare in modo preventivo poiché è localizzato in profondità all'interno del sistema riproduttivo femminile.

Il virus umano del papilloma è particolare difficile se non quasi impossibile da coltivare per cui è necessario trovare qualcosa che il sistema immunitario riconosca che però non sia il virus stesso, quindi è possibile produrre una parte del virus, che è la proteina del capsido, ovvero quella che il sistema immunitario riconosce. Ciò è fattibile in diversi sistemi e l'intento è quello di rendere la sua produzione in sistemi vegetali una realtà. L'innesco che rende il virus contagioso è l'acido nucleico al suo interno, ma l'intento è quello di produrre solo la proteina del capsido riconosciuta dal sistema immunitario per scaturire la reazione di difesa.

In Sudafrica ci sono alcune malattie per le quali sembra non conveniente sviluppare vaccini, a causa del loro elevato costo di produzione (circa cento milioni di dollari US) dato che il mercato sarebbe molto ristretto. C'è da pensare anche che una dose di gocce contro la poliomelite prodotta su commissione porterebbe considerevolmente meno soldi rispetto all'uso di pillole antidepressive che devono essere prese giornalmente per il resto della vita del paziente. Ma ci sono sforzi internazionali importanti in paesi quali India, Brasile, Cina e Argentina per la produzione pubblica di vaccini in quanto le malattie che non si presentano in Europa o negli Stati Uniti non vengono prese in considerazione per la produzione di tali molecole o non ne ottengono il giusto tipo; ad esempio in Africa, non verrà necessariamente ottenuta la molecola adatta per il sottotipo dell'HIV, senza contare che le molecole ad azione terapeutica ottenute in Europa o negli Stati Uniti sono molto costose; il vaccino per l'epatite B, ad esempio, inizialmente aveva un costo di circa 40\$ per dose, mentre attualmente, a distanza di 15 anni dall'inizio della sua produzione, il suo prezzo è calato vertiginosamente, tanto che, oggi, una dose costa circa a 1\$. Per cui, c'è da pensare che, ad oggi, il vaccino per il virus del cancro cervicale sarà troppo costoso per le tasche del terzo mondo e che, quindi, una produzione massale in sistemi vegetali potrebbe essere una soluzione al problema (www.pub.ac.za).

Scienziati dell'Università Medica di Jefferson stanno usando piante di tabacco per produrre anticorpi monoclonali che possono cercare e distruggere le cellule del cancro. Tali anticorpi sono stati prodotti in topi con la procedura standard e riconoscono un tipo particolare di antigene sulle cellule umane del cancro coloretale; essi sono stati usati nel trattare malattie metastatiche e nell'impedire la ricorrenza in pazienti ad alto rischio; tuttavia la tecnologia per produrre grandi quantità di anticorpo è molto costosa ed i ricercatori vorrebbero trovare alternative più economiche. Il Dott. Koprowski e i suoi collaboratori hanno somministrato gli anticorpi monoclonali prodotti in piante di tabacco su topi infettati con il virus in questione per scoprire se tali anticorpi, previa purificazione, potessero essere efficaci per una immunoterapia del cancro. Per far ciò hanno iniettato, in un primo momento, le cellule di cancro in topi messi a nudo del loro sistema immunitario e, successivamente gli anticorpi pianta-derivati. Hanno monitorato lo sviluppo del tumore per 40 giorni, trovando una inibizione di quest'ultimo in modo simile a quello degli anticorpi monoclonali mammifero-derivati. Anche da questi risultati si può evincere, quindi, che le biotecnologie applicate alla pianta del tabacco possono essere un'alternativa utile per produrre anticorpi monoclonali paragonabili a quelli prodotti in cellule animali. L'anticorpo tabacco-derivato dovrebbe essere più sicuro e meno costoso da produrre.

Sono in corso studi sull'efficacia degli anticorpi monoclonali pianta-derivati contro altri tipi di cancro, comprese le cellule del tumore del seno e del tumore del polmone in animali da laboratorio (<http://www.jeffersonhospital.org>; www.bio-pro.de).

1.3 COSTI E RISCHI PER L'AMBIENTE

Le piante, come già illustrato, possono fornire grandi quantità di PPIs (transgenic plant derived products of interest) ad un costo inferiore rispetto alle tecnologie correntemente utilizzate, che prevedono l'impiego di cellule batteriche ed animali. I sistemi di produzione agricola nei quali il Molecular farming potrebbe inserirsi, infatti, sono molteplici e, nella maggior parte dei casi, il processo di coltivazione non dovrebbe subire grosse modifiche, se non quelle necessarie per adattarsi alle forze economiche e di mercato della zona; la produzione di queste piante a scopo farmacologico può essere effettuato, oltre che su larga scala, anche in laboratori o serre. Per alcune molecole terapeutiche (spesso costose), infatti, potrebbe essere sufficiente mettere a coltura anche un'area abbastanza piccola, nell'ordine di alcune decine di serre, per riuscire a soddisfare gran parte dei fabbisogni necessari; per altre molecole invece, come quelle interessate nella produzione di plastica biodegradabile, possono essere richiesti migliaia o persino milioni di ettari. Il Molecular farming, quindi, potrebbe interessare terreni attualmente coltivati e rappresentare una componente aggiunta di diversificazione alla produzione agricola. Questo può andare ad incidere sulla biodiversità locale e regionale sia all'interno che al di fuori del paesaggio coltivato. I cambiamenti futuri nell'agricoltura che ne potrebbero derivare saranno probabilmente specifici a seconda della regione, del tipo di raccolto e, probabilmente, della sostanza prodotta, poiché queste variabili sono associate a differenti regimi agricoli (per esempio, livello di inputizzazione della coltura, il livello di intensificazione adottato, ...).

A fronte a questi cambiamenti che potrebbero dare una svolta positiva al mondo agricolo, al Molecular farming applicato alle piante sono associati anche tutta una serie di rischi che non possono essere sottovalutati. In primo luogo la coltivazione di essenze vegetali che portano, al loro interno, molecole ricombinanti sia ad uso terapeutico che non, può portare ad una esposizione dell'intero ambiente a queste

nuove sostanze che potrebbero avere ripercussioni negative sulla biodiversità. Alcune PPIs, infatti, possono avere effetti tossici sugli animali (a seconda dei residui e delle concentrazioni) o, comunque, provocare modificazioni fisiologiche o comportamentali; in alcuni casi è ipotizzabile che si verifichino fenomeni di incremento della resistenza agli antibiotici da parte dei patogeni. La coltivazione di queste piante bioingegnerizzate, inoltre, espone direttamente tutta la fauna selvatica a queste molecole “estranee” che, a seguito dell’ingestione diretta di polline, fiori, foglie, frutti, semi e radici, possono risalire, in modo incontrollato, i vari gradini della catena alimentare fino a raggiungere le nostre tavole. Altri possibili tipi di esposizione possono derivare dalla decomposizione dei residui di queste piante nel terreno, a seguito della loro coltivazione, o dalle perdite di materiale vegetale che possono incorrere durante il trasporto. Le PPIs possono interessare anche ecosistemi acquatici o la fauna del terreno a causa dei possibili fenomeni di percolazione delle feci e dell’urina della fauna selvatica che si alimenta su tali raccolti e la perdita dalle radici dagli essudati del terreno. In alcuni tipi di terreno, le PPIs potrebbero legarsi alle superfici delle particelle che lo compongono (argille e sostanze umiche), e ciò potrebbe ritardare la biodegradazione di tali sostanze che risulterebbero, quindi, persistenti nell’ambiente.

Uno dei maggiori rischi legati alla coltivazione delle piante transgeniche in generale e di quelle per il Molecular Farming in particolare, resta, comunque, quello derivante dalla deriva genetica, che ha destato e continua a destare molte preoccupazioni anche per la “prima generazione” di colture transgeniche (quelle con caratteristiche aggiunte quali la tolleranza ai diserbanti e la resistenza agli insetti). I fenomeni che si possono verificare sono riconducibili al trasferimento orizzontale dei geni per le PPIs alle colture per uso alimentare o alle specie spontanee attraverso incroci e formazione di ibridi fertili contenenti tali geni. Il colza, ad esempio, possiede molte piante spontanee con cui potersi incrociare.

In questo modo, quindi la presenza accidentale di queste molecole potrebbe interessare anche i sistemi di produzione convenzionali.

Il rischio di questa contaminazione, inoltre, è particolarmente importante proprio in virtù della potenziale dannosità biologica delle PPIs all'interno della catena alimentare, mentre, molte delle piante bioingegnerizzate della prima generazione, come le colture resistenti agli insetti, possono non presentare problemi di questo tipo (David A. e Kirk D.A., 2002).

Per la coltivazione delle piante nel Molecular farming sono quindi necessarie delle misure di prevenzione a partire da quelle comunemente utilizzate, ad oggi, per la coltivazione delle piante GM come, ad esempio, il mantenimento di distanze minime di sicurezza tra i campi interessati da una coltura GM e quelli di tipo convenzionale. Inoltre, sono stati studiati molti metodi di contenimento per i geni che esprimono PPIs, compreso l'apomissia, il controllo della dormienza del seme, le barriere di incompatibilità, la maschio-sterilità, i sistemi gene-lock e la trasformazione del cloroplasto. Un fatto di cui si tiene particolarmente di conto è che una vasta gamma di sostanze biologicamente attive sarà prodotta dal Molecular farming e relativamente poco è conosciuto circa il destino o gli effetti di molti di questi prodotti nell'ambiente; occorre quindi approfondire le conoscenze relative al rischio di bioaccumulo e di eccessiva persistenza che, a lungo termine, potrebbero causare cambiamenti nelle comunità naturali. In relazione alla tipologia del prodotto e al suo livello di espressione in campo, la coltivazione di queste "biofabbriche" porta, comunque, ad una espansione dell'interfaccia esistente tra la molecola farmaceutica e gli ecosistemi naturali/semi-naturali (in gran parte attraverso i sistemi di acque di scolo, sia di animali domestici che di esseri umani, ed i mezzi acquatici) con un conseguente aumento del rischio di inquinamento ambientale. Dal punto di vista della biodiversità, infine, non è facile valutare l'importanza degli effetti sulla popolazione sia a livello di comunità biologica che sul singolo individuo (David A. e Kirk D.A., 2002).

2. SCOPO DELLA RICERCA

La distanza genetica esistente tra le piante e l'uomo rappresenta un grosso vantaggio nella produzione di proteine terapeutiche tramite Molecular Farming in quanto si riducono fortemente i rischi legati al trasporto di patogeni dannosi alla salute umana, è possibile produrre e configurare correttamente anche proteine complesse e, inoltre, i processi di estrazione risultano semplificati poiché, nei vegetali, non esistono proteine farmacologicamente attive simili a quelle umane. Il maggiore vantaggio risiede, tuttavia, nei costi di produzione che sono estremamente più ridotti rispetto a quelli che contraddistinguono le attuali tecniche di produzione di proteine ricombinanti.

Il tabacco, a livello di letteratura, ha una lunga storia come coltura di successo per la Molecular Farming ed è, quindi, uno dei candidati principali per la produzione commerciale di proteine ricombinanti (Fisher *et al.*, 1999; Galeffi *et al.*, 2005; Larrick e Thomas, 2001; Marrow, 2002). I vantaggi maggiori risiedono nella consolidata tecnologia a livello di trasferimento ed espressione dei geni, nell'alta resa in biomassa, nella prolifica produzione di seme e nell'esistenza di una larga scala di infrastrutture per la lavorazione del materiale vegetale. Dal momento che il tabacco non viene utilizzato nell'alimentazione umana e animale, il rischio di una contaminazione della catena alimentare è molto ridotto.

L'obiettivo della seguente tesi, quindi, è stato quello di valutare la capacità di espressione, a livello qualitativo, di un gene marcatore (gene GUS) in due varietà di *Nicotiana tabacum* tra le più produttive in termini di biomassa vegetale, quali, *Kentucky* e *Maryland Mammoth*, ponendole a confronto con il tabacco *Petit Havana SRI*, una tra le piante che sono state maggiormente utilizzate in campo sperimentale per tale scopo ma che risulta caratterizzata da una ridotta capacità produttiva in termini di biomassa.

L'indagine sul possibile impiego di queste varietà "produttive" in qualità di biofabbriche per la produzione di molecole ricombinanti ad azione terapeutica,

previa successiva trasformazione con il gene di interesse terapeutico rientra in un progetto più ampio di collaborazione tra la Facoltà di Agraria dell'Università di Pisa e l'azienda Floramiata.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Preparazione del materiale vegetale da trasformare

Nella presente prova, che ha avuto luogo presso i laboratori dell'azienda Floramiata di Piancastagnaio (SI) nel periodo compreso tra il giugno del 2005 e il giugno del 2006, sono state prese in considerazione 3 varietà di *Nicotiana tabacum*: *Petit Havana SRI*, *Maryland Mammoth* e *Kentucky*.

I semi di tabacco, prima di essere messi a germinare, sono stati sottoposti ad un processo di sterilizzazione che è stato effettuato ponendo (per un minuto) in eppendorff contenente etanolo al 70%, un centinaio di semi per ciascuna delle varietà in esame; a questo trattamento sono seguiti 3 lavaggi con H₂O distillata sterile e, successivamente, le eppendorff sono state riempite con ipoclorito di sodio all'1% e tenute in agitazione per 15 minuti; al termine sono stati eseguiti 4 lavaggi con H₂O distillata sterile.

A seguito di questo trattamento i semi sono stati, quindi, posti a germinare in piastre contenenti mezzo Murashige and Skoog con macroelementi, microelementi e vitamine ridotti del 50% (d'ora in poi indicato con MS/2) (vedi paragrafo 3.1); le piastre sono state, poi, messe ad incubare in termostato a 24°C. Dopo che i semi sono germinati, è avvenuto il trasferimento, in condizioni sterili, in magenta contenenti mezzo MS/2 fresco per la crescita delle piantine (4 per ogni barattolo); le magenta sono state incubate in camera di crescita a 24°C impostando il fotoperiodo su 16 ore di luce e 8 ore di buio.

Come controllo, per verificare che dai semi si formassero piante wt, sono state utilizzate 3 piccole piastre Petri con mezzo MS/2 e 3 piccole piastre Petri con mezzo MS/2 + Kanamicina sulle quali sono stati fatti germinare i semi di ciascuna varietà; a germinazione avvenuta, dopo una settimana circa di incubazione, nelle piastre contenenti l'antibiotico tutte le piante erano morte o presentavano visibilmente i sintomi di una condizione di stress molto avanzata (ingiallimento).

3.2 Trasformazione

La trasformazione del tabacco è stata effettuata tramite infezione operata da *Agrobacterium tumefaciens*. È stato utilizzato il ceppo LBA4404/pBI121 contenente il gene per la β -glucuronidasi (GUS). Il materiale per l'infezione è stato prodotto partendo da una coltura in piastra di questo batterio dal quale è stata asportata, con un'ansa sterile, una colonia singola che è stata successivamente posta in una provetta con 2 ml di LB broth + Kanamicina ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) + Rifampicina ($30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); allo scopo di assicurarsi che non ci fossero contaminazioni da parte di altri batteri comunemente utilizzati in laboratorio il tutto è stato, quindi, incubato a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ per 48 h a 250 rpm (giri per minuto); il rapporto "coltura/volume totale" nella provetta non doveva essere inferiore a 1:3 affinché venisse favorita una buona ossigenazione della coltura stessa.

Dopo l'incubazione sono stati prelevati con una pipetta $50 \mu\text{l}$ della coltura e posti in una eppendorff sterile con $50 \mu\text{l}$ di glicerolo al 40% (la concentrazione finale di glicerolo doveva essere pari al 20%), il tutto è stato messo a -80°C per avere lo stock in glicerolo del batterio. Da questo sono stati, quindi, prelevati $15 - 20 \mu\text{l}$ e sono stati introdotti in una provetta contenente $5 - 10 \text{ ml}$ di LB broth + Kanamicina + Rifampicina alle concentrazioni di cui sopra ed il tutto è stato messo ad incubare O/N a 250 rpm ad una temperatura di $28 \text{ }^\circ\text{C}$.

Per le successive operazioni la coltura liquida doveva presentare un $\text{OD}_{600\text{nm}}$ pari a 0,02, quindi, il giorno successivo $0,5 \text{ ml}$ della coltura precedentemente ottenuta sono stati utilizzati per effettuare la lettura allo spettrofotometro (a $\text{OD}_{600\text{nm}}$) e determinare, così, di quanto fosse necessario diluire la soluzione; per tale determinazione il valore ottenuto dall'analisi è stato introdotto nella seguente formula:

$$V_i \cdot c_i = V_f \cdot c_f$$

dove:

V_i è l'incognita;

c_i è la concentrazione iniziale che si legge sullo spettrofotometro a OD_{600nm} ;

V_f è il volume finale che si vuole ottenere (in questo caso 50 ml)*;

c_f è la concentrazione finale che si vuole ottenere (nel nostro caso 0,02).

* senza antibiotici (Kanamicina e Rinfampicina).

Una volta diluito alla concentrazione voluta, il tutto è stato messo in una beuta in incubazione a 28 °C, 250 rpm, per 4-6 h; a questo punto sono stati prelevati 0,5 ml della coltura per misurarne l' OD_{600nm} allo spettrofotometro, la lettura doveva dare $OD = 0,1$ in quanto, in questa fase, la coltura segue una crescita esponenziale, per cui l'infezione è più efficiente.

Una volta ottenuto $OD = 0,1$, è stata presa tutta la coltura incubata ed è stata centrifugata a 3000 g per 15 minuti; il supernatante è stato scartato ed il pellet risospeso in un volume di MS/2 liquido pari a quello calcolato precedentemente.

Nel caso in esame OD_{600nm} era pari a 2,092, per cui il tutto è stato diluito in rapporto 1:100 per ottenere una soluzione con $OD_{600nm} = 0,020 - 0,025$, pronta per essere utilizzata per la trasformazione (il materiale utilizzato quali pipette, eppendorff, puntali, provette e terreni, era rigorosamente sterile).

Sempre in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare, dalle foglie delle 3 varietà di tabacco sono stati asportati alcuni espianti rettangolari, delle dimensioni di circa 4x8 mm, facendo in modo che tutti i lati fossero tagliati per favorire l'introduzione da parte del batterio. Queste sezioni fogliari sono state mantenute in MS liquido per evitare che si seccassero. Quando è stato ottenuto il numero di espianti desiderato, che permettesse di avere 3 piastre per varietà di trasformati e 1 piastra per il controllo, questi sono stati infettati con la soluzione di

Agrobacterium tumefaciens precedentemente creata, tenendoli in immersione ed in agitazione per un tempo di 2 minuti; gli espianti sono stati, quindi, asciugati (con carta assorbente sterile) per togliere l'eccesso di *Agrobacterium* e successivamente trasferiti su un terreno per la rigenerazione dopo l'infezione; tale terreno era un MS/2 contenente l'auxina IBA, acronimo di acido indolbutirrico, e la citochinina BAP acronimo di 6-benzilamminopurina, d'ora in poi indicate con I/B, entrambe alla concentrazione di $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; il tutto incubato per 48 ore a 24°C . Per poter effettuare un controllo del processo di trasformazione sono stati preparati 2 tipi di espianti: infettati e non infettati; dopo le 48 ore di incubazione è stato preparato un mezzo di crescita con le stesse caratteristiche del precedente il quale conteneva in più gli antibiotici Kanamicina, Vancomicina e Cefotaxime (d'ora in poi KVC), alle concentrazioni di $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ per tutti. A questo punto 50 espianti non infettati di ogni varietà sono stati trasferiti su mezzo fresco, 25 su MS/2 I/B e 25 su MS/2 I/B + KVC per valutare l'effettiva funzionalità del mezzo selettivo. Infatti, dopo l'incubazione, gli espianti su mezzo contenente KVC dovranno essere tutti morti, mentre quelli su mezzo senza gli antibiotici dovranno essere tutti vivi. In contemporanea sono stati trasferiti tutti gli espianti trasformati di tutte e tre le varietà su mezzo MS/2 I/B + KVC dopodiché si è proceduto con l'incubazione in camera di crescita a 23°C .

Per ottenere un numero di espianti tale da avere un significato statistico, sono state effettuate tre trasformazioni in tempi successivi, al fine di ottenere un minimo di 200 espianti per varietà.

Da questi si è avuta la produzione di callo ed è stato necessario effettuare un trasferimento, ogni 2 settimane, su mezzo fresco contenente ormoni ed antibiotici fino alla formazione degli *shoots*.

3.3 Saggio per l'espressione del gene nelle singole linee "trasformate"

Quando gli *shoots* avevano raggiunto un'altezza minima di 1 cm, sono stati prelevati dal callo e trasferiti su mezzo fresco MS/2 + KVC + IBA (quest'ultimo alla concentrazione di $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) per stimolarne la radicazione. Durante il loro periodo di crescita e sviluppo sono stati effettuati almeno 3-4 trasferimenti su nuovo mezzo contenente gli antibiotici KVC, per eliminare l'eventuale presenza dell'*Agrobacterium* nel tessuto vegetale. Le piante, quindi, sono state tenute in camera di crescita con fotoperiodo 16/8 ad una temperatura di 23-24°C.

Tali *shoots* hanno portato alla formazione di piantine con un proprio apparato radicale e fogliare che hanno quindi rappresentato le singole linee "trasformate" per ogni varietà in questione.

Una volta che sono state ottenute un minimo di 100 linee per ogni varietà è stato possibile passare al saggio GUS delle linee a disposizione, al fine di valutare quali tra di esse esprimevano il gene e se il livello di espressione del gene reporter era da considerarsi buono dal punto di vista quantitativo; questa operazione è stata effettuata 2 volte in modo che la selezione delle linee fosse più affidabile.

E' stato quindi preparato il buffer per il saggio in questione; successivamente sono state preparate delle piccole sezioni fogliari per ogni varietà, di circa 3x5 mm, assicurandosi che tutti e 4 i lati dei campioni di foglia fossero stati tagliati in modo da favorire l'infiltrazione della soluzione per il saggio. Le sezioni sono state preparate per tutte le linee e messe separatamente in eppendorff ciascuna contenente 300 µl della soluzione del buffer.

Utilizzando un essiccatore ed una pompa per il vuoto, è stato fatto infiltrare il liquido sotto vuoto e il tutto messo ad incubare a 37°C *overnight* al buio e in agitazione a 80 rpm.

Il giorno successivo i campioni in esame sono stati decolorati attraverso una scala di etanolo a concentrazioni crescenti, quali: 25, 50, 75, 95, 100%. Durante ogni passaggio i campioni sono stati tenuti in agitazione a 37°C per 30 minuti, con più passaggi in etanolo assoluto.

È stato possibile, quindi, individuare l'espressione del gene GUS nelle varie linee grazie alla colorazione bluastra assunta dai tessuti trasformati a seguito del trattamento sopra descritto.

Una volta identificate le linee positive, si è creata una doppia copia *in vitro* al fine di mantenere la linea nel tempo: una copia è stata lasciata in camera di crescita e una copia è stata portata in serra.

3.4 Produzione degli F1

Tra le linee risultate positive ne sono state selezionate 10 per ogni varietà allo scopo di farle crescere fino alla fase di produzione del seme. Le piantine, quindi, sono state trasferite in vasi contenenti un substrato costituito per l'80% da terreno di medio impasto e per il restante 20% da perlite; I vasi sono stati, quindi, mantenuti in camera di crescita ad una temperatura intorno ai 24-25°C ed un fotoperiodo del tipo 16/8 (ore luce/ore buio). Al fine di sopperire alle esigenze nutritive delle piante sono stati somministrati i principali elementi nutritivi con un concime di tipo Nitrophoska (18-11-18) distribuito alla concentrazione di 0,5 mg·L⁻¹, una volta alla settimana fino alla fioritura.

Raggiunta questa fase, le infiorescenze delle varietà *Petit Havana SRI* e *Maryland Mammoth* sono state incappucciate per evitare che si verificassero fenomeni in impollinazione incrociata ed assicurarsi, quindi, che la generazione F1 derivasse dall'autoimpollinazione delle singole linee.

La varietà *Kentucky*, di contro, essendo maschiosterile e presentando, quindi, fiori privi di antere, è stata impollinata con una linea di *Maryland Mammoth*, che era stata fatta crescere in parallelo.

Raggiunta la maturazione delle capsule contenenti i semi F1 delle varie linee, questi sono stati raccolti, sottoposti allo stesso processo di sterilizzazione descritto in precedenza e, successivamente, messi a germinare su kanamicina, al fine di

valutare il mantenimento del gene di resistenza presente nel plasmide utilizzato per la trasformazione.

A tale scopo sono state preparate 5 piastre Petri, una per ciascuna varietà in prova più i due controlli, quello negativo e quello positivo. Ogni piastra era stata preparata con il mezzo MS/2, mentre solo in quella per il controllo negativo l'antibiotico Kanamicina non era stato aggiunto. Dopo un periodo di incubazione al buio ad una temperatura di 24-25 °C, il risultato aspettato era che nel controllo negativo le piantine germinate morissero tutte, nel controllo positivo fossero tutte vive e nelle piastre contenenti i semi F1 delle 3 varietà trasformate si verificassero fenomeni di segregazione.

La prova successiva è stata quella di ripetere il saggio GUS sulle piantine F1 delle 3 varietà per verificare se quelle resistenti avessero mantenuto anche il gene marcatore inserito.

Le linee positive sono state selezionate, create in doppia copia in modo da avere sempre disponibile la linea *in vitro* e portate in camera di crescita fino alla fioritura per la produzione di semi F2 che, nel proseguimento della ricerca, subiranno il solito trattamento su kanamicina e sulla valutazione di espressione del gene della β -glucuronidasi in modo da avere linee omozigoti per il gene di interesse.

Le piante F1 di Kentucky sono state fatte incrociare con una linea positiva di Maryland Mammoth cresciuta in parallelo.

Questi dati verranno successivamente utilizzati per continuare il progetto che prevede di testare quantitativamente l'espressione del gene GUS nelle varietà prese in esame e successivamente testarle come produttrici di proteine ricombinanti a scopo farmaceutico mediante l'inserimento di opportuni geni per la produzione di anticorpi monoclonali. Gli stessi test verranno in seguito effettuati su altre varietà di tabacco per valutarne la capacità di espressione e di mantenimento del gene reporter inserito.

3.5 Terreni di crescita ed altri materiali

Nel presente lavoro sperimentale sono stati utilizzati terreni di crescita ed altri materiali preparati secondo quanto descritto di seguito:

Terreni di crescita

MS (Murashige and Skoog - 1962)

(Per 1 litro)

Macroelementi:

MgSO ₄ · 7H ₂ O	370 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440 mg
KNO ₃	1990 mg
NH ₄ NO ₃	1650 mg
KH ₂ PO ₄	170 mg

Microelementi:

FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,850 mg
Na ₂ EDTA	37,250 mg
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,300 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,600 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025 mg
AlCl ₃	0,025 mg
KI	0,830 mg
H ₃ BO ₃	6,200 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,025 mg

Saccarosio	30 – 50 g
------------	-----------

Vitamine:

Mio-inositolo	100 mg
Acido nicotinico	0,5 mg
Piridoxina HCl	0,5 mg
Tiammina HCl	0,1 mg
Glicina	2 mg

Modifiche apportate:

- La concentrazione di tutti i sali e vitamine è stata ridotta del 50%;
- La concentrazione di saccarosio utilizzata è stata del 2%;
- La concentrazione di agar utilizzata per il mezzo solido è stata dello 0,7%;
- Il pH del mezzo è 5,8.

LB broth (Luria - Bertani)

Triptone	1 %
Estratto di lievito	0,5 %
NaCl	0,5 %

E' stato utilizzato LB broth DIFCO™, Becton Dickinson:

- Sciogliere 20g di polvere di LB broth DIFCO™, Becton Dickinson in 1 litro di H₂O.

Buffer per il saggio GUS

Buffer 1x

NaPO ₄ pH 7	50 mM
X-Gluc	0,5 mg·ml ⁻¹
EDTA pH8	1 mM
TritonX 100	0,5 %
Potassio ferrocianuro	0,5 mM
Potassio ferricianuro	0,5 mM

Concime (Flory 3, tipo Nitrophoska)

<i>Elemento</i>	<i>Titolo</i>
Azoto (N)	18
Fosforo (P ₂ O ₅)	11
Potassio (K ₂ O)	18
Magnesio (Mg)	2

Antibiotici e fitoregolatori

<i>Nome</i>	<i>Concentrazione d'uso</i>
Kanamicina	100 mg·L ⁻¹
Vancomicina	100 mg·L ⁻¹
Cefotaxime	100 mg·L ⁻¹
Rifampicina	30 mg·L ⁻¹
Acido indolbutirrico (IBA)	1 mg·L ⁻¹ e 0,1 mg·L ⁻¹
6-benzilamminopurina (BAP)	1 mg·L ⁻¹

Altre sostanze utilizzate

- Ipoclorito di sodio (NaClO) per la sterilizzazione dei semi;
- Etanolo assoluto (CH₃CH₂OH) e relative diluizioni per la sterilizzazione dei semi e per la decolorazione nel saggio GUS;
- HCl ed NaOH per la correzione del pH dei mezzi di crescita.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Da semi di 3 varietà di *Nicotiana tabacum*: *Petit Havana SRI*, *Kentucky e Maryland Mammoth*, sono state ottenute piantine *in vitro* dalle quali sono stati prelevati degli espianti al fine di trasformare le varietà succitate con un gene marker, il gene della β -glucuronidasi (GUS) (Fig. 5), tramite *Agrobacterium tumefaciens* ceppo LBA4404/pBI121; il costrutto presenta, inoltre, la resistenza alla kanamicina.



Figura 5. Costrutto genico dove è possibile osservare il gene della β -glucuronidasi, il promotore CaMV 35S e il gene di resistenza alla kanamicina.

Sono state effettuate 3 trasformazioni in modo da ottenere un numero di trasformati tale da permettere di avere successivamente un numero di linee singole, delle varietà in esame, che abbia un valore statistico. In tabella 1 è riportato il numero di espianti utilizzati nelle 3 trasformazioni effettuate.

Una volta trasformati gli espianti con la soluzione di *Agrobacterium* si pongono in piastre Petri contenenti mezzo fresco MS con macroelementi, microelementi e vitamine ridotti del 50% (MS/2) con in aggiunta l'auxina IBA e la citochinina BAP alla concentrazione di $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ per favorire la rigenerazione. Il tutto è stato incubato a 24°C per 48 ore dopodichè gli espianti sono stati trasferiti su mezzo MS con le stesse caratteristiche del precedente con in più gli antibiotici kanamicina, vancomicina e cefotaxime, tutti alla concentrazione di 1 mg/l , per rimuovere l'eventuale presenza del batterio utilizzato per la trasformazione.

Questi espianti, trasferiti ogni 2 settimane su mezzo fresco, hanno generato callo, la cui percentuale di rigenerazione per le 3 varietà è mostrata nella tabella 2.

Tabella 1. Numero di espianti utilizzati per ciascuna varietà nelle 3 trasformazioni.

Varietà N. <i>tabacum</i>	SR1	Kentucky	Mammoth
N° Espianti 1^a Trasformazione	76	87	79
N° Espianti 2^a Trasformazione	93	77	81
N° Espianti 3^a Trasformazione	89	80	73
Espianti Totali	258	244	233

Tabella 2. Numero di espianti rigenerati sul numero totale di espianti trasformati per le 3 varietà, questi dati sono separati per ciascuna trasformazione.

Varietà N. <i>tabacum</i>	N° rigenerati/totale 1^a Trasformazione	N° rigenerati/totale 2^a Trasformazione	N° rigenerati/totale 3^a Trasformazione	% Totale espianti rigenerati
SR1	73/76	88/93	87/89	~ 96
Kentucky	83/87	74/77	75/80	~ 95
Mammoth	79/79	81/81	73/73	100

La figura 6 mostra un esempio di rigenerazione degli espianti:



Figura 6. Calli formati da espianti di *Nicotiana tabacum* var. *Mammoth* su mezzo MS/2 contenente gli ormoni IBA e BAP e gli antibiotici kanamicina, vancomicina e cefotaxime.

In alto da sinistra verso destra: Controllo positivo; Calli di Mammoth/pBI121.

In basso: Controllo negativo.

Come è possibile notare dai risultati mostrati in Tabella 2, il livello di rigenerazione degli espianti, dopo la trasformazione, nelle varietà prese in esame, è alto ed è del tutto comparabile con il livello di rigenerazione ottenuto dal testimone *SRI*; da qui si può dedurre che la trasformazione tramite *Agrobacterium tumefaciens* non influisce negativamente sul processo di rigenerazione in vitro sulle varietà di *Nicotiana tabacum Kentucky* e *Mammoth*.

I calli rigenerati hanno prodotto degli *shoots* laterali e già dopo un periodo di 15 giorni di incubazione è stato possibile stimarne il numero, come mostrato nella seguente tabella (Tab. 3) dove è stata riportata la suddivisione degli espianti in base al numero di *shoots* prodotti:

Tabella 3. Per ogni varietà e per ogni trasformazione è riportato il numero di espianti che hanno prodotto shoots laterali; la tabella distingue i calli rigenerati a seconda del numero di shoots prodotti: nessuno shoots formato, da 1 a 3 shoots, più di 3 shoots. Alcuni valori non corrispondono al numero di espianti di partenza in quanto durante i vari trasferimenti su mezzo fresco ci sono state delle contaminazioni e quindi perdita di materiale.

Varietà <i>N. tabacum</i>	SR1			Kentucky			Mammoth		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a
N° espianti che non hanno formato shoots	6	7	5	8	6	5	4	1	7
N° espianti che hanno formato da 1 a 3 shoots	14	16	17	18	14	16	16	15	13
N° espianti che hanno formato più di 3 shoots	53	60	63	57	54	52	53	65	53

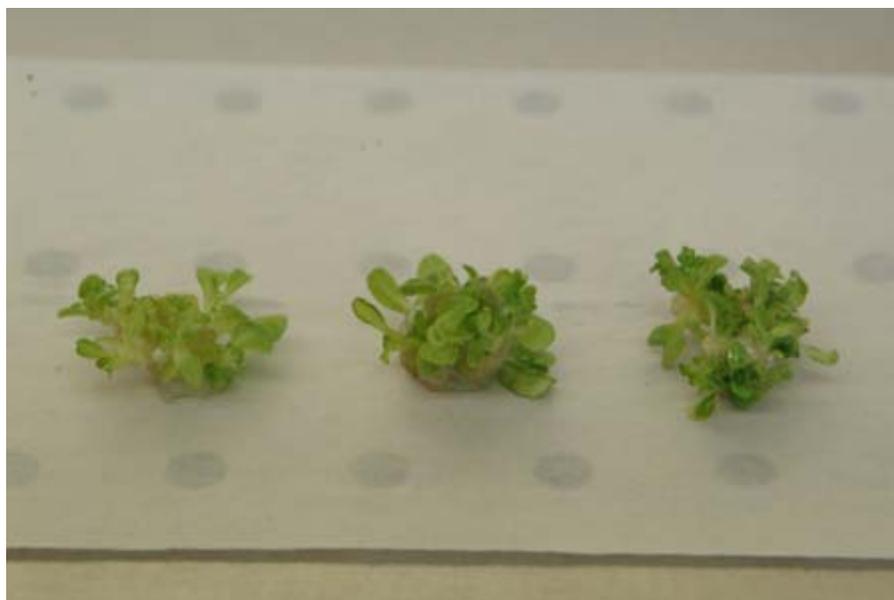


Figura 7. Calli delle 3 varietà prese in esame che hanno prodotto shoots. Da sinistra verso destra: SR1, Kentucky, Mammoth.

Dai risultati mostrati in Tabella 3 e dall'immagine (Fig. 7) rappresentate i calli che hanno formato *shoots* è possibile affermare che le varietà *Kentucky* e *Mammoth* sono equiparabili, in termini di *shoots* prodotti a parità di tempo di incubazione, alla varietà modello *Petit Havana SRI*. Ciò avvalorava il risultato che la trasformazione mediante *Agrobacterium tumefaciens* non influisce con la rigenerazione e la produzione di *shoots* in calli coltivati *in vitro* delle varietà di *Nicotiana tabacum* succitate.

Come già descritto nei materiali e metodi, una volta raggiunta l'altezza minima di 1 cm, gli *shoots* sono stati prelevati dal callo e trasferiti su mezzo fresco MS/2 con gli antibiotici kanamicina, vancomicina e cefotaxime e l'ormone IBA per stimolarne la radicazione. Le piante quindi sono state mantenute in camera di crescita con fotoperiodo 16/8 ad una temperatura di 23-24°C.

Questa operazione ha fatto sì che si formassero le singole linee per ogni varietà, ognuna rappresentata da una piantina dotata di un proprio apparato radicale e fogliare (Fig. 8).

Per ciascuna varietà il lavoro è stato organizzato in modo che si potesse operare, dopo la crescita e la radicazione delle singole linee, su un numero di 100 campioni circa per varietà in modo da ottenere dei risultati statisticamente affidabili.

Per comodità il numero di linee utilizzato per *SRI*, *Kentucky* e *Mammoth* è riassunto nella seguente tabella:

Tabella 4. Numero di linee selezionate, per ciascuna varietà di *Nicotiana*, per il proseguimento dell'attività sperimentale.

Varietà N. tabacum	SRI	Kentucky	Mammoth
Linee ottenute	100	100	100



Figura 8. Linee singole *in vitro* ottenute da shoots di *Nicotiana tabacum* var. *Kentucky* su mezzo MS/2 con antibiotici kanamicina, vancomicina e cefotaxime e l'ormone IBA.

Selezionate 100 linee per varietà è stato possibile passare al saggio GUS per verificare l'eventuale espressione del gene marker con il quale abbiamo trasformato le nostre piante. Questa, come già descritto, si è manifestata con l'assunzione di una colorazione bluastra del tessuto in esame, come mostrato in figura 9.

Nella tabella 5 sono riportati i risultati dell'espressione del gene GUS nelle diverse linee singole delle varietà *SR1*, *Kentucky* e *Mammoth* di *Nicotiana tabacum* trasformate con pBI121.



Figura 9. Saggio GUS. La prima coppia di eppendorff da sinistra verso destra rappresenta i controlli rispettivamente positivo (blu) e negativo (bianco). La seconda coppia mostra il risultato del saggio su 2 linee diverse della stessa varietà (*Maryland Mammoth*).

Tabella 5. Per ciascuna varietà la tabella viene suddivisa in due colonne: linee positive e linee negative, in ciascuna colonna è possibile visualizzare il numero della linea collocato a seconda del risultato del saggio in questione (saggio GUS). A fine tabella sono indicate le percentuali di linee positive e di linee negative sul totale dei 100 campioni analizzati per varietà.

—SR1—		—Kentucky—		—Mammoth—	
Linee positive	Linee negative	Linee positive	Linee negative	Linee positive	Linee negative
	1		1		1
2 - 16		2 - 3		2 - 4	
	17		4 - 5		5
18 - 20		6 - 8		6 - 9	
	21 - 23		9 - 10		10
24		11 - 14		11 - 13	
	25 - 28		15 - 16		14
29 - 31		17 - 21		15 - 16	
	32		22 - 27		17 - 19
33 - 39		28 - 35		20 - 21	
	40 - 41		36		22 - 25
42 - 49		37 - 48		26	
	50 - 51		49 - 52		27
52 - 63		53		28	
	64		54 - 55		29 - 35
65 - 67		56 - 63		36 - 47	
	68 - 69		64		48 - 50
70 - 72		65 - 70		51 - 69	
	73 - 75		71 - 75		70 - 77
76 - 87		76 - 89		78 - 91	
	88		90		92
89 - 90		91 - 92		93 - 94	
	91		93 - 98		95 - 97
92 - 97		99 - 100		98 - 100	
	98 - 99				
100					
N° Linee positive: 76/100		N° Linee positive: 67/100		N° Linee positive: 66/100	
76% Linee positive all'espressione del gene GUS		67% Linee positive all'espressione del gene GUS		66% Linee positive all'espressione del gene GUS	
24% Linee (kanamicina resistenti) negative all'espressione del gene GUS		33% Linee (kanamicina resistenti) negative all'espressione del gene GUS		34% Linee (kanamicina resistenti) negative all'espressione del gene GUS	

L'espressione del gene GUS nelle varietà *Kentucky* e *Mammoth*, come evidenziato in calce alla tabella 5, è risultata inferiore di almeno dieci punti percentuali rispetto a quella ottenuta dalla varietà utilizzata come controllo, la SR1, che si conferma, quindi, come una pianta particolarmente adatta a subire processi di trasformazione genetica; i valori raggiunti dalle due varietà in prova, comunque, possono essere ritenuti soddisfacenti ai fini di un loro possibile impiego nel Molecular Farming (previa valutazione quantitativa della proteina espressa).

Il saggio di cui sopra è stato replicato una seconda volta in modo da avvalorare i risultati ottenuti: tutte le linee hanno manifestato uno stesso comportamento fatta eccezione per alcune linee che, nonostante la positività dell'analisi, hanno evidenziato un diverso livello di espressione; il motivo di questa differenza può essere attribuito ad un "difetto" nella procedura del saggio e cioè ad una carente infiltrazione del buffer nei tessuti dei campioni che sono risultati negativi in termini di espressione del gene in una delle due repliche.

Per procedere nella sperimentazione, e cioè nella produzione della generazione F1, per ogni varietà sono state selezionate 10 linee tra quelle che hanno espresso il gene, nel saggio GUS, in maniera evidente in entrambe le repliche.

Di seguito viene mostrata la tabella con il numero delle linee selezionate; per convenzione è stata attribuita una lettera da A ad L alle piante utilizzate:

Tabella 6. Numero delle linee positive selezionate per essere portate in serra per la produzione di semi F1. Per convenzione è stata attribuita una lettera a ciascuna linea.

* Le linee di Kentucky essendo maschio-sterili sono state fatte incrociare con polline della linea 07 di Mammoth/pBI121 ottenuta in esperimenti precedenti ed esprime il gene della β -glucuronidasi.

Varietà N. <i>tabacum</i>	SR1	Kentucky	Mammoth
Linea A	13	2	2
Linea B	15	3	3
Linea C	16	7	6
Linea D	18	8	11
Linea E	19	12	20
Linea F	20	33	21
Linea G	42	41	36
Linea H	46	62	37
Linea I	70	76	78
Linea L	92	77	90
Numero totale linee positive portate a seme per ogni varietà	10	10*	10

Le piante selezionate sono state trasferite in vaso e, dopo un periodo di adattamento, sono state trasferite in camera di crescita con un fotoperiodo di 16 ore di luce ed 8 ore di buio, dove sono state mantenute in condizioni idriche e nutritive ideali, fino al raggiungimento della fase di fioritura.

Durante tutto l'accrescimento è stato possibile osservare le differenze fenotipiche che intercorrono tra le linee della varietà *Petit Havana SR1* e quelle di *Kentucky* e

Mammoth (come mostrato in figura 10) che si sono contraddistinte per una produzione di biomassa vegetale nettamente superiore.



Figura 10. Differentia fenotipica a livello di biomassa tra la varietà di *Nicotiana tabacum* Mammoth (a sinistra) e la varietà Petit Havana SR1 (a destra). Le piante rappresentate in figura sono trasformate con pBI121.



Figura 11. Immagine rappresentante la superficie fogliare della varietà di *Mammoth* di *Nicotiana tabacum*; la mano presente nella foto permette di fare una stima sulla dimensione della foglia.

Al momento della fioritura, le infiorescenze sono state incappucciate (Fig. 12) onde evitare impollinazione incrociata con le altre linee, assicurando così l'autoimpollinazione e il mantenimento della linea in questione.

La varietà Kentucky, essendo maschio sterile, presentava fiori privi di antere (Fig. 13) per cui è necessario impollinarla con una linea che produce polline, in questo caso è stato utilizzato il polline di una linea di *Maryland Mammoth* (*Mammoth/pBI 121* esprime il gene GUS estranea alle linee succitate ma portante il gene per la β -glucuronidasi) cresciuta in parallelo alle linee di *Kentucky* fiorite, a seguito dell'impollinazione, sono state incappucciate onde evitare impollinazione incrociata con altre linee non di interesse.

A fecondazione avvenuta, i cappucci sono stati rimossi ed è stato possibile verificare la formazione di capsule nelle quali si sono formati i semi F1 delle linee autoimpollinate e delle linee di *Kentucky*.

Le capsule formate non hanno mostrato differenze fenotipiche all'interno della stessa varietà.

Una volta raggiunta la maturazione, le capsule sono state asportate dalla pianta, e i semi F1 ivi contenuti sono stati sterilizzati e posti a germinare su kanamicina al fine di valutare il mantenimento del gene di resistenza presente nel plasmide utilizzato per la trasformazione. La tabella seguente evidenzia che tutte le linee hanno prodotto semi:

Tabella 7. Linee selezionate coltivate in serra che hanno prodotto semi.

Varietà N. <i>tabacum</i>	SR1	Kentucky	Mammoth
Linea A	Sì	Sì	Sì
Linea B	Sì	Sì	Sì
Linea C	Sì	Sì	Sì
Linea D	Sì	Sì	Sì
Linea E	Sì	Sì	Sì
Linea F	Sì	Sì	Sì
Linea G	Sì	Sì	Sì
Linea H	Sì	Sì	Sì
Linea I	Sì	Sì	Sì
Linea L	Sì	Sì	Sì
% linee produttrici di semi	100	100	100



Figura 12. Viene mostrata la parte florale incappucciata con un sacchetto di carta onde evitare la dispersione di polline e quindi una fecondazione incrociata con linee non di interesse.



Figura 13. L'immagine mette a confronto 2 fiori di due diverse varietà di *Nicotiana tabacum*. A sinistra è possibile vedere il fiori di Maryland Mammoth, a destra quello di Kentucky. E' osservabile come, a differenza del fiore a sinistra, quello di Kentucky non presenta le antere, perché maschio-sterile.

Si può evincere, quindi, che la trasformazione con *Agrobacterium tumefaciens* per il gene della β -glucuronidasi non ha influito negativamente sui meccanismi di fecondazione, pertanto è possibile ipotizzare che la trasformazione con geni di interesse al Molecular Farming possa essere effettuata sulle varietà in prova senza che si verificano modificazioni significative nei processi di accrescimento e di sviluppo delle piante.

Di seguito vengono riportati i risultati della prova di germinazione dei semi F1 di tutte le varietà su mezzo MS/2 contenente l'antibiotico kanamicina:

Tabella 8. Risultati prova di germinazione su mezzo MS/2 contenente l'antibiotico kanamicina dei semi F1 di tutte le linee selezionate delle 3 varietà.

Varietà <i>N. tabacum</i>	SR1	Kentucky	Mammoth
% germinazione semi F1 su kanamicina	98	100	10

Come è possibile notare, i semi F1 delle linee selezionate hanno segregato in modo diverso: i semi F1 di *Mammoth* hanno originato solo il 10% di linee positive alla kanamicina, risultati diversi sono stati ottenuti con i semi F1 di *SR1* e di *Kentucky* che hanno dato rispettivamente il 98% e il 100% di piante resistenti, a dimostrazione del fatto che il gene di resistenza è stato tramandato alla generazione successiva. Per avvalorare questa tesi sono stati seminati su una piastra contenente kanamicina e su una senza l'antibiotico, semi wt delle varietà

prese in considerazione, aspettandosi, come risultato, che le piante germinate nella piastra contenente la kanamicina morissero tutte, mentre quelle nella piastra senza l'antibiotico restassero tutte in vita.

I fatti hanno dimostrato quanto appena affermato, come illustrato anche dalla figura. 14.

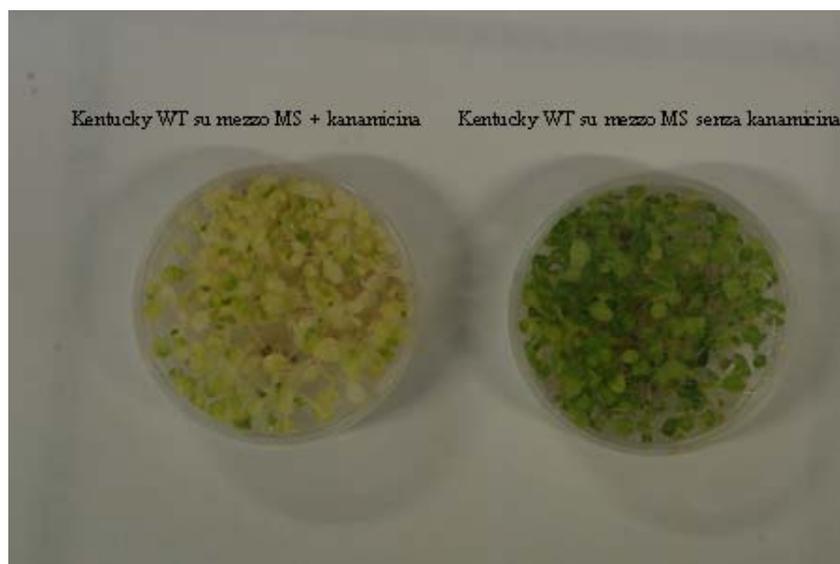


Figura 14. Viene mostrato il comportamento di semi della varietà Wild Type di *Marylan Mammoth* su mezzo contenente kanamicina (a sinistra) e mezzo senza l'antibiotico (a destra). E' evidente come le piante cresciute su mezzo selettivo ingialliscono e muoiono a differenza delle altre cresciute in mezzo privo di antibiotici.

L'esperimento è proceduto con la selezione delle linee F1 kanamicina resistenti delle varietà di *Nicotiana tabacum* fatte germinare. Le piantine sono state fatte crescere in vaso per un periodo di 30 giorni dopodiché sono stati prelevati degli espianti fogliari, come descritto in precedenza, per poter effettuare un saggio GUS allo scopo di verificare se anche il gene della β -glucuronidasi, oltre a quello della

resistenza alla kanamicina, è stato trasferito alla generazione F1 e se questo viene espresso.

La tabella che segue mostra i risultati del saggio:

Tabella 9. Risultati del saggio GUS sulle linee F1 selezionate della varietà in prova.

SR1		Kentucky		Mammoth	
% Linee positive	% Linee negative	% Linee positive	% Linee negative	% Linee positive	% Linee negative
100	-	100	-	100	-

Come mostrato in Tabella 9, il saggio GUS (eseguito 2 volte per poter avvalorare maggiormente i risultati) ha permesso di determinare che l'espressione del gene reporter è stata totale in tutte le linee F1 selezionate.

Alla luce di questi primi risultati, quindi, le varietà *Kentucky* e *Mammoth* possono essere considerate come delle valide candidate alla trasformazione con geni utili ed è quindi ipotizzabile un loro futuro impiego nel Molecular Farming.

La varietà *Kentucky* assume un ruolo di particolare importanza, inoltre, in virtù dei vantaggi derivanti dalla maschiosterilità, in quanto potrebbe essere utilizzata direttamente in campo senza incorrere nei rischi di flusso genico operato tramite il polline; inoltre, questa caratteristica potrebbe facilitare le successive operazioni di miglioramento genetico o di produzione degli F1, a seguito della semplicità operativa che si ha nell'effettuare gli incroci con eventuali varietà di particolare interesse.

Sono in corso test per la valutazione dell'espressione del gene marcatore in piante F2, soprattutto di *Maryland Mammoth* data la scarsa resa di positivi alla F1 su

kanamicina e la produzione di semi F2 dalle linee positive delle altre 2 varietà al fine di attestarne l'effettiva omozigosi del carattere di interesse.

5. CONCLUSIONI

L'introduzione di geni "estranei" all'interno delle piante ha portato, fino ad ora, alla creazione di nuove linee vegetali modificate solo nelle loro proprietà agronomiche (tolleranza a erbicidi e resistenza a insetti) e la cui coltivazione porta vantaggi tangibili esclusivamente agli agricoltori; come conseguenza, anche il consumatore informato, non recependo vantaggi concreti, come il miglioramento delle proprietà organolettiche o nutrizionali degli alimenti, rimane restio all'utilizzo delle piante geneticamente modificate in agricoltura.

La chiave di volta per far sì che anche i consumatori possano apprezzare, nella quotidianità, i vantaggi dei prodotti derivanti da piante bioingegnerizzate potrebbe derivare dalla Plant Molecular Farming.

Nel campo dell'ingegneria genetica, negli ultimi decenni, si è andato sempre più affermando il concetto della pianta come 'biofabbrica' per la produzione di numerose molecole complesse di origine diversa (Plant Molecular Farming); inoltre, in ambito medico/terapeutico molte delle attuali ricerche biotecnologiche sono dirette allo sviluppo di nuovi farmaci e si focalizzano prevalentemente su quelli di natura proteica, mentre le molecole ricombinanti attualmente in uso, vengono principalmente prodotte utilizzando batteri, funghi o colture di cellule animali. Tramite microrganismi e lieviti, però, si possono produrre solo sostanze di ridotta complessità in quanto molte delle modificazioni post-traduzionali che sono necessarie affinché le proteine raggiungano la forma matura e, quindi, attiva, avvengono esclusivamente in cellule di eucarioti superiori.

La produzione di sostanze ad uso farmaceutico tramite colture cellulari animali, invece, è associata al rischio di contaminazione da parte di patogeni dannosi alla salute umana come il virus dell'AIDS e delle epatiti, la BSE e le sostanze carcinogeniche. Questi stessi problemi si hanno quando, come biofabbriche vengono utilizzati gli animali; sebbene quest'ultimi, infatti, siano utilizzati da anni per la produzione di biofarmaci, è ancora necessario sottoporre tali sostanze ad un

monitoraggio costante della loro qualità attraverso procedure costose e che richiedono tempo.

La distanza genetica esistente tra le piante e l'uomo rappresenta, quindi, un grosso vantaggio nella produzione di proteine terapeutiche tramite Molecular Farming in quanto si riducono fortemente i rischi legati al trasporto di patogeni dannosi alla salute umana, è possibile produrre e configurare correttamente anche proteine complesse e, inoltre, i processi di estrazione risultano semplificati poiché, nei vegetali, non esistono proteine farmacologicamente attive simili a quelle umane.

Il maggiore vantaggio risiede, tuttavia, nei costi di produzione che sono estremamente più ridotti rispetto a quelli che contraddistinguono le attuali tecniche di produzione di proteine ricombinanti poiché, nei sistemi basati sulla produzione tramite colture cellulari non c'è bisogno di bioreattori o del personale specializzato necessario per la loro gestione. E' stato stimato che le proteine ricombinanti possono essere prodotte, in piante, al 2-10% del costo del sistema di fermentazione microbica e allo 0,1% del costo delle colture di cellule di mammiferi, sebbene questo dipenda dalla resa produttiva. Per le proteine che possono essere prodotte con rese elevate, i vantaggi economici sono evidenti; ad esempio un bushel di mais che produce avidina al 20% delle proteine totali del seme ha la stessa resa totale di una tonnellata di uova di gallina (la fonte naturale di avidina) ma allo 0,5% del costo. L'espressione di proteine ricombinanti con rese anche molto inferiori a quelle sopramenzionate, pari allo 0,1-1,0% sul totale delle proteine solubili (che rappresentano valori normalmente riscontrati sperimentalmente nella produzione di proteine farmacologiche) rende comunque la tecnica del Plant Molecular Farming altamente competitiva rispetto ai tradizionali sistemi di produzione.

Un altro grosso vantaggio risiede nell'opportunità di produzioni virtualmente illimitate, anche se, per evitare il rischio di gene-flow e di contaminazioni delle colture convenzionali, è spesso necessario produrre in ambiente controllato; l'utilizzo di serre a contenimento, comunque, rende possibile effettuare più cicli di

crescita durante l'anno, consentendo di raggiungere elevate produzioni sia di biomassa che di prodotto utile.

Livelli di produzione così elevati, naturalmente, non sono necessari per tutte le proteine ad uso farmacologico ottenibili da piante GM, ma ci sono molti casi in cui la disponibilità annuale di prodotto utile rappresenta un fattore di cruciale importanza. È questo il caso di molti anticorpi monoclonali che rappresentano la classe di biofarmaci maggiormente in sviluppo negli ultimi anni.

Gli anticorpi sono stati utilizzati come agenti diagnostici e terapeutici sia in vivo che ex vivo nelle ultime due decadi. La loro applicazione clinica riguarda principalmente il cancro, i trapianti e i disordini cardiovascolari.

Il tabacco, a livello di letteratura, ha una lunga storia come coltura di successo per la Molecular Farming ed è, quindi, uno dei candidati principali per la produzione commerciale di questa tipologia di farmaci.

I vantaggi maggiori risiedono nella consolidata tecnologia a livello di trasferimento ed espressione dei geni, nell'alta resa in biomassa, nella prolifica produzione di seme e nell'esistenza di una larga scala di infrastrutture per la lavorazione del materiale vegetale. Dal momento che il tabacco non viene utilizzato nell'alimentazione umana e animale, il rischio di una contaminazione della catena alimentare è molto ridotto.

L'obiettivo della seguente tesi, quindi, era quello di valutare la capacità di espressione di un gene marcatore in due varietà di *Nicotiana tabacum* tra le più produttive in termini di biomassa vegetale, in virtù del loro possibile impiego in qualità di biofabbriche per la produzione di molecole ricombinanti ad azione terapeutica.

Il lavoro sperimentale è consistito nella valutazione di tipo qualitativo dell'espressione di un gene marcatore nelle varietà *Kentucky* e *Maryland Mammoth*, poste a confronto con il tabacco *Petit Havana SRI*, una tra le piante che sono state maggiormente utilizzate in campo sperimentale per tale scopo, ma che risulta caratterizzata da una ridotta capacità produttiva in termini di biomassa.

Come gene marcatore è stata utilizzata una β -glucuronidasi, la cui proteina espressa dopo infiltrazione di un apposito buffer nel materiale vegetale e decolorazione con alcool etilico dà al tessuto una colorazione blu. La trasformazione è stata effettuata su espianti fogliari tramite *Agrobacterium tumefaciens*.

I risultati hanno evidenziato un alto livello di rigenerazione degli espianti, dopo la trasformazione, nelle varietà prese in esame, del tutto comparabili con quelli ottenuti dal testimone *SRI*. L'espressione del gene GUS, di contro, nelle varietà *Kentucky* e *Mammoth* è risultata inferiore, in termini percentuali, rispetto a quella ottenuta dal controllo ma, comunque, i valori raggiunti sono da considerarsi soddisfacenti ai fini di un loro possibile impiego nel Molecular Farming (previa valutazione quantitativa della proteina espressa). Tutte le linee, coltivate in ambiente controllato, hanno prodotto semi fertili. Valutata la segregazione dei semi F1 su mezzo selettivo, è stato effettuato un saggio GUS per diverse linee F1 delle tre varietà; *Kentucky* e *SRI* hanno mostrato una resistenza alla kanamicina, pressoché totale (pari, rispettivamente a 100 e 98%), mentre per la varietà *Mammoth*, solo il 10% dei semi ha mantenuto il carattere di resistenza all'antibiotico. Per indagare meglio questo tipo di comportamento, sono tuttora in corso test in piante F1 di *Maryland Mammoth*.

Le linee positive ottenute dai semi F1 sono state saggiate per l'espressione del gene della β -glucuronidasi, e tutti i campioni delle tre varietà in studio hanno mostrato positività al saggio; è possibile affermare, quindi, che nelle linee che hanno evidenziato resistenza all'antibiotico selettivo (e che portavano il relativo gene), era stato mantenuto ed espresso anche il gene marker di interesse.

L'importanza del risultato ottenuto sulla varietà *Kentucky* di *Nicotiana tabacum* è allacciata alla sua caratteristica di essere maschiosterile; per cui è possibile gestirne l'impollinazione con varietà di interesse portanti eventuali caratteri di miglioramento genetico.

Il carattere della maschiosterilità avvalorava ancora di più questa varietà in quanto piante transgeniche recanti questo carattere possono essere coltivate direttamente in campo senza il rischio di contaminazione da parte di polline transgenico, evitando così tutte le norme di contenimento che sono in vigore per le piante trasformate.

Alla luce di questi primi risultati, quindi, la varietà *Kentucky* può essere considerata come una valida candidata al suo utilizzo nella Molecular Farming, per la produzione di molecole ricombinanti ad azione terapeutica.

Valutata l'omozigosi del carattere di interesse, gli studi successivi verranno indirizzati verso la trasformazione, delle varietà prese in esame in questa tesi, con il gene di interesse terapeutico e successivi test per controllarne l'espressione, l'efficienza e il mantenimento del gene alle generazioni successive.

6. Ringraziamenti

Mi sento di dover ringraziare molte persone...

Innanzitutto i miei relatori e correlatori, il prof. Sergio Miele, il prof. Marco Nuti e la dott.ssa Lara Foschi per avermi seguito, con competenza e disponibilità, durante tutto il periodo di tesi; presso l'azienda Floramiata ringrazio il dott. Benedetto Aracri che mi ha permesso di svolgere tale attività in un contesto particolarmente valido e stimolante e, in special modo, il dott. Dimitre Pashkulov che mi ha seguito ed aiutato durante i miei periodi di lavoro e permanenza presso l'azienda.

Ringraziamenti doverosi vanno al Dipartimento di Chimica e Biotecnologie Agrarie, a quello di Biologia delle Piante Agrarie e a quello di Agronomia e Gestione dell'Agroecosistema della Facoltà di Agraria di Pisa che mi hanno appoggiato per svolgere parte dell'attività sperimentale.

Sempre nell'ambito universitario non posso tralasciare i miei compagni di corso con i quali ho trascorso una divertente Laurea Specialistica, in particolar modo Stefano, Simone, Vale & Gabri, Francesca T., Francesco, Dionisio & Andrea, la bambina & la bambona, e tutti gli altri... e, tra i vecchi compagni, non posso lasciar fuori la mia "vecchia" amica Francesca F. ☺ e il grande Alessio alias "Viareggio".

Ringraziamenti particolari vanno sicuramente agli eterni e sempre presenti amici di Livorno: Aaron, Alessio, Andrea, Beppe, Luca & amici del fondo, Mauro, Omar, Thomas, Dedo, Valerio, Vittorio, il Bucci e il Togne.

Non posso non ringraziare "Le Scuderie" e tutti i suoi componenti, anche coloro con i quali si sono instaurati dei labili attriti a causa della mia indiscussa potenza a calcio balilla; ringrazio tre tasti della tastiera e anche i miei allenatori di calcio a 8, Massi e Giovanni, e tutti i miei compagni di squadra sia a 8 che a 5, che ho dovuto abbandonare, da qualche mese a questa parte, a causa del mio infortunio al ginocchio.

Vorrei ringraziare anche tutta, ma proprio tutta, la mia famiglia che mi ha sempre incoraggiato e sostenuto.

Infine, non certo per importanza, ringrazio calorosamente Serena che in questi anni mi è stata vicino con affetto.

Non posso non menzionare www.ogmdevelopment.com e tutto il suo staff, tra cui ricordo donnie e i moderatori Maverick78, EvOIUtIoN, multififa, sleysat, Ken1986, Gamescircuits, jarabe83, dutch, kaligola, DeXtEr90, langin e skabor, senza di loro OGM non avrebbe il successo che ha oggi; non tralascio certo gli ex Staff che hanno dato a suo tempo il loro contributo e tutti gli utenti attivi, da pupazzi a transgenici, che contribuiscono a far crescere sempre di più questa community.

Ringrazio anche Raulken.it e tutto il suo staff.

Un particolare ringraziamento lo devo ad EvOIUtIoN che mi ha affacciato al Mondo del Cracking e che da quasi un anno mi segue con pazienza insegnandomi i trucchi del mestiere.

Se ho dimenticato qualcuno non me ne vogliate, non l'ho di certo fatto di proposito, ma il tempo stringe, pertanto ringrazio anche chi, eventualmente, ho distrattamente tralasciato...

7. BIBLIOGRAFIA

Bakker H., Bardor M., Molthoff J.W., Gomord V., Elbers I., Stevens L.H., Jordi W., Lommen A., Faye L., Lerouge P. & Bosch D., (2001) *Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (98), 2899–2904.

Bardor M., Loutelier-Bourhis C., Paccalet T., Cosette P., Fitchette A.C., Vezina L.P., Trepanier S., Dargis M., Lemieux R., Lange C., Faye L. & Lerouge P., (2003) *Monoclonal C5-1 antibody produced in transgenic alfalfa plants exhibits a N-glycosylation that is suitable for glycol-engineering into human-compatible structures*. Plant Biotechnol. J. (1), 451–462.

Brandle J. E., Rymerson R. & Menassa R., (2001) *Perspectives on the production of recombinant proteins in plants*. Unpublished manuscript.

Cabanes-Macheteau M., Fitchette-Laine A.C., Loutelier-Bourhis C., Lange C., Vine N.D., Ma J.K., Lerouge P. & Faye L., (1999) *N-Glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants*. Glycobiology. (9), 365–372.

Chargelegue D., Vine N. D., Van Dolleweerd C. J., Drake P. M. W. & Ma J., (2000) *A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice*. Transgenic Res. (9), 187–194.

Cramer C., Boothe J. G. & Oishi K. K., (1999) *Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream technologies*. Current Topics in Microbiology and Immunology (240) 95-118.

Daniell H., Streatfield S.J. & Wycoff K., (2001) *Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants.* Trends Plant Sci. (6), 219–226.

David A. & Kirk D.A., (2002) *Potential Impacts of Plant Molecular Farming on Biodiversity.* Aquila Applied Ecologists (1) 1-33.

Düring K., Hippe S., Kreuzaler F., & Schell J., (1990) *Synthesis and selfassembly of a functional monoclonal antibody in transgenic Nicotiana tabacum.* Plant Molecular Biology (15) 281-293.

Einsiedel E. F. & Medlock J., (2005) *A Public Consultation on Plant Molecular Farming.* AgBioForum, 8(1) 26-32

Fischer R. & Emans E., (2000) *Molecular farming of pharmaceutical proteins.* Transgenic Research (9) 279-299.

Frigerio L., Vine N.D., Pedrazzini E., Hein M.B., Wang F., Ma J.K. and Vitale A., (2000) *Assembly, secretion, and vacuolar delivery of a hybrid immunoglobulin in plants.* Plant Physiol. (123), 1483–1494.

Giddings G., Allison G., Brooks D. & Carter A, (2000) *Transgenic plants as factories for pharmaceuticals.* Nature Biotechnology 18: 1151-1155.

Hiatt A., Cafferky R. & Bowdish K., (1989) *Production of antibodies in transgenic plants.* Nature (342), 76-78.

Hudson, P.J., (1998) *Recombinant antibody fragments.* Curr. Opin. Biotechnol. (9), 395–402.

Larrick J.W., Thomas D.W., (2001) *Curr Opin Biotechnol*, (12), 411-418.

Ma J.K., Drake P.M. & Christou, P., (2003) *Nature Rev Genet*, (4) 794-805.

Ma J.K., Hiatt A., Hein M., Vine N.D., Wang F. & Stabila P., (1995) *Generation and assembly of secretory antibodies in plants*. *Science* 268: 716-719.

Pagny S., Denmat-Ouisse L.A., Gomord V. & Faye L., (2003) *Fusion with HDEL protects cell wall invertase from early degradation when N-glycosylation is inhibited*. *Plant Cell Physiol.* (44), 173–182.

Poli G., (2001) *Biotechnologie*, Ed. UTET

Samyn-Petit B., WajdaDubos J.P., Chirat F., Coddeville B., Demaizieres G., Farrer S., Slomianny M.C., Theisen M. & Delannoy P., (2003) *Comparative analysis of the site-specific N-glycosylation of human lactoferrin produced in maize and tobacco plants*. *Eur. J. Biochem.* (270), 3235–3242.

Staub J.M., Garcia B., Graves J., Hajdukiewicz P.T., Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schlittler M., Carroll J.A., Spatola L., Ward D., Ye G. & Russell D.A., (2000) *High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts*. *Nat. Biotechnol.* (18), 333–338.

Véronique Gomord, Christophe Sourrouille, Anne-Catherine Fitchette, Muriel Bardor, Sophie Pagny, Patrice Lerouge & Loïc Faye, (2004) *Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge*. *Plant Biotechnology Journal*, (2) 83–100

Siti web consultati:

Dr Ed Rybicki: ed@science.uct.ac.za

www.mcb.uct.ac.za/staff/ed/htm

Public understanding of Biotechnology website www.pub.ac.za

Fonte: <http://www.jeffersonhospital.org>

<http://www.bio-pro.de/en/region/rhein/magazin/01392/index.html>