



Centro Università degli Studi di Milano - Scuola per la diffusione delle Bioscienze

OGM: Organismi Geneticamente Migliorati



Università degli Studi di Milano

CONOSCENZE PROPEDEUTICHE

Vettori di clonaggio

Un vettore è una molecola di DNA capace di replicarsi in una cellula ospite. I vettori più frequentemente usati in biotecnologia sono i plasmidi del batterio *Escherichia coli*. I plasmidi sono piccole molecole di DNA circolare a doppio filamento extracromosomici che esistono naturalmente nei batteri, con cui convivono come simbionti. Si replicano autonomamente nella cellula ospite, grazie alla presenza di una sequenza di origine (ORI) della replicazione (Fig. 1).

Molti plasmidi contengono geni che forniscono benefici alla cellula ospite (per esempio geni che codificano enzimi che inattivano gli antibiotici, e quindi conferiscono resistenza ad essi), o geni di trasferimento, che codificano proteine capaci di formare un tubo macromolecolare attraverso cui il DNA plasmidico può essere trasferito ad altre cellule. E' il caso del plasmide Ti contenuto nel batterio *Agrobacterium tumefaciens*.

Per il clonaggio del DNA si usano plasmidi modificati geneticamente in laboratorio, da cui sono stati eliminati praticamente tutti i geni e che contengono solamente:

- una ORI
- un gene che consente la selezione: in genere un gene per la resistenza ad un antibiotico, come il gene *amp^r*; che conferisce resistenza all'antibiotico ampicillina
- un polylinker: regione con siti multipli di restrizione in cui possono essere inseriti i segmenti di DNA esogeno, cioè proveniente da una specie diversa.

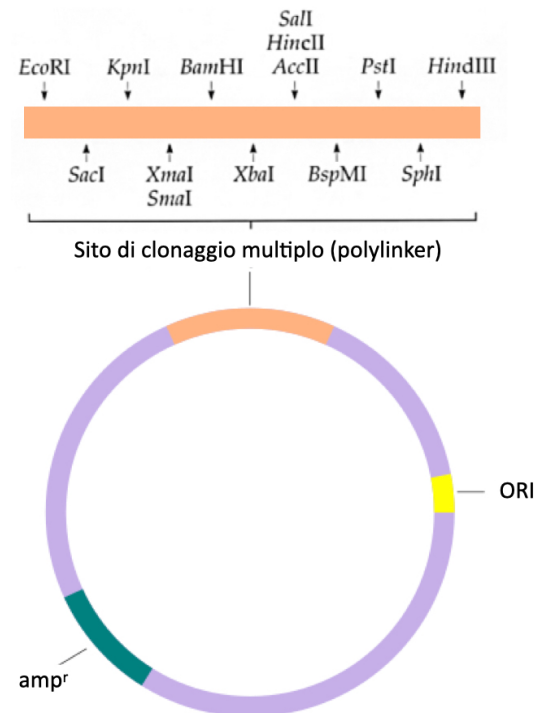


Fig 1: Struttura di un plasmide: ORI = origine di replicazione del plasmide, *amp^r* = gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina.

Trasformazione

La trasformazione è un'alterazione genetica di una cellula, batterica o eucariotica, causata dalla assunzione e dalla espressione di DNA esogeno. Incubando vettori plasmidici geneticamente modificati con cellule batteriche, queste ultime possono acquisire il DNA plasmidico ed essere trasformate. Per produrre piante geneticamente modificate (PGM), il plasmide Ti opportunamente modificato viene reintrodotta nel batterio *Agrobacterium tumefaciens* con cui successivamente si infettano le cellule vegetali che si vogliono trasformare. Perché la trasformazione sia stabile (e cioè ereditabile) è necessario che il DNA plasmidico di Ti si integri nel cromosoma della cellula vegetale.

INTRODUZIONE AGLI OGM

Cosa sono gli OGM

Un organismo geneticamente modificato (OGM) è un organismo vivente che possiede un patrimonio genetico modificato tramite tecniche di ingegneria genetica, che consentono l'aggiunta, l'eliminazione o la modifica di elementi genetici.

In Europa l'utilizzo di OGM è sottoposto a regole molto rigorose e procedure di autorizzazione complesse per la loro coltivazione e commercializzazione.

La maggior parte degli OGM autorizzati nell'UE sono destinati ai mangimi per gli animali d'allevamento ma alcuni alimenti importati possono contenerne altri.

Il sistema di etichettatura alimentare dell'UE impone alle aziende di indicare se gli alimenti o i mangimi che producono contengono OGM quando la presenza è al di sopra di 0,9% del prodotto.

In Italia, non vi è coltivazione commerciale di OGM. Sono permessi campi sperimentali, ma solo con apposita autorizzazione.

Perché si fanno gli OGM?

Le piante vengono modificate per migliorarne la qualità da molti punti di vista:

- attività insetticida,
- resistenza a erbicidi,
- tolleranza a stress ambientali,
- vita più lunga o maturazione ritardata,
- migliori qualità nutrizionali delle proteine del seme,
- allungamento dei tempi di conservazione,
- nuova strategia per la produzione di vaccini.

Come si fanno gli OGM?

In genere uno o più geni presi da altri organismi vengono introdotti nel patrimonio ereditario dell'organismo che si vuole modificare attraverso particolari vettori, tra i quali i più usati sono plasmidi e virus. In particolare, per ottenere piante geneticamente modificate (PGM) si utilizza un vettore naturale, il plasmide Ti, presente nel batterio *Agrobacterium tumefaciens*, come illustrato nella figura (Fig. 2). Nel plasmide Ti vengono introdotti, con tecniche di ingegneria genetica, il transgene, ed un gene che consenta di selezionare le cellule trasformate (per esempio un gene che conferisce resistenza a un antibiotico).

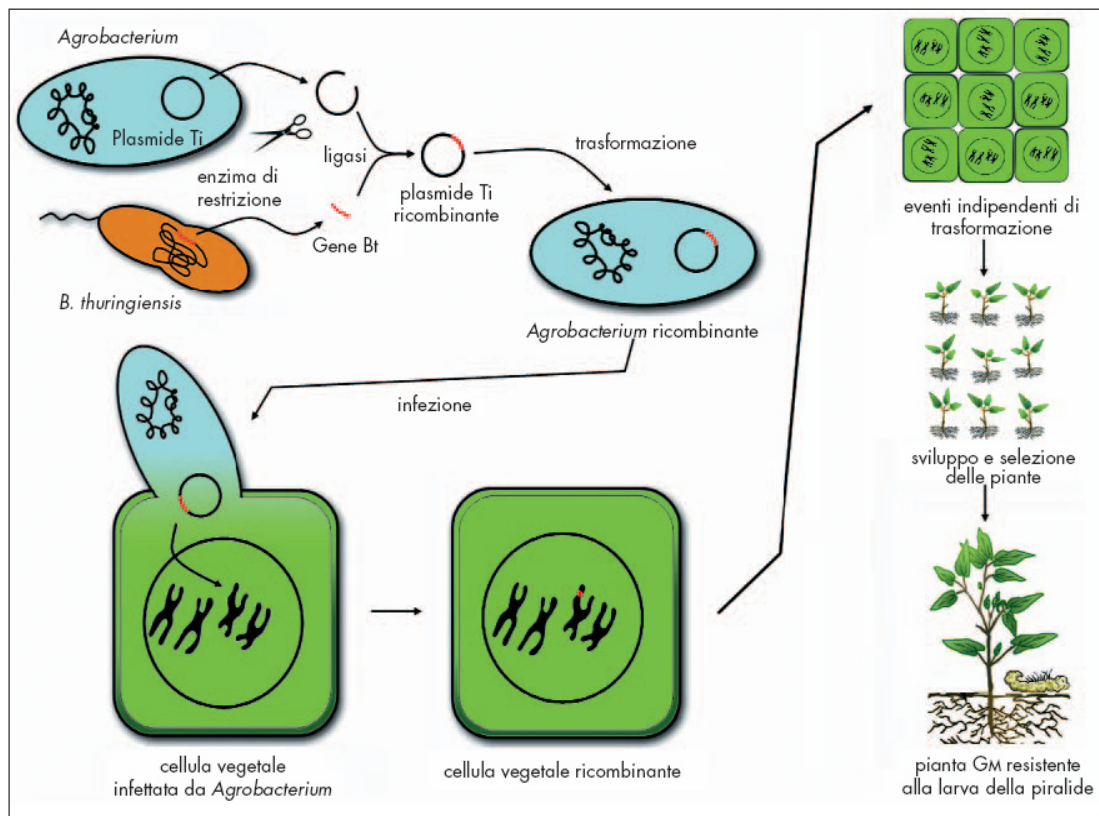


Fig.2. La produzione di piante transgeniche resistenti alla larva della piralide è realizzata mediante tecniche di ingegneria genetica su *Agrobacterium* usato come organismo vettore del gene *Bt*.

A differenza delle cellule animali differenziate, le cellule vegetali sono spesso totipotenti quindi in grado di rigenerare un'intera pianta da una singola cellula vegetale. Di conseguenza, cellule vegetali transgeniche possono dare origine a piante transgeniche.

Tecniche di trasferimento genetico tradizionali

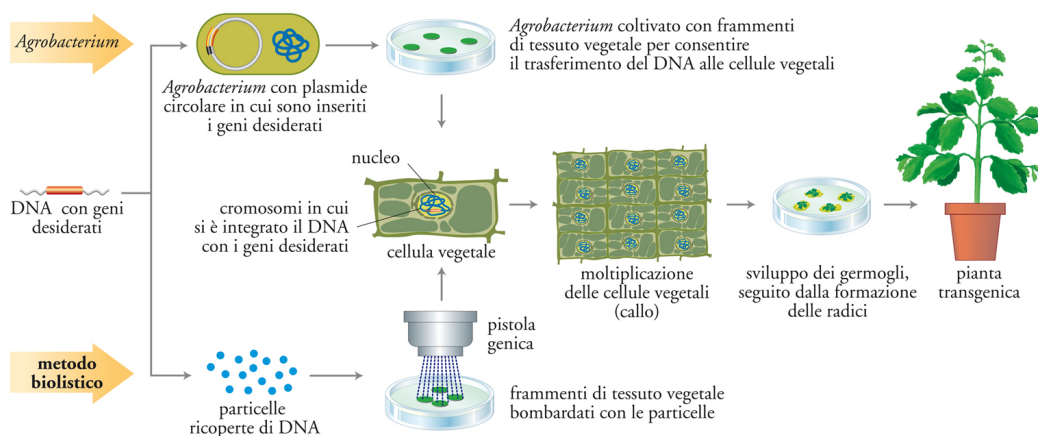


Fig.3. Tecniche di trasferimento genetico tradizionali. Parte alta del pannello, metodo attraverso *Agrobacterium tumefaciens*. Parte bassa del pannello metodo biolistico.

Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA)

Le TEA, acronimo di Tecniche di Evoluzione Assistita, in inglese Nbt (New breeding techniques) o Ngt (New genomic techniques) sono nuove biotecnologie delle quali due in particolare sono considerate tra le più promettenti: il Genome Editing (es. CRISPR/Cas9) e la Cisgenesi (trasferimento di un intero gene, inclusa la sua sequenza regolatrice posta di fronte al tratto codificante, tra due individui tra loro interfertili tale da consentire incroci interspecifici).

Analisi di un OGM

Per essere certi che un organismo sia geneticamente modificato, bisogna ricercare nel suo DNA la presenza del transgene che rende l'organismo ospite in grado di esprimere un nuovo carattere, non tipico della specie di appartenenza. Gli OGM sono spesso fenotipicamente identici al tipo tradizionale equivalente, nel senso che l'aspetto generale non è diverso, anche se l'OGM ha acquisito una caratteristica ereditaria nuova, dovuta al transgene. Le differenze possono essere trovate a livello genotipico, e cioè nella sequenza del DNA. Dunque per identificare un OGM bisogna partire dal suo DNA.

OGM o non OGM?



La nostra analisi comprende le seguenti fasi (Fig. 4):

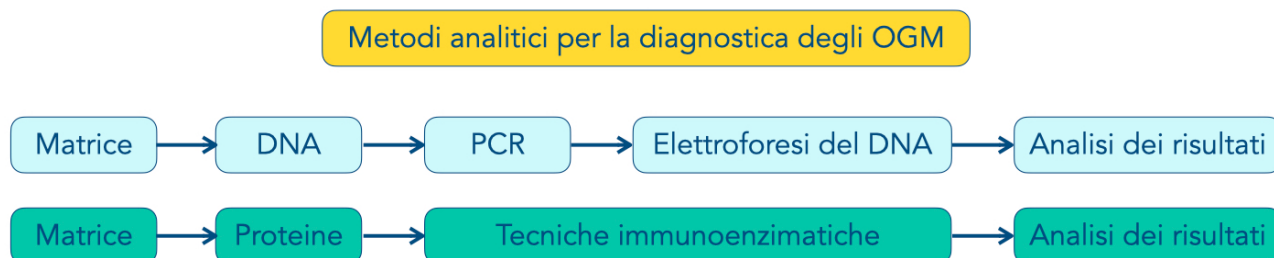
- campionamento
- estrazione del DNA
- amplificazione con PCR
- elettroforesi
- analisi dei risultati



Fig. 4: Esempio di protocollo per l'identificazione di un OGM in base alla presenza del gene esogeno.

E' possibile comunque anche una via alternativa per identificare un OGM. Infatti, poiché un gene si esprime attraverso la sintesi di una proteina, è anche possibile effettuare la ricerca del prodotto derivante dall'espressione del gene inserito, valutarne le funzioni e i prodotti che possono derivare dalla sua attività.

In entrambi i tipi di analisi si parte dal prodotto alimentare in questione, detto matrice:



Quindi è possibile effettuare:

- Analisi del DNA modificato: mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) per il rilevamento qualitativo e quantitativo
- Analisi delle proteine modificate: mediante ELISA o Western Blot, saggi immunologici per il riconoscimento del complesso antigene – anticorpo:

Ai seguenti siti si può trovare l'elenco completo degli OGM autorizzati dalla Unione Europea con i caratteri inseriti e i relativi scopi e tutte le rispettive metodologie analitiche

<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>

https://food.ec.europa.eu/plants/genetically-modified-organisms/gmo-authorisation_en

PRIMA DI ANDARE IN LABORATORIO

Campionamento

Il campionamento rappresenta una fase critica in un processo di analisi, la buona riuscita dell'analisi dipende dalle modalità con cui esso è condotto. Il campione predisposto all'analisi deve essere il più possibile rappresentativo della matrice di partenza ed essere omogeneo. La grande sfida durante la preparazione dei campioni è la produzione di estratti di DNA che siano rappresentativi dell'oggetto in analisi. Molto spesso è dell'ordine di grandezza del carico di un battello cargo con migliaia di tonnellate di fave di soia o di mais. A causa del miscuglio durante la raccolta, lo stoccaggio e il trasporto, un prodotto OGM potrebbe non essere ben distribuito nella matrice di partenza. Potrebbe essere, per esempio, più concentrato in un punto piuttosto che in altri; perciò quando campioniamo dobbiamo eseguire più prelievi dalla matrice e in punti diversi. Se i prodotti da analizzare sono aliquote confezionate, si eseguono prelievi casuali di alcune aliquote, rispettando la normativa vigente.

La preparazione del campione deve essere eseguita con molte cautele, ad esempio in ambienti dedicati, in modo da evitare ogni possibile contaminazione da parte di DNA estraneo.

I campioni che vengono sottoposti all'analisi sono rappresentati da semi (mais, soia), ma anche sfarinati e prodotti alimentari complessi come prodotti da forno, prodotti a base di cioccolato, di soia, corn flakes ecc.

IMPOSTAZIONE DEL PROBLEMA

Il mais (*Zea mais*, detto anche granoturco) OGM coltivato, è stato trasformato per fare sì che sia resistente agli insetti nocivi, tollerante agli erbicidi, o con entrambe le modificazioni.

Resistenza agli insetti

La resistenza è ottenuta facendo produrre alla pianta una proteina tossica per gli insetti prodotta dal *Bacillus thuringiensis*, un batterio del terreno utilizzato anche in agricoltura biologica come insetticida naturale. Questo microrganismo possiede un gene (Bt) che codifica per la proteina Cry, che è in grado di legarsi selettivamente a specifici recettori localizzati nell'epitelio intestinale delle larve di alcune specie d'insetti. Il legame della proteina con i recettori provoca la distruzione dell'epitelio intestinale e di conseguenza la morte di questi insetti (Fig. 5).

Esistono diversi tipi di proteine Cry prodotte da differenti sottospecie di *Bacillus thuringiensis* che

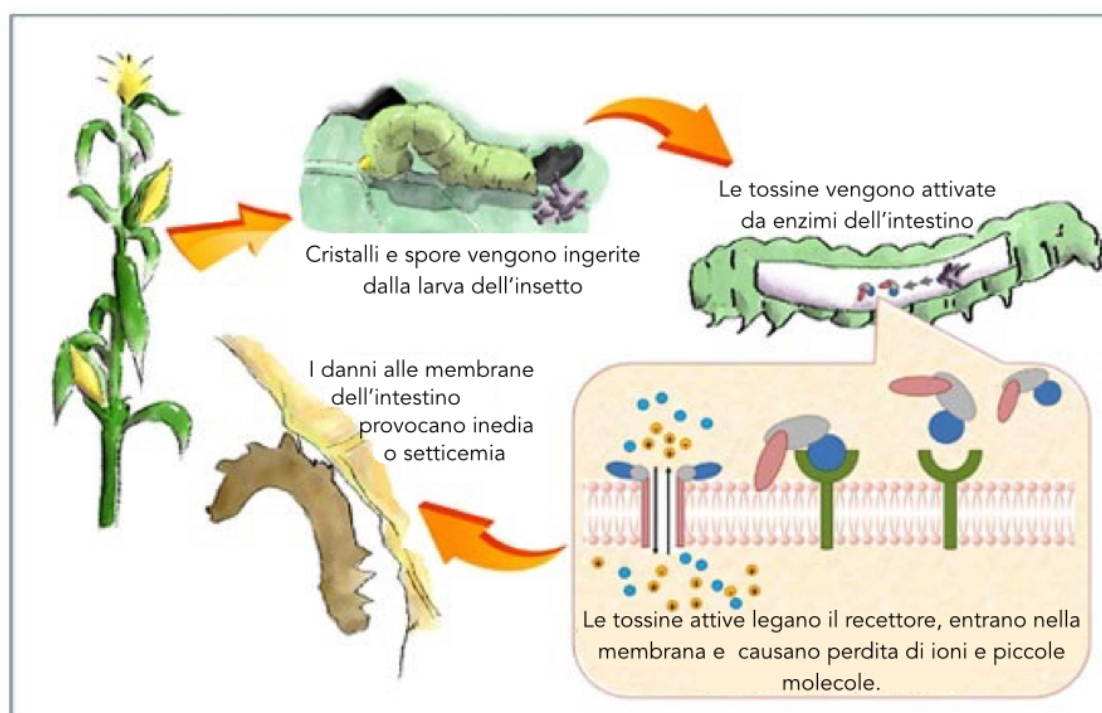


Fig. 5. Come la proteina Cry agisce nelle larve della piralide

esibiscono un'elevata specificità di azione nei confronti di diversi tipi d'insetti. I mammiferi, non avendo i recettori per le proteine Cry, sono resistenti alla sua azione tossica.

Per conferire ad una specie vegetale il carattere di resistenza nei confronti di un particolare tipo di insetto è sufficiente introdurre nel suo genoma il gene che codifica per la tossina Cry specifica per quell'insetto. In tal modo la pianta sarà in grado di produrre la proteina Cry che esplica la sua azione bioinsetticida quando l'insetto dannoso attacca la pianta, cibandosi dei suoi tessuti.

Il mais Bt sembra presentare vantaggi anche riguardo a un altro problema degli agronomi. Nel mais sono spesso presenti tossine (aflatossine) dovute all'infezione da parte di muffe. Le aflatossine hanno tossicità acuta e cronica e attività cancerogena su animali e uomo.

Ad esempio, la piralide è un insetto le cui larve scavano gallerie nello stocco e nella spiga del mais trasportando spore fungine, che generano le infezioni sopra citate.

Utilizzare mais geneticamente modificato resistente alla piralide potrebbe risolvere questo problema.

Tolleranza agli erbicidi

Diversi sono gli erbicidi utilizzati in natura per combattere le erbe infestanti. Il glifosato è il principio attivo presente in alcuni di essi.

In condizioni normali, organismi vegetali, batteri e funghi producono un enzima noto come EPSPS (5-enolpiruvil-shikimate-3-fosfato-sintetasi) che agisce nella biosintesi degli aminoacidi aromatici come fenilalanina, tirosina e triptofano.

Questo enzima è prodotto nei batteri e nelle piante, mentre è assente negli animali. Il glifosato agisce da inibitore competitivo dell'enzima EPSPS. Avendo una geometria molecolare simile al suo substrato (il fosfoenolpiruvato), il glifosato compete col substrato naturale per il legame al sito attivo dell'enzima (Fig. 6).

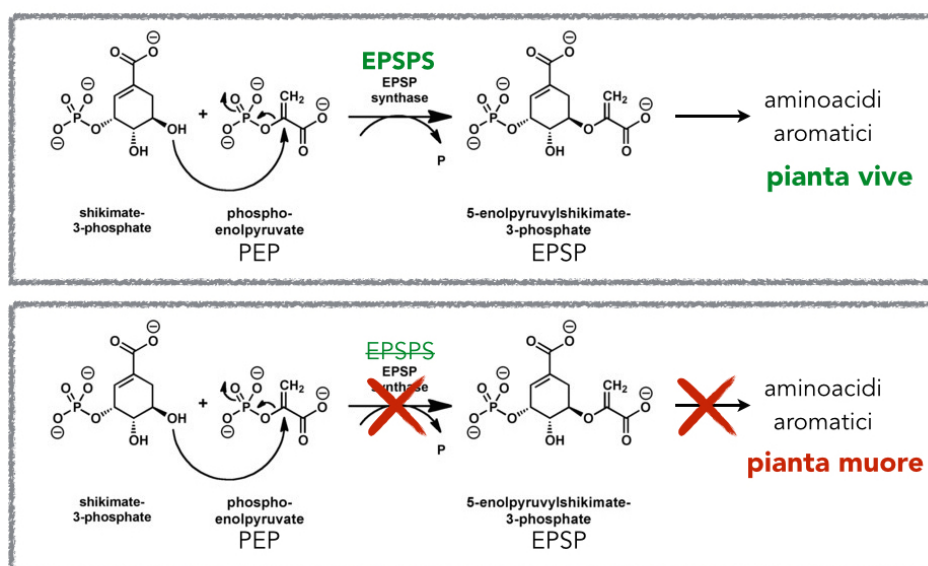


Fig. 6 . Schema del pathway di Shikimate, usato dalle piante per produrre aminoacidi aromatici

La tolleranza al glifosato è ottenuta inserendo nella pianta un transgene che codifica per una variante dell'enzima che è poco inibita dal glifosato stesso. Questa variante di EPSPS è ottenuta da un ceppo di *A. tumefaciens* resistente al glifosato.

La pianta geneticamente modificata sopravvive all'erbicida poiché l'attività dell'enzima EPSPS di *A. tumefaciens* è sufficiente a rimpiazzare quella dell'EPSPS endogeno, che è inibito dall'erbicida. Le erbe infestanti, che non sono trasformate, muoiono a causa dell'azione dell'erbicida (Fig. 7).

Ciò comporta un doppio vantaggio: sia la possibilità di utilizzare trattamenti che discriminano tra piante utili (geneticamente modificate) ed erbe infestanti, sia una riduzione dell'uso di erbicidi con conseguente riduzione dei costi e d'impatto ambientale.

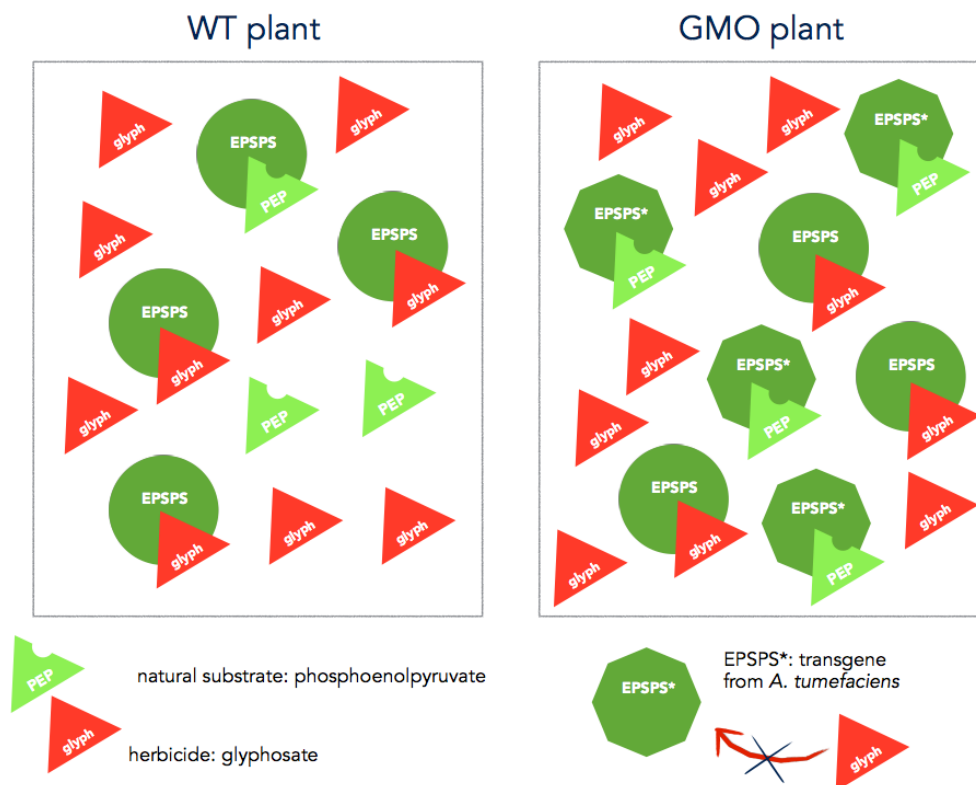


Fig. 7. Nelle piante wild type (WT), il glifosato compete col substrato naturale (PEP) per il legame all'enzima EPSPS. Nelle piante OGM, il prodotto del transgene EPSPS* non lega il glifosato e permette la sopravvivenza della pianta, anche se trattata con l'erbicida glifosato.

Il costrutto usato per trasformare la pianta

Il transgene è stato inserito nel vettore di clonaggio in una cassetta di espressione genica. A monte del gene si trova il promotore che regola il livello di espressione del gene e a valle un terminatore, che funge da segnale di stop per l'RNA polimerasi e determina la fine della trascrizione (Fig. 8).

I geni più comunemente inseriti nella cassetta di espressione di una pianta OGM sono:

- Promotore CAMV35S: promotore del gene per l'RNA 35S del virus a mosaico del cavolfiore, che è costitutivo e determina elevati livelli di espressione del gene che lo segue.
- Gene EPSPS: di *Agrobacterium tumefaciens* CP4, codifica per la 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasi, rende la pianta tollerante all'erbicida glifosato.
- Gene CTP2-epsps: gene EPSPS a cui è stato aggiunto il peptide segnale del gene EPSPS di *Arabidopsis thaliana* usato per veicolarlo al cloroplasto (CTP: Chloroplast-Transpeptide-signal sequence).
- Gene NptII: codifica per la neomicina fosfotransferasi, conferisce resistenza agli antibiotici aminoglicosidici, come la kanamicina e la neomicina.
- Gene pat: codifica per la fosfinotricina acetil-trasferasi derivante dallo *Streptomyces viridochromogenes*, che induce acetilazione ed inattivazione dell'erbicida glufosinate.
- Gene Cry: produce una proteina presa dal *Bacillus thuringiensis*, che forma pori nell'intestino della larva.
- Terminatore NOS: Terminatore ottenuto dal gene della nopalina sintetasi di *Agrobacterium tumefaciens*.

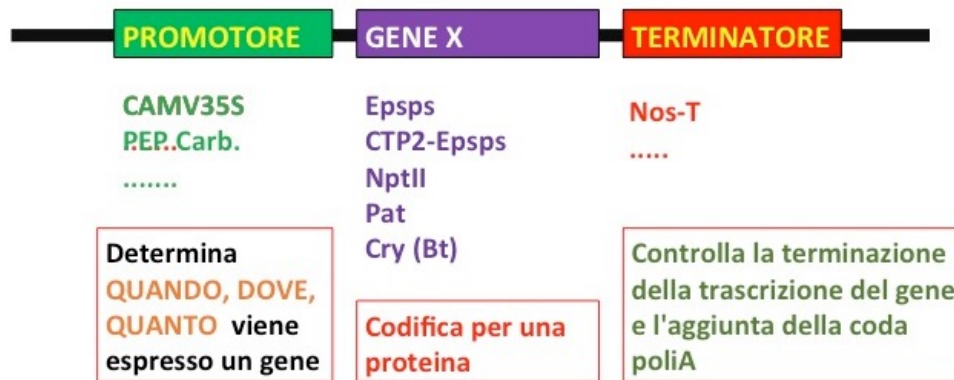


Fig. 8. Cassetta di espressione presente nel vettore di clonaggio

TECNICHE UTILIZZATE IN LABORATORIO

PCR (Polymerase Chain Reaction):

Si tratta di una tecnica che consiste nell'amplificazione specifica di segmenti di DNA mediante la reazione a catena della DNA polimerasi.

Elettroforesi su gel di agarosio:

E' una tecnica che consente di separare in base alle loro dimensioni (peso molecolare) molecole dotate di carica, facendole migrare su un gel in presenza di un campo elettrico.

Per il protocollo consultare la dispensa "Tecniche e Protocollo".

INTERPRETAZIONE DEL RISULTATO

Una volta visualizzato il gel, si interpreta il risultato

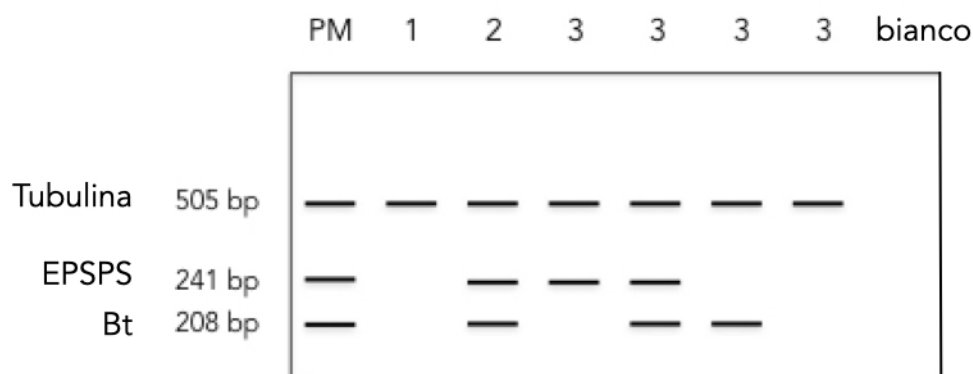


Fig. 09. Risultato della corsa elettroforetica.

PM: marcatore di peso molecolare

corsia 1: DNA di mais non OGM (contiene solo il gene della tubulina, gene presente costitutivamente)

corsia 2: DNA di mais OGM (con gene Bt e gene EPSPS)

corsie 3: altri campionamenti

bianco: bianco di PCR (costituito dalle stesse soluzioni e dagli stessi tamponi utilizzati, ma che non contiene DNA del campione. Serve per dimostrare l'assenza di DNA contaminante durante tutte le fasi di lavoro)

CURIOSITA'

Alla pagina del ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications) trovate l'elenco delle sementi OGM approvati finora

<https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>