

**SELEZIONE DELLE PIANTE
TRASFORMATE E
PROGETTAZIONE DI UN
COSTRUTTO TRANSGENICO**

SELEZIONE DELLE PIANTE TRASFORMATE

nel costrutto si inserisce un gene marcatore
per la selezione

- Resistenza ad un antibiotico
- Resistenza ad un erbicida

gene (prodotto)	sorgente	fenotipo
<i>nptII</i> (neomicina fosfotransferasi)	E. coli	resistenza antibiotici aminoglicosidici (neomicina, kanamicina)
<i>hpt</i> (igromicina fosfotransferasi)	Klebsiella	resistenza antibiotico igromicina
<i>aad</i> (aminoglicoside acetiltransferasi)	Shigella flexneri	resistenza alla streptomicina, spectomicina e sulfonammidi
<i>dhfr</i> (diidrofolato reduttasi)	Topo	resistenza al metotrexato
<i>epsps</i> (5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasi)	Petunia hybrida	resistenza all'erbicida glifosato (Round-up)
<i>bar</i> (fosfoinotricina acetiltransferasi)	Streptomyces hygroscopicus	resistenza alla fosfoinotricina (PPT), componente degli erbicidi: glufosinato, Basta, bialophos

Marcatore evidenziabile con un saggio

GENI REPORTER

- **Saggi biochimici** attività rilevabili solo in vitro
- svantaggio: distruttivi
- **Saggi in situ** attività rilevabili in vivo
- alcuni non sono distruttivi

Saggi biochimici

- *cat*
cloramfenicolo
acetiltransferasi

Attività: catalizza il trasferimento di gruppi acetile dall'Acetil-CoA al cloramfenicolo

Saggio: solo in vitro

Vantaggi: facile da effettuare

Svantaggi: bassa sensibilità

Saggi in situ

- *gus*
 β -glucuronidasi

Attività: catalizza l'idrolisi dei glucuronidi

Saggio: in vitro e in vivo

Vantaggi: facile da effettuare, sensibile e quantitativo

Svantaggi: distruttivo, lungo

- *luc*
luciferasi

Attività: luce prodotta in presenza di luciferina, O_2 , Mg^{2+} e ATP

Saggio: bioluminescente in vitro e in vivo

Vantaggi: sensibile e quantitativo

Svantaggi: riproducibilità limitata, non economico il sistema di rivelazione

Saggi in situ

- regolatori
biosintesi
antocianine

Attività: induzione della pigmentazione

Saggio: visivo in vivo

Vantaggi: semplice, non distruttivo

Svantaggi: bassa sensibilità, non quantitativo

- GFP
green fluorescent
protein
(medusa *Aequorea
victoria*)

Attività: intrinseca fluorescenza alla luce
blu-UV

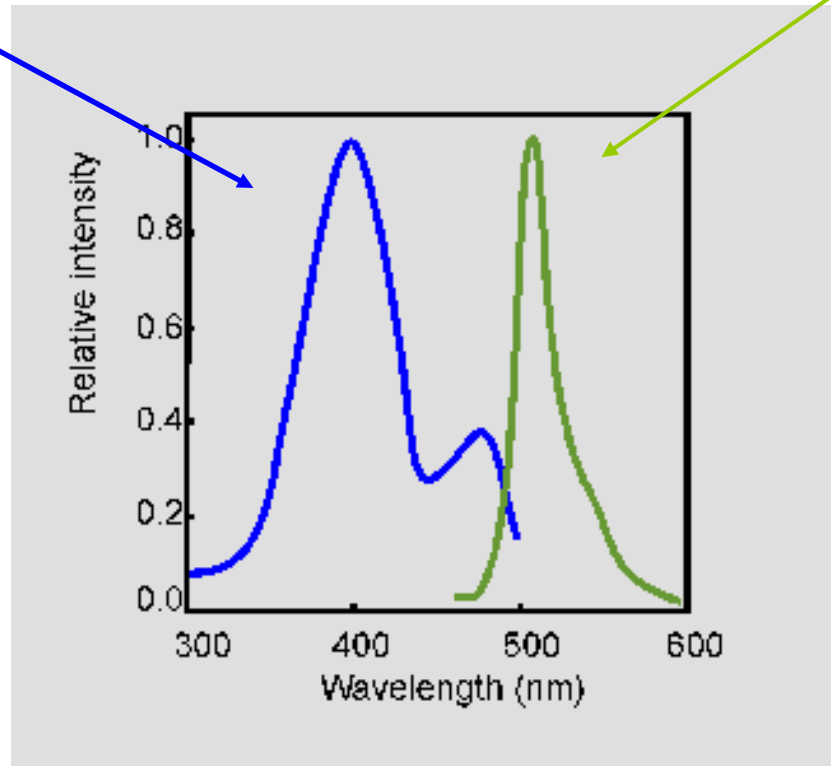
Saggio: in vivo (pianta integra)

Vantaggi: non richiede substrati, sensibile,
uso sulla pianta vitale

Svantaggi: segnale debole in alcuni sistemi

spettro di eccitazione

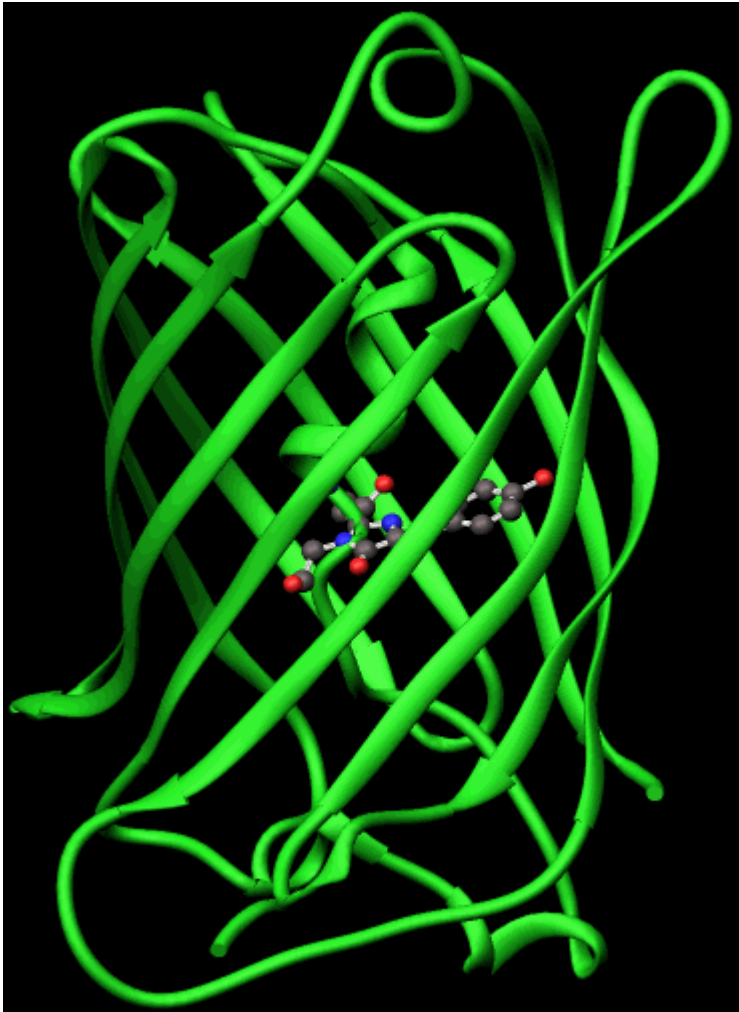
spettro di emissione

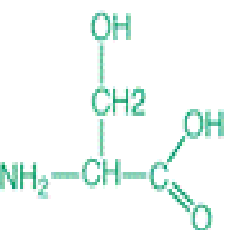


massimo 395 nm
470 nm

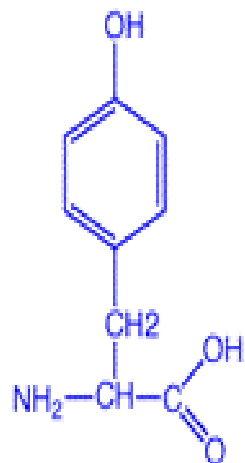
massimo 509 nm
spalla 540 nm

perché la GFP è fluorescente?

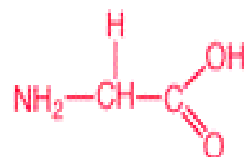




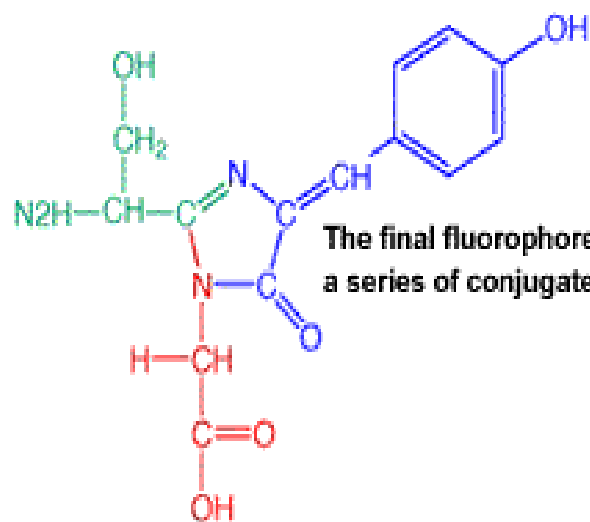
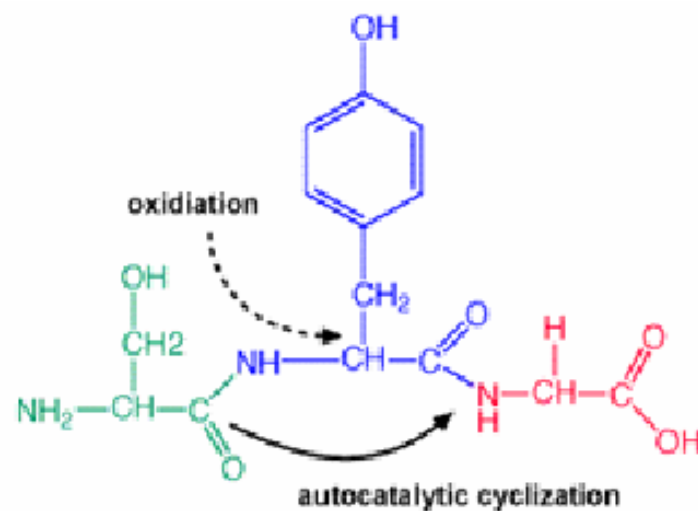
Ser 65



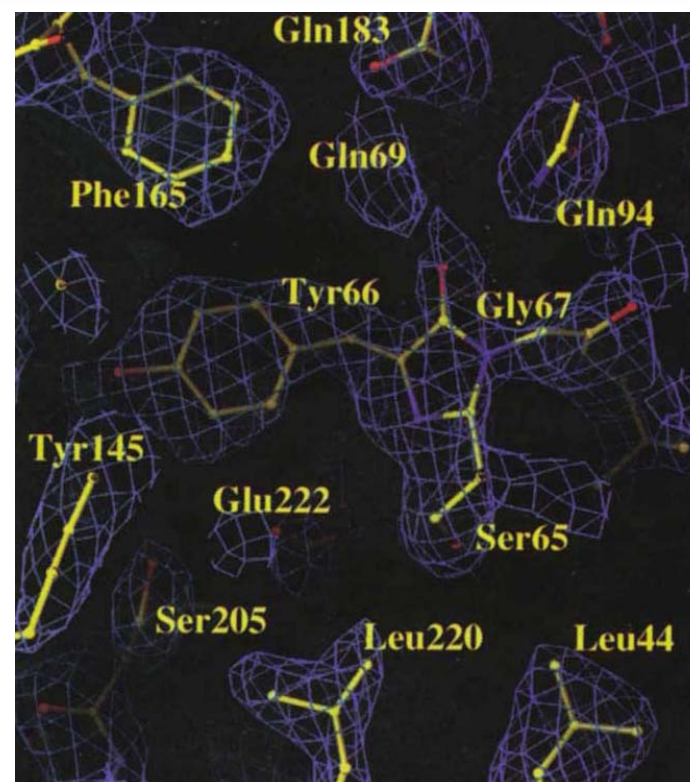
Tyr 66

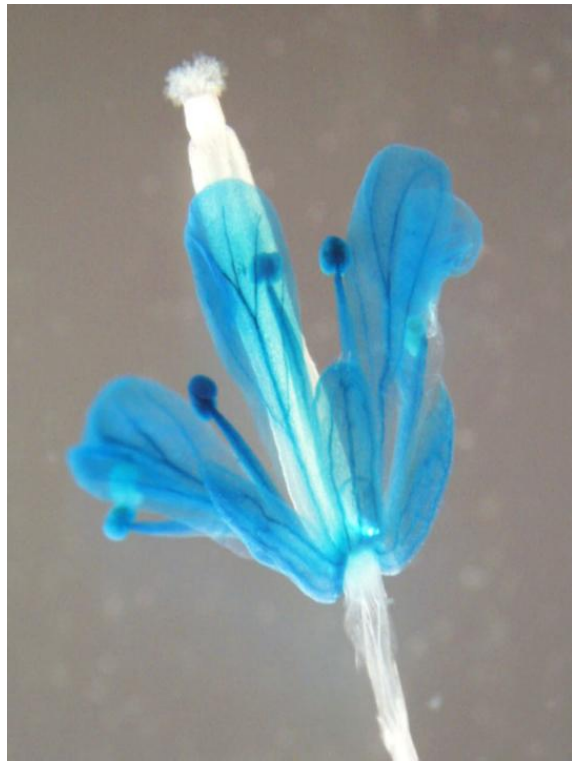


Gly 67

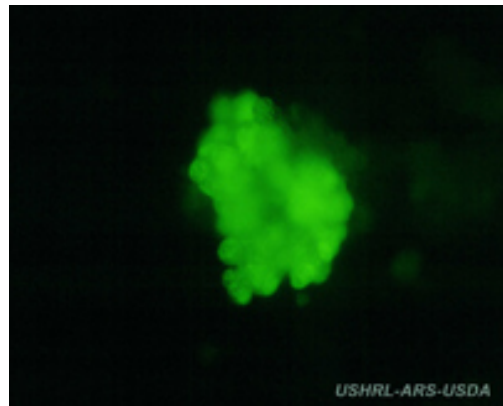
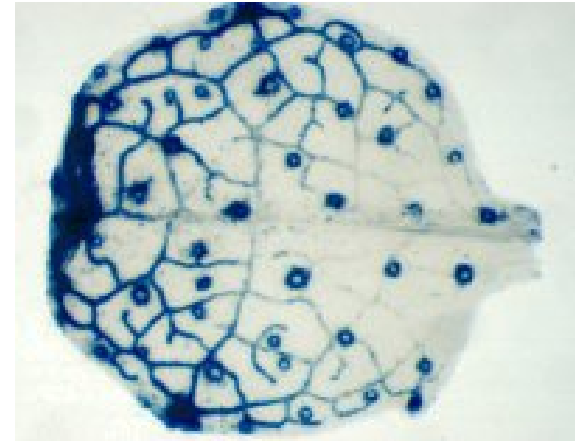


The final fluorophore contains a series of conjugated double bonds





GUS



GFP



**COME SI PROGETTA UN COSTRUTTO
TRANSGENICO?**

LB



RB



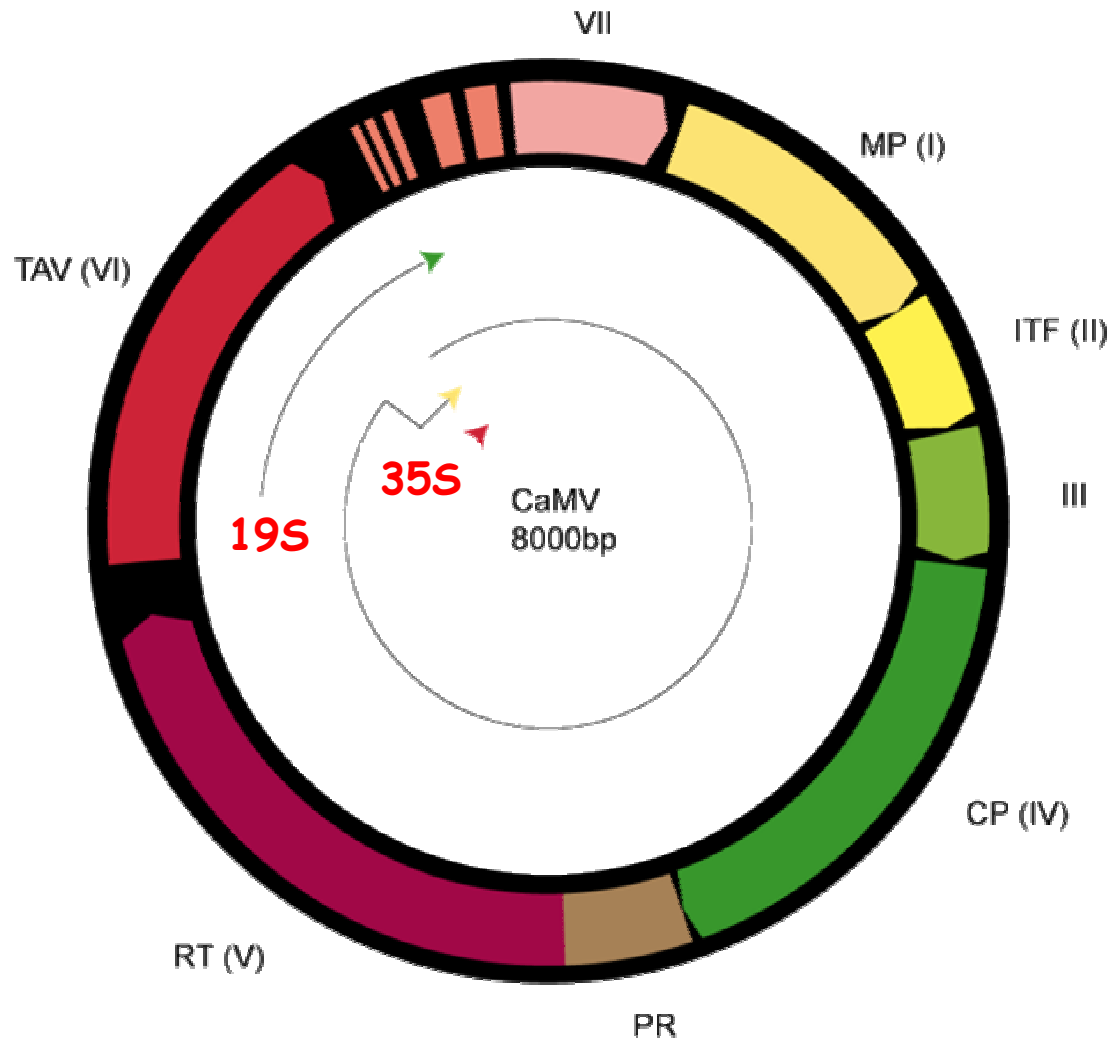
T-DNA

PROMOTORI

- COSTITUTIVI
- TESSUTO-SPECIFICI
- INDUCIBILI

- **Costitutivi**

- **CaMV 35S** (elevati livelli di espressione)
RNA 35S del virus a mosaico del cavolfiore
- **Actina di riso**
- **Ubiquitina di mais**
- **Nos, Ocs** (nopalina, octopina sintasi)



MP: movement protein

ITF: insect transmission factor

CP: capsid protein

PR: protease

RT: reverse transcriptase

TAV: translational activator

virus a mosaico del cavolfiore

- Tessuto-specifici

- semi
- radici
- foglie
- polline
- etc.

Tissue-specific promoters

α -Amylase

Glutenin

β -Hordenine

Phaseollin

Tissue expression

Aleurone

Endosperm

Endosperm

Cotyledon

- **Inducibili**

- **espressione regolata dallo sviluppo**
- **indotti da luce, stress, ormoni**

Inducible promoters

Small subunit Rubisco
Chlorophyll a/b binding protein
Alcohol dehydrogenase-1
Heat shock proteins
Chalcone synthase
Potato inhibitor-II

Induction conditions

Light
Light
Anaerobiosis
Heat shock
Fungal elicitors
Wounding

VANTAGGI

1. E' possibile analizzare la funzione di geni la cui espressione ectopica è tossica
2. La funzione del transgene può essere analizzata comparando la stessa pianta in condizioni di induzione e di non induzione
3. Poichè l'attivazione del transgene ha "un inizio", è possibile capire meglio gli eventi causati dalle sue funzioni

PROMOTORI INDUCIBILI CHIMICAMENTE

Table 1

Desired properties of an ideal chemical-inducible system in plants.

Very low basal expression level

High inducibility

High specificity with respect to inducers

High dynamic range of response with respect to inducer concentrations

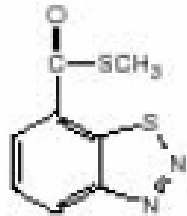
Fast response upon induction

Rapid switch-off following inducer withdrawal

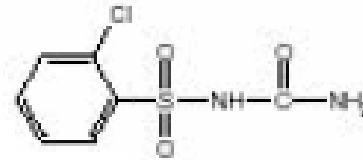
Inducer not toxic and has no physiologic effects plants

Inducer not found in target plants

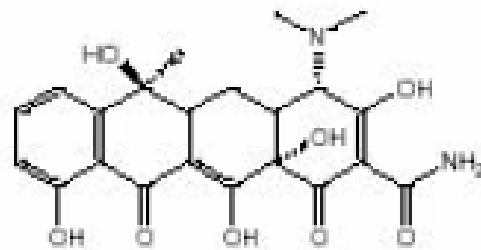
molecole utilizzate per l'induzione chimica dell'espressione di transgeni in pianta



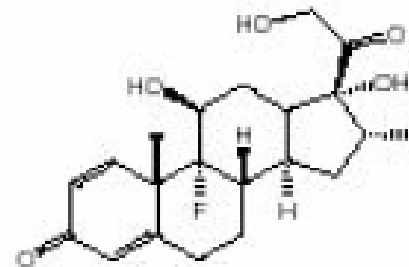
Benzothiadiazole
(BTH)



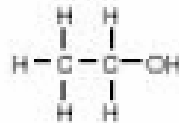
Saliner
N-(aminocarbonyl)-
2-chlorobenzenesulfonamide



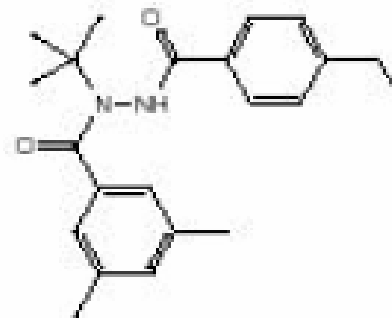
Tetracycline



Dexamethasone



Ethanol



RH-5992

SISTEMA DI ESPRESSIONE INDUCIBILE DA TETRACICLINA

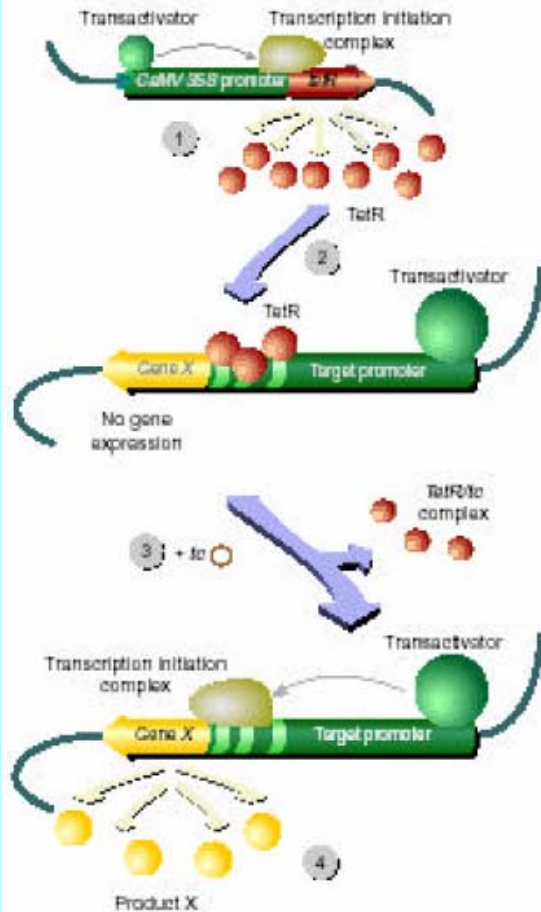


Fig. 2. The tetracycline-inducible expression system. (1) The *TetR* encoded Tet repressor (TetR, M, 24 kDa) is synthesized under the control of a strong constitutive promoter (e.g. CaMV 35S promoter). (2) The target promoter (e.g. a modified CaMV 35S promoter) contains three 19 bp *tet* operator sites that flank the TATA box. By binding to these sequences, three TetR dimers interfere with the assembly of the transcription initiation complex. As the transcription initiation complex is stabilized by multiple protein-protein interactions, stringent repression requires high levels of TetR. (3) The antibiotic binds to TetR with a high affinity, abolishing its DNA-binding ability. (4) Under these conditions, repression is relieved, leading to the synthesis of the gene product. This system has been shown to work in tobacco, potato and tomato plants, but not in *Arabidopsis*, which might not tolerate the amounts of TetR needed for efficient repression.

- livelli di espressione paragonabili a quelli ottenuti con il CaMV 35S
- la Tet può essere facilmente applicata per infiltrazione (anche solo sul tessuto dove si vuole studiare l'espressione del transgene)
- funziona in tabacco, pomodoro, patata, ma non in *Arabidopsis*

PROMOTORI INDUCIBILI DA STEROIDI

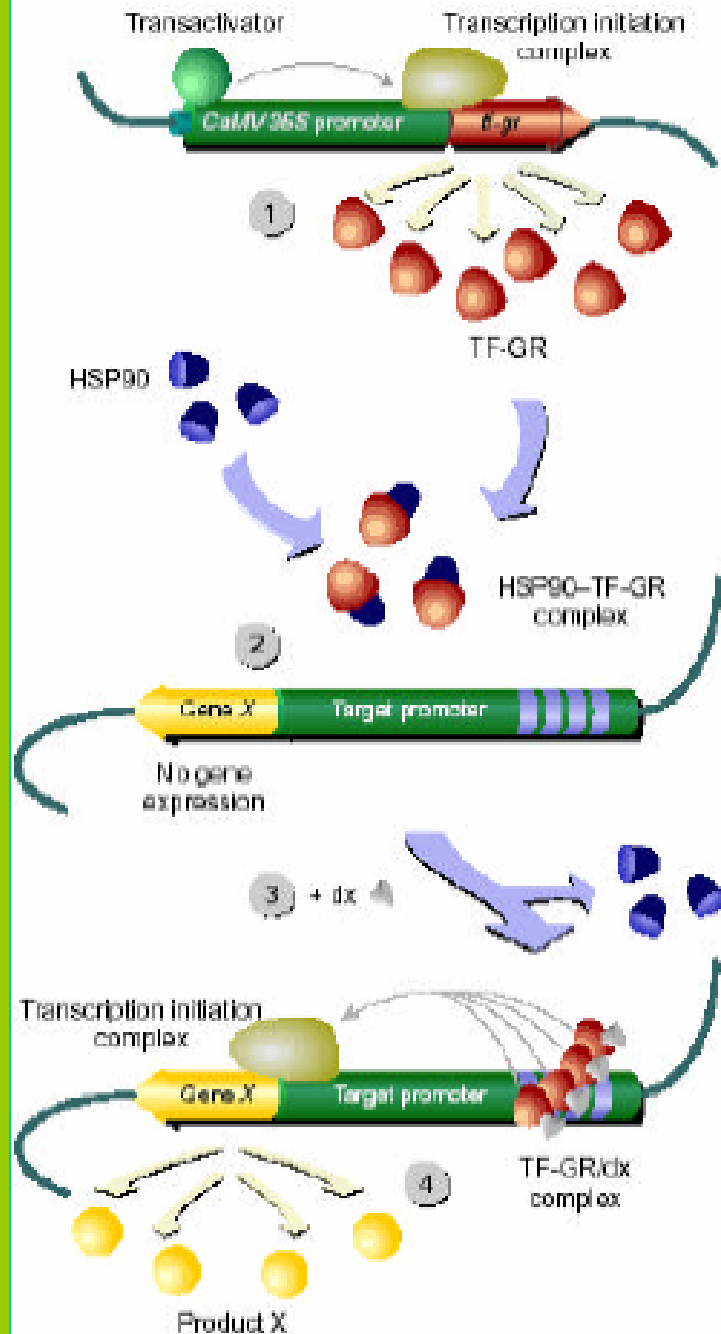
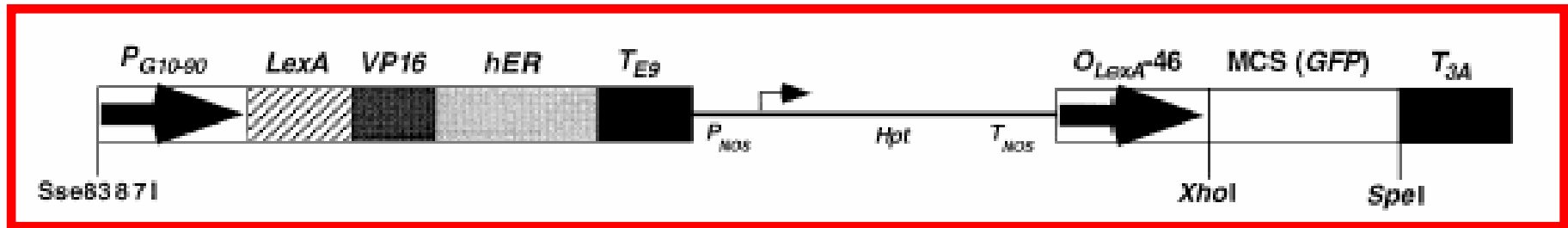


Fig. 4. The dexamethasone-inducible expression system. (1) The fusion protein TF-GR, consisting of a transcription factor (DNA binding domain and transcriptional activation domain) and the glucocorticoid binding domain, is expressed under the control of a strong promoter (e.g. CaMV 35S promoter). (2) In the absence of dexamethasone the activator is trapped by the formation of an inactive complex with HSP90. (3) The binding of dexamethasone mediates dissociation from HSP90 and allows binding of the activator to a target promoter that contains multiple TF-GR binding sites upstream of a short DNA fragment that encodes the TATA box. (4) Transcription from the target promoter is induced. TF can be any transcription factor that contains a DNA-binding domain and an activation domain. Aoyama and Chua have used the DNA-binding domain of yeast transcription factor GAL4 and the acid activation domain of *Herpes simplex virus* protein 16 (Ref. 9).

svantaggio: background
elevato in assenza di ormone

SISTEMA DI ESPRESSIONE INDUCIBILE BASATO SUL RECETTORE DEGLI ESTROGENI



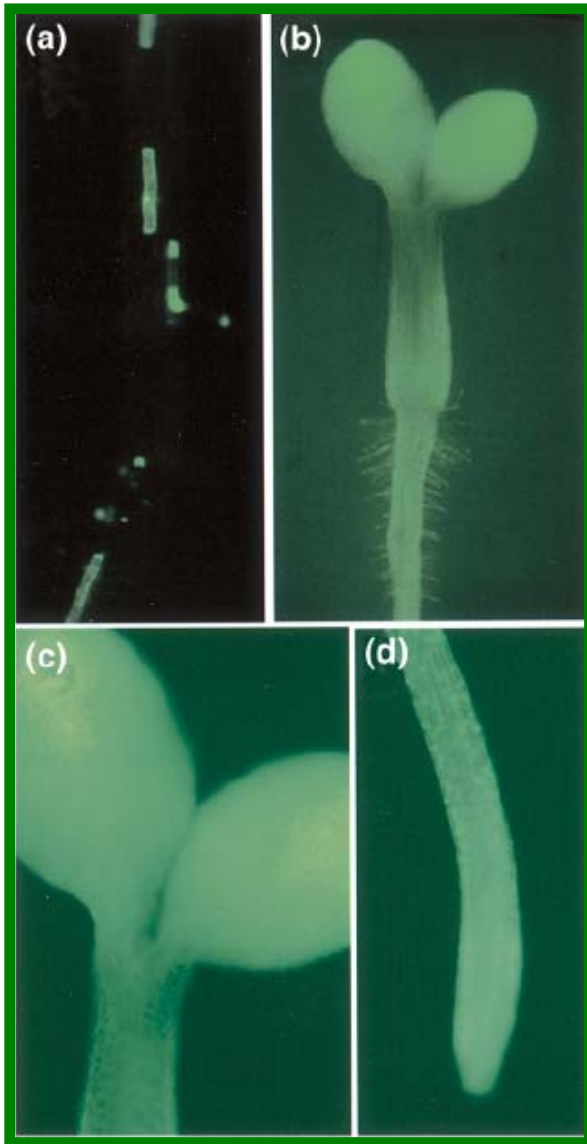
Vettore XVE

Un forte promotore costitutivo (G10-90) controlla l'espressione del gene di fusione XVE

X: DNA binding domain di LexA

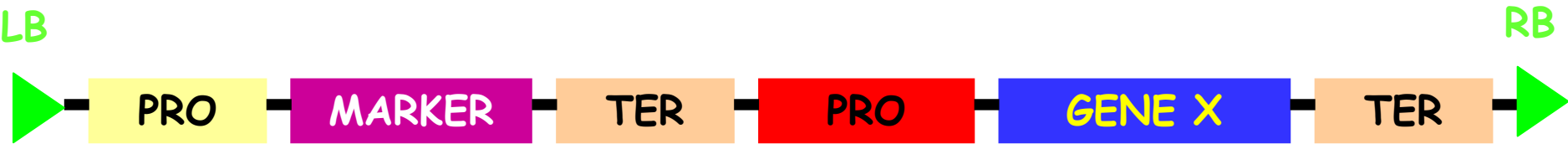
V: dominio acido di attivazione di VP16

ER: region C-terminale del recettore umano degli estrogeni

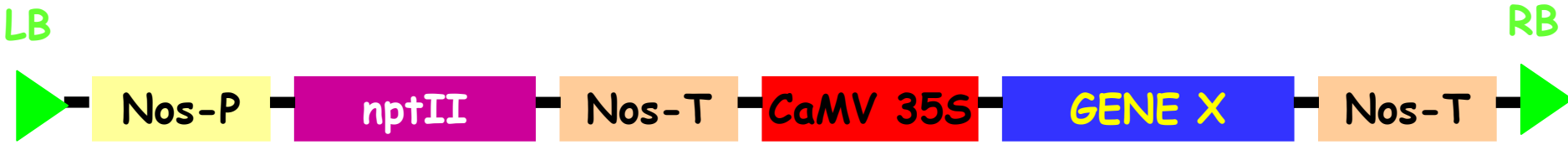
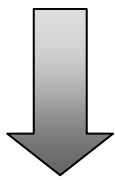


espressione della GFP indotta da
2 μ M estradiolo

- E' strettamente inducibile da estradiolo
(No background)
- Livelli di espressione della GFP fino a 8
volte superiori rispetto a quelli
ottenuti con *35S::GFP*
- Sistema non tossico per la pianta e
senza effetti fisiologici aspecifici

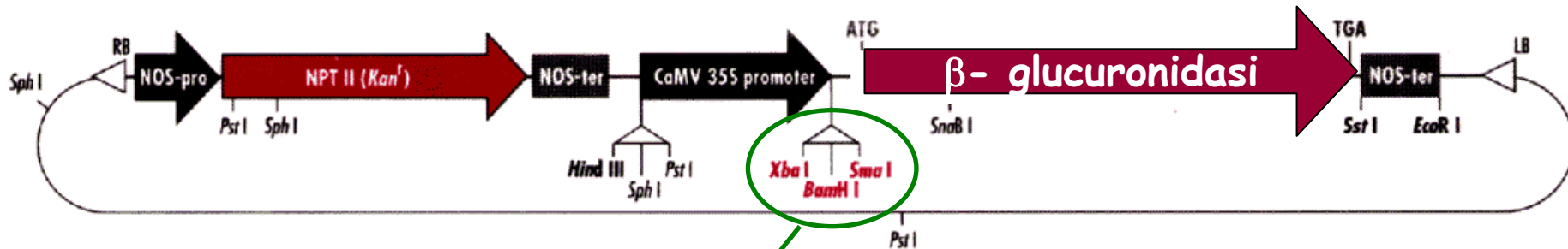


T-DNA



T-DNA

gene di interesse



pBI121

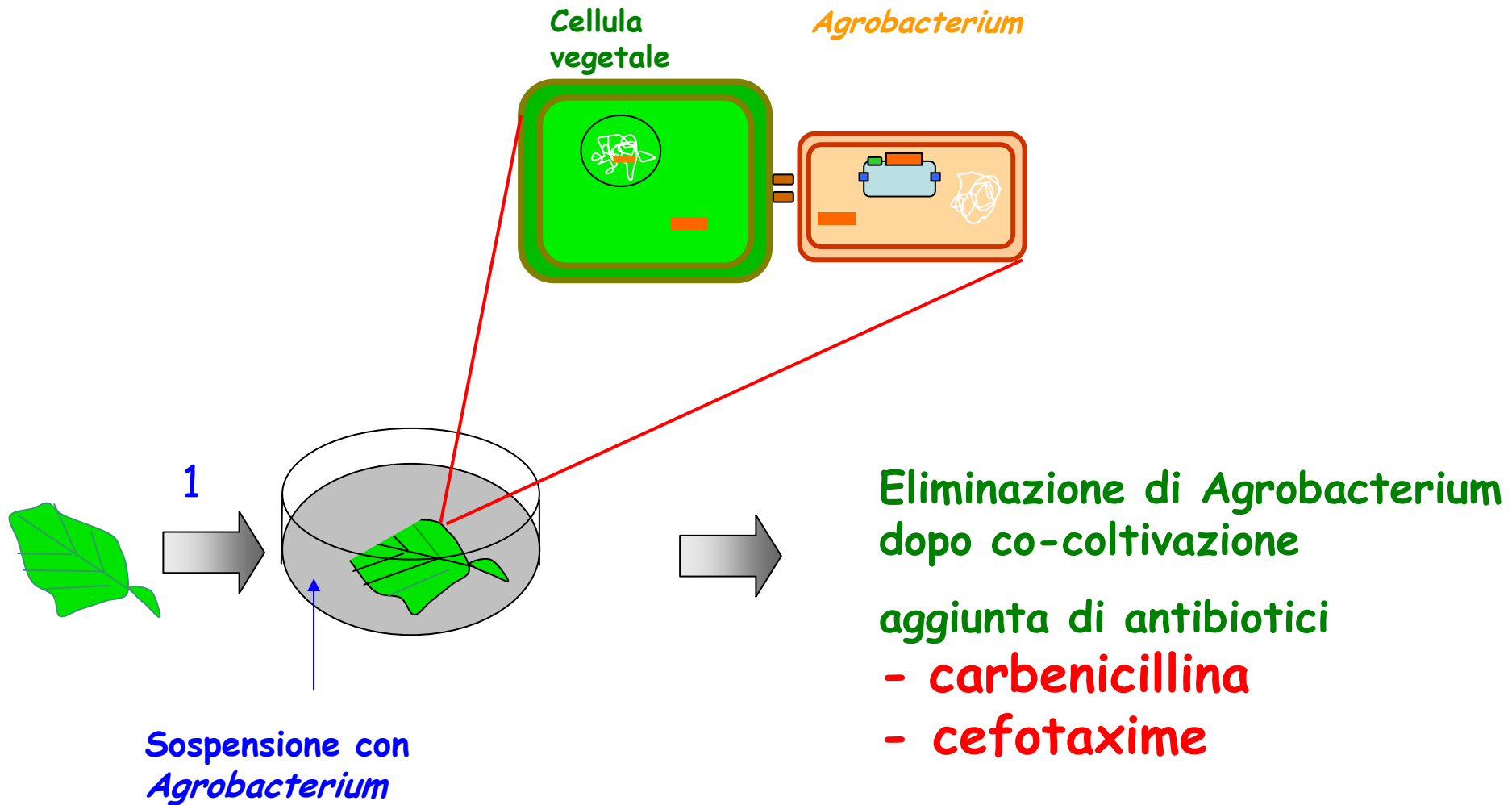
siti di clonaggio

Sma I
TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG
Xba I BamH I

from Clontech
catalogue 1996 / 97

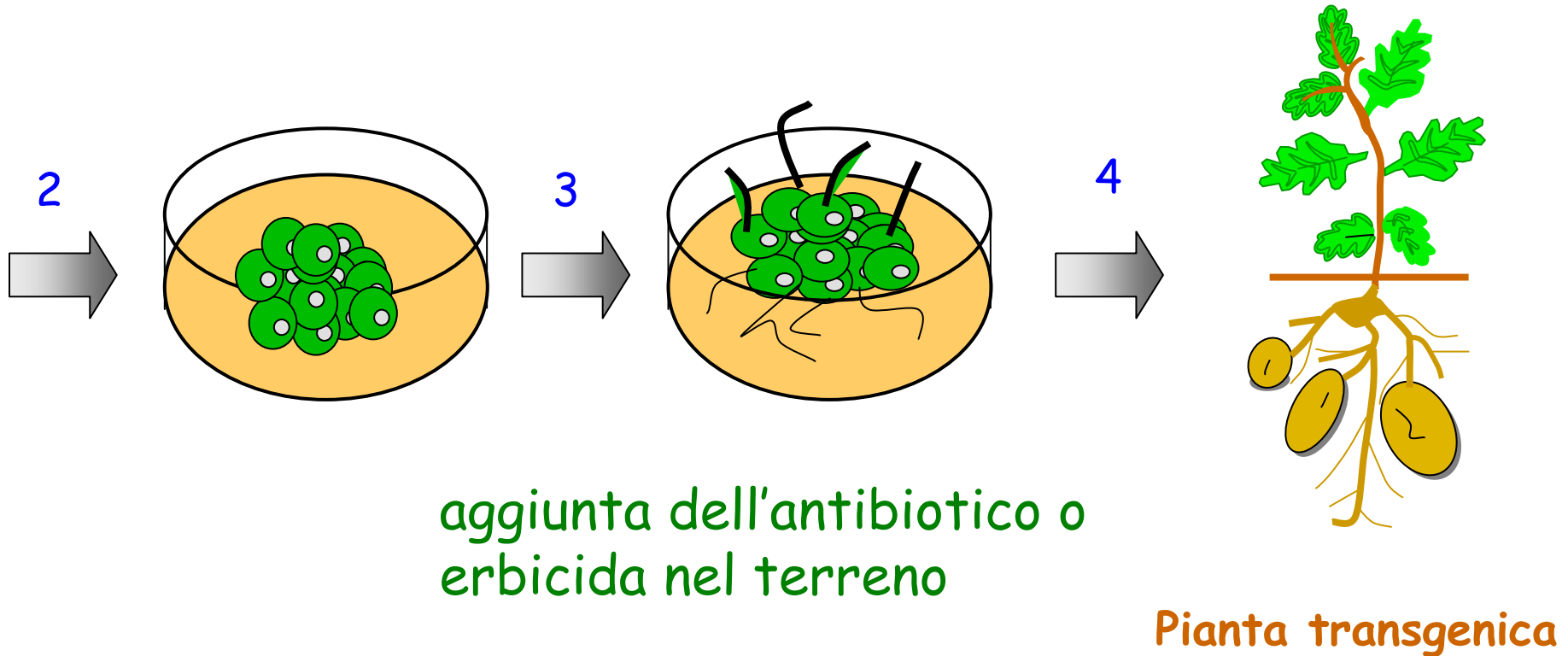
vettore binario in commercio

Infezione con *Agrobacterium*



Infezione con *Agrobacterium*

selezione delle
piante trasformate



TRASFORMAZIONE POMODORO AGROBACTERIUM



GERMINAZIONE

Semi di pomodoro, sterilizzati in superficie, sono posti in piastre petri contenenti mezzo nutriente per la germinazione



ESPIANTI

Dopo 7-10 giorni le piantine di pomodoro sono allo stadio in cui i cotiledoni possono essere tagliati (espianti) ed utilizzati per la trasformazione

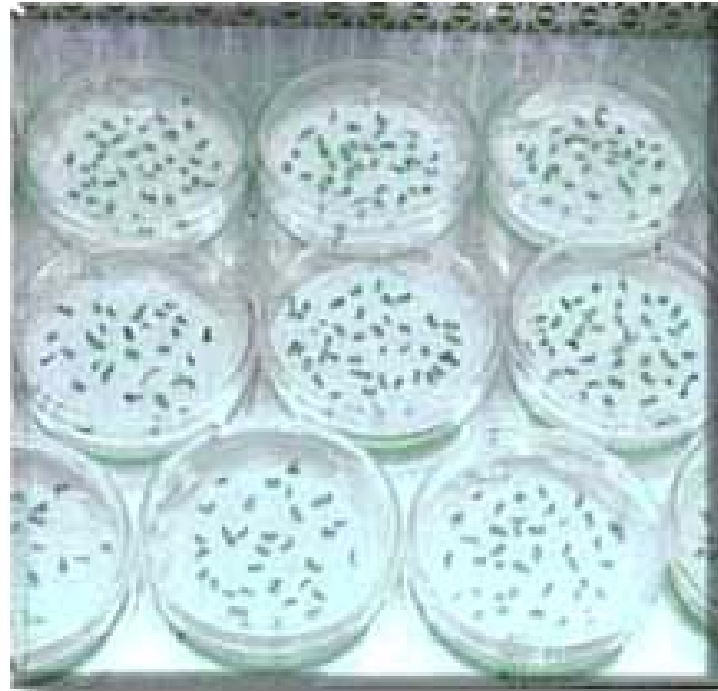


TAGLIO DEGLI ESPIANTI

Gli espianti di cotiledone sono tagliati dalle piantine. Le cellule ferite ottenute dal taglio saranno il sito del trasferimento del DNA dall'Agrobacterium

ESPOSIZIONE ALL'AGROBACTERIUM

Dopo un periodo di adattamento (24 h) nelle piastre ottimali per l'infezione, gli espianti sono competenti per la trasformazione e sono quindi esposti all'Agrobacterium



ELIMINAZIONE DELL'ECESSO DI AGROBACTERIUM

Si elimina dagli espianti con carta assorbente per evitare una eccessiva crescita dei batteri durante la co-coltivazione.

TRASFERIMENTO DEL DNA (CO-COLTIVAZIONE)

Gli espianti sono co-coltivati per 48 h per permettere il trasferimento del DNA dall'agrobatterio alle cellule vegetali.



RIGENERAZIONE DELLE PIANTE DI POMODORO

Gli espianti sono posti in un mezzo contenente:

- antibiotico per il controllo dell'*Agrobacterium* (es. carbenicillina)
- regolatori di crescita delle piante: auxina e citochinine
- antibiotico per la selezione dei calli trasformati (es. kanamicina)

Time point: 3 settimane



FORMAZIONE DI PLANTULE

Dopo 6 settimane si prelevano i calli dai cotiledoni e le piantule che si cominciano a formare sono trasferite su un mezzo fresco di crescita.

Time point: 9 settimane



MEZZO DI RADICAZIONE

Le plantule di pomodoro rigenerate dai calli vengono trasferite su un mezzo che favorisce la radicazione (no citochinina) sempre in presenza dell'antibiotico per la selezione

Time point: 11 settimane



TRASFERIMENTO NEL TERRENO

La piantine sono trasferite in terra in contenitori chiusi.
Le piante devono essere acclimatate all'aria lentamente in
un tempo di 4-5 giorni.

Time point: 13 settimane



TRASFERIMENTO IN SERRA

Le piante trasgeniche sono pronte per essere trasferite in serra.

Time point: 15 settimane

ESPRESSIONE TRANSIENTE

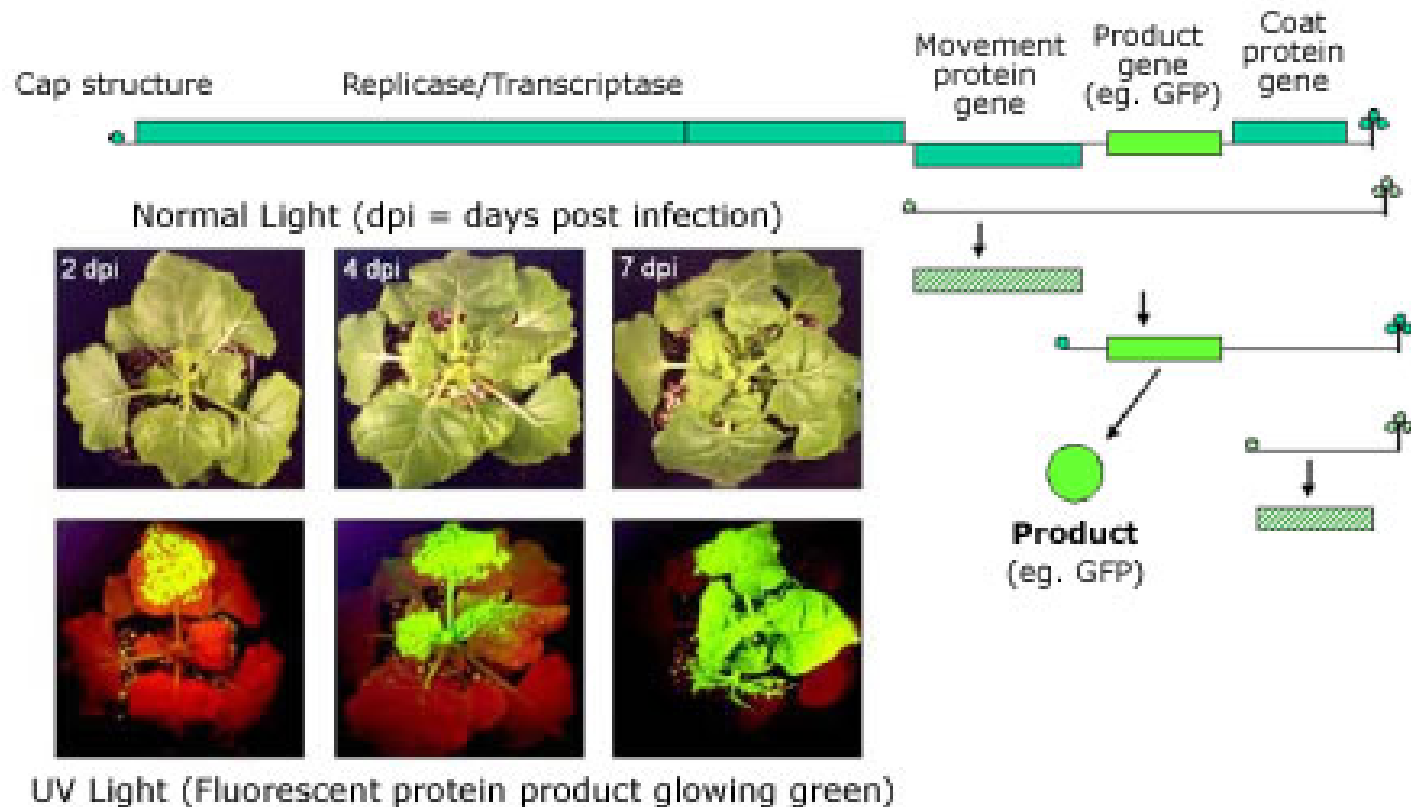
La pianta non viene trasformata
stabilmente

Il transgene non viene integrato e non
viene quindi trasferito alla progenie

- **Agrobacterium (bassi livelli di espressione)**
- **Sistema biolistico**
- **Espressione in protoplasti** – trasformazione mediante elettroporazione o PEG
- **Espressione mediata da virus** – infezione con Potato virus X (PVX) o Tomato mosaic virus (TMV)

Espressione di geni in pianta mediante l'uso di vettori virali

LSBC's GENEWARE® Free-Protein Expression Vectors



Espressione di geni in pianta mediante l'uso di vettori virali

VANTAGGI

- ❖ Elevato numero di copie di genoma virale per cellula



alti livelli di espressione del gene

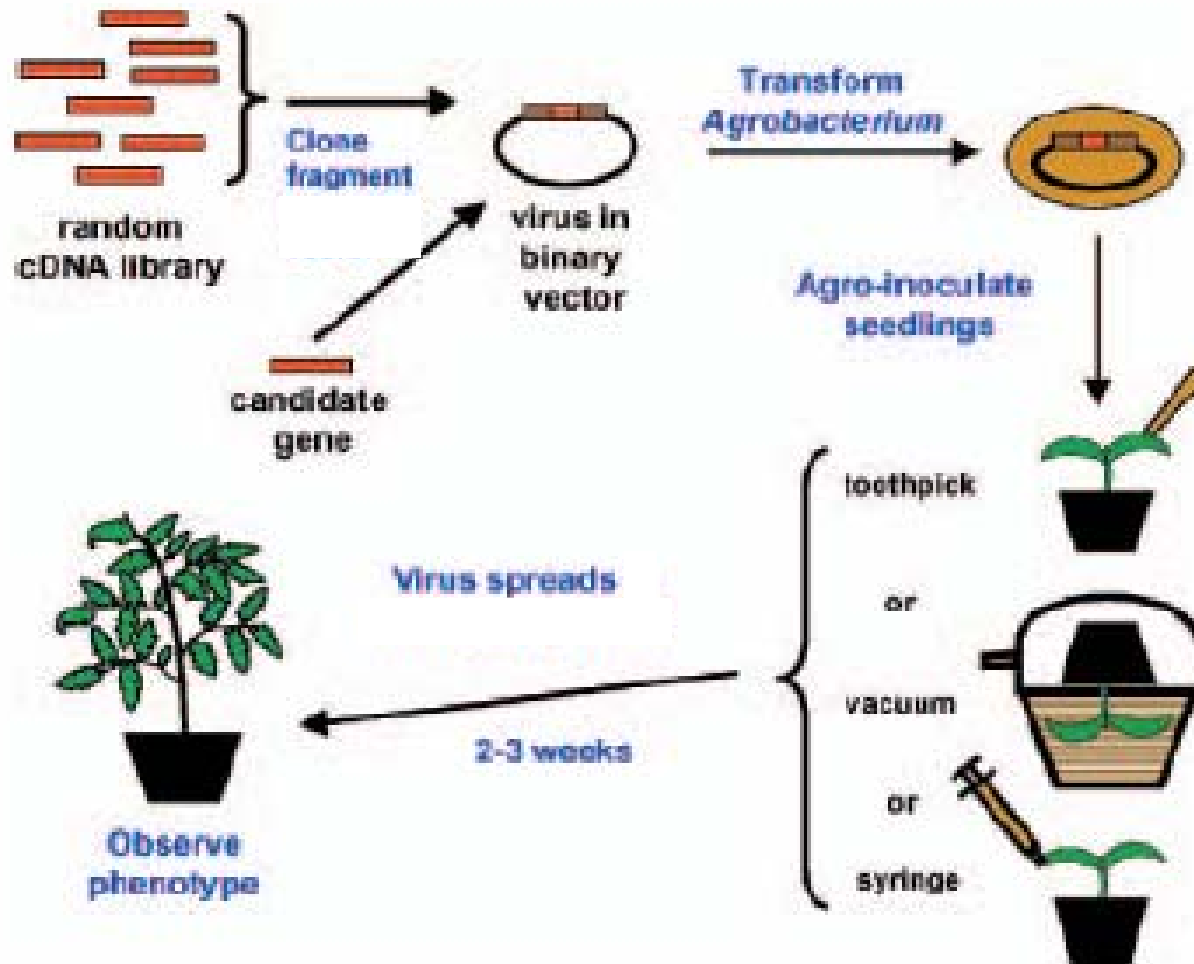
- ❖ Facile introduzione e diffusione autonoma nella pianta (plasmodesmi - sistema vascolare)
- ❖ Assenza di effetto di posizione

SVANTAGGI

- ❖ Sintomi virali nella pianta infettata (possono interferire con l'effetto indotto dall'espressione del gene)
- ❖ Elevata velocità di mutazione spontanea

Per infettare la pianta i vettori virali a RNA richiedono la trascrizione in vitro

Sistema alternativo **AGROINOCULAZIONE**



Localizzazione cellulare di una proteina

espressione transiente di una proteina di
fusione con la GFP



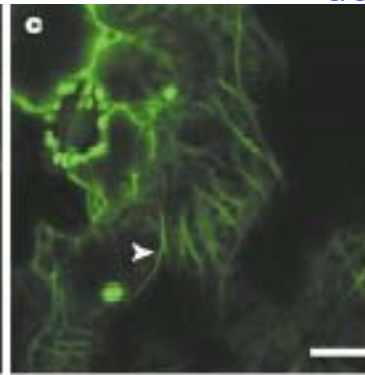
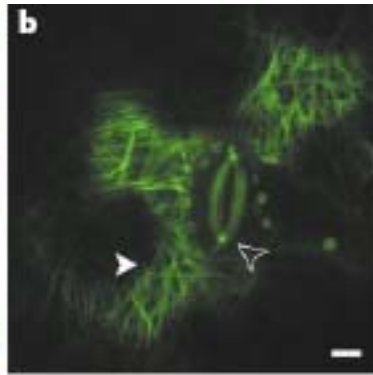
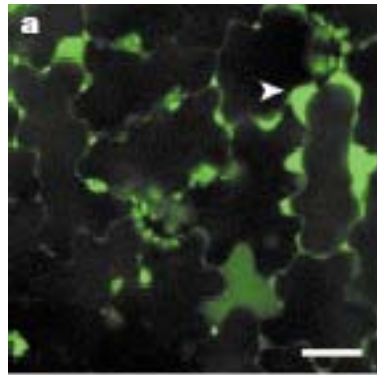
vettore virale

sistema biolistico

GFP-peptide
di secrezione
nell'apoplasto

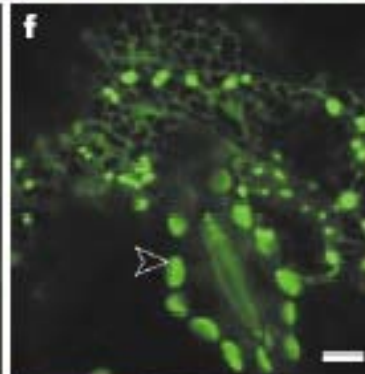
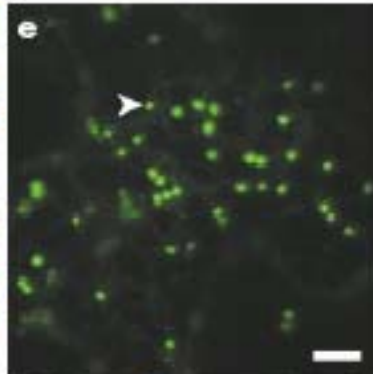
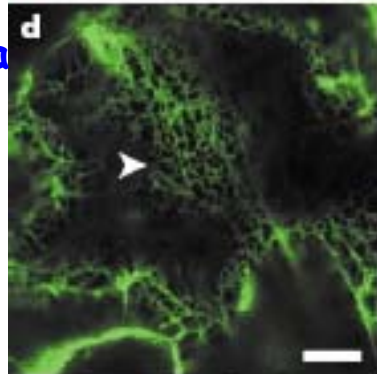
GFP-tubulina

GFP-dominio di
legame all'actina
della talina

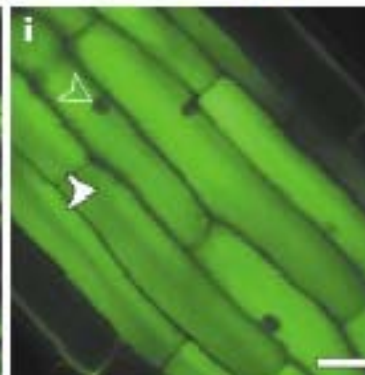
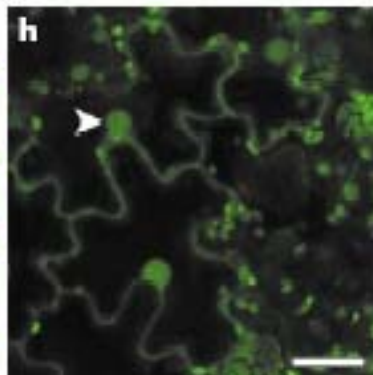
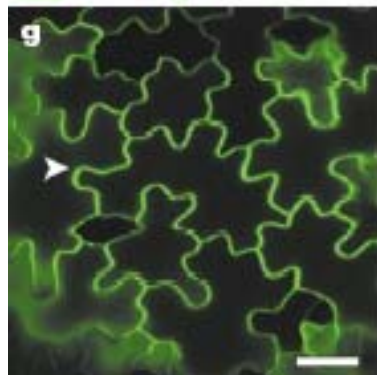


GFP-calreticulina
di mais (ER)

GFP-HDEL
recettore
(Golgi)



GFP-peptide di
membrana
plasmatica



FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer

Permette di studiare le **interazioni proteina-proteina** a livello cellulare

Fenomeno che avviene quando due cromofori (accettore e donatore) hanno gli spettri di assorbimento ed emissione parzialmente sovrapposti

Il trasferimento di energia dipende dalla distanza tra le due proteine

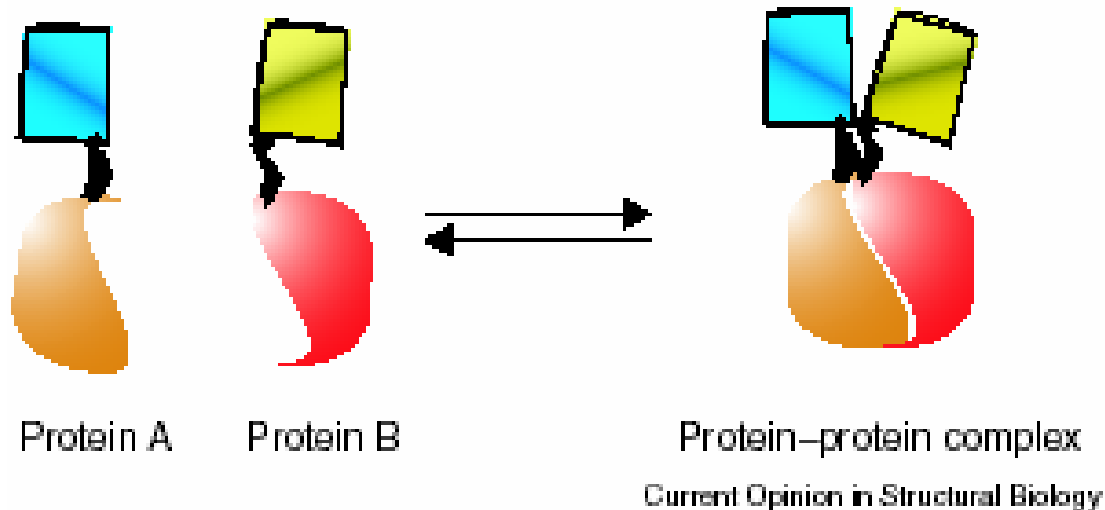
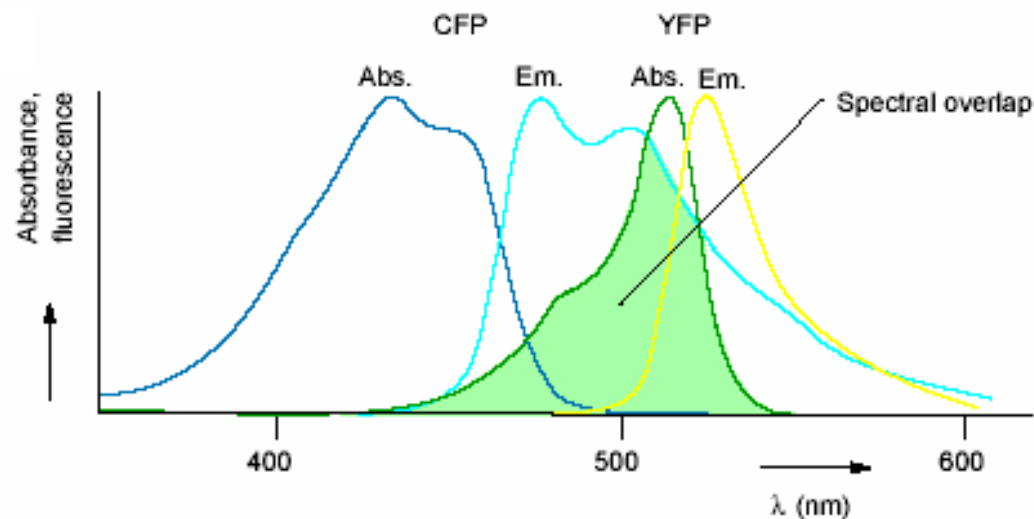


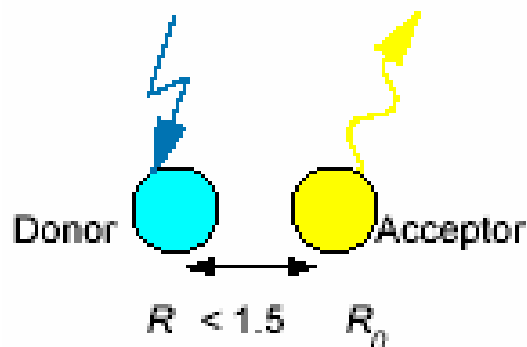
Table 1 | **Examples of fluorescent proteins commonly used in plants**

Fluorescent protein	Amino-acid substitutions with respect to wild-type GFP	Absorbance/emission (nm)
Wild type GFP	(Chromophore: S65–Y66–G67)	396,475/508
mGFP5	V163A, I167T, S175G,	400,475/508
mCFP	Y66W,V163A,S175G	440/485
mYFP	S65G,S72A,V163A,I167T,S175G,T203Y	514/527
RsGFP	S65G,S72A	505/522
EGFP	F64L,S65T, ^a	488/507
ECFP	K26R,F64L,S65T,Y66W,N146I,M153T,V163A,N164H,N212K, ^a	434/474
EYFP	S65G,V68L,S72A,T203Y, ^a	514/527
DsRed	–	558/583

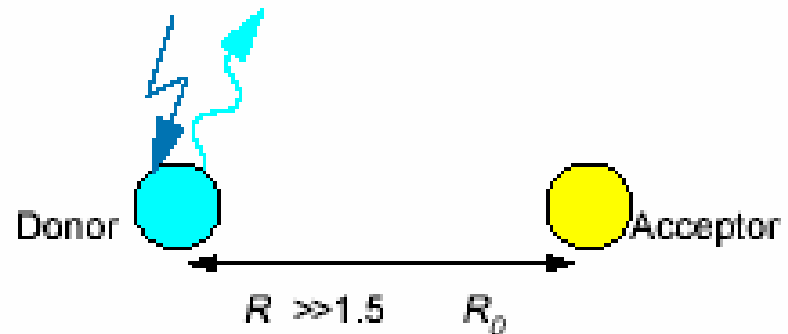


Lo spettro di emissione della CFP è parzialmente sovrapposto allo spettro di eccitazione della YFP

Il trasferimento di energia si osserva se la distanza tra i due fluorofori è inferiore alla distanza di Förster



FRET: donor is excited and acceptor fluoresces



No FRET: donor is excited and donor fluoresces

