

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE E FORESTALI

Corso di Dottorato di Ricerca in

Scienze delle produzioni vegetali e animali - XXIX Ciclo

**MODIFICAZIONE DELLA VIA BIOSINTETICA DEI FLAVONOIDI IN POMODORO
E VALUTAZIONE DELLE PROPRIETA' SALUTISTICHE
DEI NUOVI ALIMENTI FUNZIONALI**

s.s.d. BIO/04

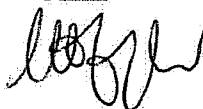
Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Aurelia Scarano

Coordinatore del corso

Prof.ssa Stefania Masci

Firma



Tutore

Dott. Angelo Santino

Firma



Co-tutore

Dott. ssa Giovanna Giovinazzo

Firma



A.A. 2016/17

INDICE

ABSTRACT	I
RIASSUNTO	II
INTRODUZIONE	1
Capitolo 1.	1
1.1. Metabolismo secondario delle piante	1
1.2. I polifenoli	2
1.2.1. Acidi fenolici	2
1.2.2. Flavonoidi	4
1.2.3. Lignani	7
1.2.4. Stilbeni	8
1.3. Via biosintetica dei flavonoidi	9
1.4. Regolazione della via biosintetica dei flavonoidi	11
1.4.1. Regolazione della biosintesi di flavonoidi in <i>Arabidopsis</i> , mais, tabacco e pomodoro	13
1.4.2. Regolazione della biosintesi di antocianine in <i>Arabidopsis</i> , <i>Petunia</i> e <i>Antirrhinum</i>	13
Capitolo 2.	16
2.1. Ingegneria metabolica	16
2.1.1. Modificazioni della via biosintetica dei flavonoidi in pomodoro mediante geni strutturali e geni regolatori	17
2.2. Le nuove tecnologie di genome editing	18
2.2.1. Il sistema CRISPR/Cas9	19
2.2.2. Applicazione del sistema CRISPR/Cas9 in piante modello e nelle specie da raccolto	20
Capitolo 3.	22
3.1. Proprietà salutistiche dei polifenoli.....	22
3.1.1. Attività antiossidanti	22
3.2.1. Attività antinfiammatorie	23
3.2. Biodisponibilità e metabolismo dei polifenoli	24
3.3. Polifenoli e microbiota intestinale	25
3.4. Ruolo dei polifenoli nella cura delle patologie croniche intestinali (IBDs)	26
SCOPO DEL LAVORO	28
MATERIALI E METODI	30
Sezione I. Sviluppo di linee di pomodoro ad alto contenuto di polifenoli e valutazione delle proprietà salutistiche dei nuovi frutti	30
1.1. Piante e condizioni di crescita	30
1.2. Incroci	30
1.3. Isolamento dei semi	30
1.4. Selezione delle piante	31

1.4.1. Selezione fenotipica	31
1.4.2. Estrazione del DNA genomico	31
1.4.3. Genotipizzazione mediante PCR	31
1.5. Estrazione dei polifenoli dai frutti di pomodoro	32
1.6. Analisi LC/MS e quantificazione dei composti polifenolici	32
1.7. Estrazione dei carotenoidi da frutti di pomodoro e analisi HPLC	32
1.8. Saggio TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)	33
1.9. Saggio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	33
1.10. Saggio Folin-Ciocalteu	33
1.11. Standard etici per l'utilizzo di animali	34
1.12. Organizzazione dei gruppi comparativi con differenti diete e trattamento con DSS...	34
1.13. 454 pyrosequencing per l'analisi del microbiota intestinale	35
1.14. Estrazione dell'RNA da colon	36
1.15. Sintesi del cDNA	37
1.16. Real time q-PCR	37
1.17. Valutazione dell'attività infiammatoria	37
1.18. Analisi istologica	38
1.19. Isolamento delle popolazioni linfocitarie e <i>stainings</i> intracellulari per l'analisi citofluorimetrica	38
1.20. Analisi statistica	39
Sezione II. Gene editing mediato dal sistema CRISPR/Cas9 sul gene <i>SIMYB12</i>	40
2.1. Metodiche molecolari per il clonaggio	40
2.1.1. Vettori di clonaggio e cellule competenti	40
2.1.2. Isolamento del DNA plasmidico da <i>E.coli</i>	40
2.1.3. Disegno dei primers	40
2.1.4. Sequenziamento	41
2.2. Disegno della guida sgRNA	41
2.3. Sviluppo del costrutto pSIMYB12_pE8_SIMYB12 mediante Golden Gate	41
2.3.1. Il Golden Gate	41
2.3.2. PCR da DNA genomico di pomodoro per le sequenze di <i>pSIMYB12</i> e <i>SIMYB12</i>	43
2.3.3. PCR per il promotore E8	44
2.3.4. Assemblaggio dell'inserto pSIMYB12_pE8_SIMYB12 nel vettore pICSL86900 di Livello1	44
2.3.5. Assemblaggio della guida nel vettore accettore pICH47751 di Livello 1	45
2.3.6. Assemblaggio NPTII_Cas9_sgRNA_LIR nel vettore accettore pAGM8031 di Livello 2	46
2.3.7. Assemblaggio RepLIR nel vettore accettore pAGM8081 di Livello 2	46
2.3.8. Assemblaggio finale dei costrutti nel vettore accettore di Livello P	47
2.4. Trasformazione mediata da <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	48
2.5. Selezione su colture di radici aeree	49
2.5.1. Selezione per la verifica della presenza di Cas9	49
2.5.2. Selezione per la verifica dell'inserzione di pE8 tra <i>pSIMYB12</i> e <i>SIMYB12</i>	49

RISULTATI	51
Sezione I	51
1.1. Sviluppo di nuove linee di pomodoro ad alto contenuto di polifenoli	51
1.2. Confronto del profilo metabolico dei frutti di pomodoro delle linee Indigo, HighResv e Bronze	53
1.3. Profilo antiossidante dei nuovi frutti arricchiti con polifenoli	53
1.4. Effetti delle diete arricchite in polifenoli sul tratto gastrointestinale e sul microbiota del modello C57Bl/6 in assenza di infiammazione	56
1.5. Effetti delle diete arricchite in polifenoli sull'infiammazione cronica intestinale indotta da DSS	65
Sezione II	68
2.1. Sviluppo del costrutto plasmidico per il sistema CRISPR/Cas9	68
2.2. Saggio di trasformazione transiente e selezione delle radici aeree.....	68
DISCUSSIONE	71
CONCLUSIONI	76
BIBLIOGRAFIA	78
APPENDICE	89
PUBBLICAZIONI	93

ABSTRACT

Polyphenols are plant secondary metabolites that include several classes of compounds, like flavonoids, anthocyanins, stilbenes, and have shown antioxidant and anti-inflammatory properties. In recent years, the interest for the increase of polyphenol content in plant-derived foods by using metabolic engineering strategies is growing. Tomato is a good candidate for such improvement, since it accumulates low levels of polyphenols only in the skin.

The aim of this work has been the development of new polyphenol-enriched tomato lines by metabolic engineering on the flavonoid biosynthetic pathway and their biological assessment on an intestinal inflammation (IBD) mouse model. Among the several tomato-enriched diets tested, only the 'Bronze' diet, characterized by the presence of flavonols, anthocyanins and stilbenes, was effective in the reduction of the inflammatory symptoms of IBD.

Moreover, it was evaluated the potential use of the CRISPR-Cas9 system of gene editing to insert the fruit-specific E8 promoter upstream the endogenous tomato sequence of *MYB12*, regulatory gene of the flavonoid pathway, alternatively to *MYB12* from *Arabidopsis* that was employed in the previously tested tomato lines.

This work indicates that this multidisciplinary approach provides a great opportunity to assess the health-promoting effects of polyphenols in the whole-food context thus revealing their synergistic actions in providing prevention against IBD.

RIASSUNTO

I polifenoli sono metaboliti secondari delle piante che includono diverse classi di composti, come flavonoidi, antociani e stilbeni, e ad essi sono state attribuite importanti proprietà antiossidanti e antinfiammatorie. Sempre più rilevante è l'interesse per il miglioramento del contenuto di polifenoli in varie specie vegetali, come in pomodoro, mediante strategie di ingegneria metabolica, modificando la via biosintetica dei flavonoidi.

Obiettivo del presente lavoro è stato sviluppare nuove linee di pomodoro migliorate per il contenuto di polifenoli e valutarne gli effetti biologici su un modello murino di infiammazione intestinale (IBD). Tra le diverse diete testate a base dei frutti ottenuti, solo la dieta 'Bronze', caratterizzata da flavonoli, antociani e stilbeni, è risultata la più efficace nella riduzione dei sintomi dell'infiammazione.

Un ulteriore obiettivo è stato valutare il possibile utilizzo del sistema CRISPR-Cas9 di *gene editing* per inserire il promotore frutto-specifico E8 a monte della sequenza endogena di *Solanum Lycopersicum* del gene *MYB12*, regolatore della via biosintetica dei flavonoidi, in alternativa a quella di *Arabidopsis* presente nelle linee di pomodoro precedentemente testate.

L'approccio multidisciplinare impiegato in questo studio crea l'opportunità di studiare le proprietà salutistiche dei polifenoli nel contesto di un'unica matrice alimentare e le attività sinergistiche di questi composti per la prevenzione da IBD.

INTRODUZIONE

Capitolo 1.

1.1. Metabolismo secondario delle piante

Nell'ampia varietà di molecole organiche sintetizzate dalle piante, è possibile distinguere metaboliti primari o “essenziali” e metaboliti secondari.

I metaboliti primari sono molecole organiche strutturali (zuccheri, acidi grassi, amminoacidi), componenti di vie metaboliche per la produzione di energia di base, come la glicolisi o la respirazione cellulare, oppure molecole di “informazione”, come gli acidi nucleici. I metaboliti primari sono dunque coinvolti nei processi vitali e di sopravvivenza, di crescita e sviluppo della pianta, ma sono anche fondamentali precursori per la sintesi di metaboliti secondari.

I metaboliti secondari sono composti associabili alla specificità delle funzioni e all'espressione dell'individualità della specie. Ai metaboliti secondari è stato inizialmente attribuito un ruolo “non-essenziale”, ma ad oggi è ormai ampiamente riconosciuta la loro utilità in vie metaboliche cruciali ed in meccanismi importanti, come di difesa contro stress biotici ed abiotici, di comunicazione come molecole “segnale” e negli eventi complessi della riproduzione, legati quindi all'evoluzione e al mantenimento della specie.

I metaboliti secondari possono essere in generale distinti in tre gruppi maggioritari: alcaloidi, terpeni e polifenoli (Kabera *et al.*, 2014)

Gli alcaloidi sono caratterizzati nella loro struttura dalla presenza di gruppi azotati e sono generalmente molecole tossiche e di difesa della pianta, mentre i terpeni, costituiti da unità isopreniche, conferiscono spesso la tipica aromaticità, il profumo e la fragranza a foglie e fiori.

I polifenoli sono composti ampiamente distribuiti in tutto il regno vegetale e nel corso degli anni hanno ricevuto maggiore interesse per le proprietà salutistiche ad essi associate.

1.2. I polifenoli

I polifenoli mostrano un'ampia variabilità strutturale, sia tra le diverse famiglie del regno vegetale sia all'interno della stessa famiglia. Questo suggerisce che essi non abbiano una sola funzione: le diverse attività biologiche sono, infatti, influenzate dalla quantità e dalla natura dei gruppi sostituenti legati allo scheletro carbonioso di base, composto da anelli aromatici variamente idrossilati o sostituiti. La presenza di gruppi ossidrilici, per esempio, conferisce ai polifenoli la proprietà di partecipare a reazioni di ossidazione, importanti in diverse funzioni fisiologiche della pianta, di detossificazione o accumulo nel vacuolo. Alcuni polifenoli pigmentati, come le antocianine, sono coinvolti nell'attrazione degli impollinatori (Zhang *et al.*, 2014), mentre altri composti fenolici, come gli acidi idrossicinnamici, sono precursori della sintesi della lignina e dunque coinvolti nel processo di crescita cellulare. Gli acidi fenolici sono coinvolti direttamente nella difesa a diversi tipi di stress poichè contribuiscono alla lignificazione di aree danneggiate e hanno proprietà antimicrobiche (Pandey *et al.* 2009). Altri polifenoli hanno un effetto protettivo contro le radiazioni ultraviolette (Chong *et al.*, 2009).

Essendo composti molto diffusi nel regno vegetale, i polifenoli sono presenti in molte piante eduli comunemente consumate nella dieta, conferendo il colore, l'aroma e un sapore generalmente amaro o aspro a cibi e bevande di origine vegetale.

A seconda del numero di anelli aromatici e degli elementi strutturali che legano questi anelli, si possono distinguere diverse classi di polifenoli: 1) acidi fenolici, con sottoclassi derivate dagli acidi idrossibenzoici e dagli acidi idrossicinnamici; 2) flavonoidi, che includono flavonoli, flavanoni, flavoni, isoflavoni, flavanoli e antocianidine; 3) lignani e lignine polimeriche; 4) stilbeni (Li *et al.*, 2014).

1.2.1. Acidi fenolici

Gli acidi fenolici sono normalmente raggruppati in due sottoclassi, a seconda che derivino dall'acido benzoico o dall'acido cinnamico (Figura 1). Gli acidi idrossibenzoici sono componenti di strutture complesse, come i tannini idrolizzabili (gallotannini nel mango o ellagitannini in frutti rossi come fragole, lamponi e more). Il contenuto di acido idrossibenzoico nelle piante edibili è generalmente molto basso, con l'eccezione di alcuni frutti rossi, del ravanella e delle cipolle rosse, che possono avere concentrazioni di diverse decine di milligrammi per kilogrammo di peso fresco. Il tè, ad esempio, è un'importante fonte di acido gallico (principale rappresentante degli acidi idrossibenzoici), con concentrazioni nelle foglie fino a 4,5 g/kg di peso fresco.

Gli acidi idrossicinnamici sono molto più comuni degli acidi idrossibenzoici, e consistono principalmente in acido *p*-cumarico, caffeico, ferulico e sinapico. Questi acidi possono essere trovati sia in forma libera sia in forme legate, come derivativi glicosilati o esteri degli acidi quinico, shikimico e tartarico. Ad esempio, l'acido caffeico e quinico si combinano per formare gli acidi caffeoil quinici (CQAs), di cui il rappresentante principale è l'acido clorogenico (CGA). L'acido clorogenico è abbondante nelle Solanacee, come patata, melanzana e pomodoro (Luo *et al.*, 2008), in molti tipi di frutta e nel caffè. Infatti, una tazza di questa bevanda ne può contenere 70-350 mg (Manach *et al.*, 2004). Altri frutti, come mirtilli, kiwi, prugne, ciliegie e mele, contengono 0,5-2 g di acidi idrossicinnamici per kg di peso fresco (Manach *et al.*, 2004). L'acido caffeico, sia libero che esterificato, è generalmente l'acido fenolico più abbondante nei frutti rappresentando il 75-100% del totale degli acidi idrossicinnamici. L'acido ferulico invece è l'acido fenolico più abbondante nei cereali, che ne costituiscono la principale fonte alimentare. Il contenuto nella cariosside di grano è circa 0,8-2 g/kg di peso secco, e rappresenta fino al 90% del totale dei polifenoli del frumento, concentrati nell'aleurone e nel pericarpo del chicco. Le quantità nelle differenti farine di grano sono quindi direttamente dipendenti dai livelli di setacciatura. Gli acidi fenolici sono presenti anche nelle farine di riso e avena, che ne contengono approssimativamente la stessa quantità (63 mg/kg), e nella farina di mais, con un contenuto circa 3 volte superiore rispetto alle altre farine.

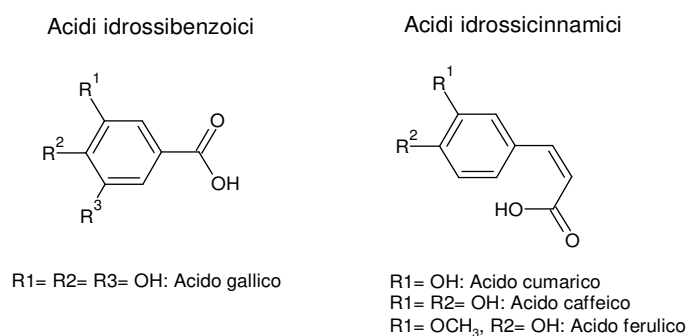


Figura 1. Struttura chimica dei principali acidi fenolici.

1.2.2. Flavonoidi

I flavonoidi costituiscono il gruppo di polifenoli più studiato. Essi presentano una struttura di base comune costituita da due anelli aromatici (anelli A e B) legati insieme da tre atomi di carbonio che formano un eterociclo ossigenato (Figura 2) (anello C) (Pandey *et al.*, 2009). Sono stati identificati più di 4000 flavonoidi, molti dei quali sono responsabili dei colori attrattivi dei fiori, frutti e foglie. In base alle variazioni sui singoli eterocicli strutturali, i flavonoidi possono essere distinti in: flavonoli, flavoni, isoflavoni, flavanoni, flavanoli e antocianine.

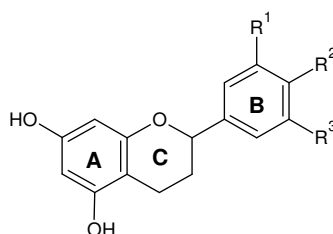


Figura 2. Struttura chimica flavonoide di base, costituita dagli anelli aromatici A e B, legati mediante l'eterociclo C.

I *flavonoli* sono i flavonoidi più comuni negli alimenti e tra questi, il kaempferolo, la quercetina e la miricetina sono tra i più diffusi. Le principali fonti alimentari sono cipolle, cavolo, lattuga, broccoli e mirtilli. Anche il vino rosso e il tè contengono fino a 45 mg di flavonoli totali per litro. Questi composti sono presenti in forme glicosilate; le unità di zuccheri associate sono spesso rappresentate da glucosio e ramnosio, anche se possono essere presenti altri zuccheri. Si accumulano nei tessuti più esterni e nelle parti aeree delle piante, poichè la loro biosintesi è stimolata dalla luce.

I *flavoni* sono molto meno comuni dei flavonoli in frutta e verdura e consistono principalmente nei glucosidi di luteolina e apigenina. Fonti di flavoni sono prezzemolo, sedano e cereali, come miglio e grano, che contengono glicosidi di flavoni.

I *flavanoni* sono presenti nei pomodori e in alcune piante aromatiche, come la menta, e sono presenti in alte concentrazioni negli agrumi. I principali agliconi sono naringenina nell'uva e in pomodoro, esperetina nelle arance e eriodictiolo nei limoni.

Gli *isoflavoni* sono flavonoidi con similarità strutturale agli estrogeni. Sebbene non siano steroidi, hanno dei gruppi ossidrilici in una configurazione analoga a quella degli idrossili nella molecola di estradiolo. Questo conferisce loro proprietà pseudo-ormonali, come la capacità di legarsi a recettori per gli estrogeni, tanto da essere classificati come fitoestrogeni (Martin *et al.*, 2013). Gli isoflavoni sono quasi esclusivamente rappresentati nelle leguminose, ma si ritrovano anche in liquirizia e semi di lino. La soia e i suoi derivati sono la principale fonte degli isoflavoni: genisteina, daidzeina e gliciteina, generalmente in rapporto 1:1:0.2.

I *flavanoli* esistono sia in forma monomerica (catechine) che in forma polimerica (proantocianidine). Le catechine sono presenti in molti tipi di frutta, ad esempio le albicocche ne contengono fino a 250 mg/kg di peso fresco. Sono presenti nel vino rosso, tè verde e cioccolato. Un'infusione di tè verde contiene fino a 200 mg di catechine. Le proantocianidine, note anche come tannini condensati, sono dimeri, oligomeri e polimeri di catechine. Mediante la formazione di complessi con le proteine salivari, i tannini condensati sono responsabili del carattere astringente del frutto (uva, pesche, kaki, mele, pere, ciliegie, ecc.), di bevande (vino, sidro, tè, birra, ecc.) e del gusto amaro del cioccolato. Questa astringenza cambia nel corso della maturazione e spesso scompare quando il frutto raggiunge lo stadio maturo.

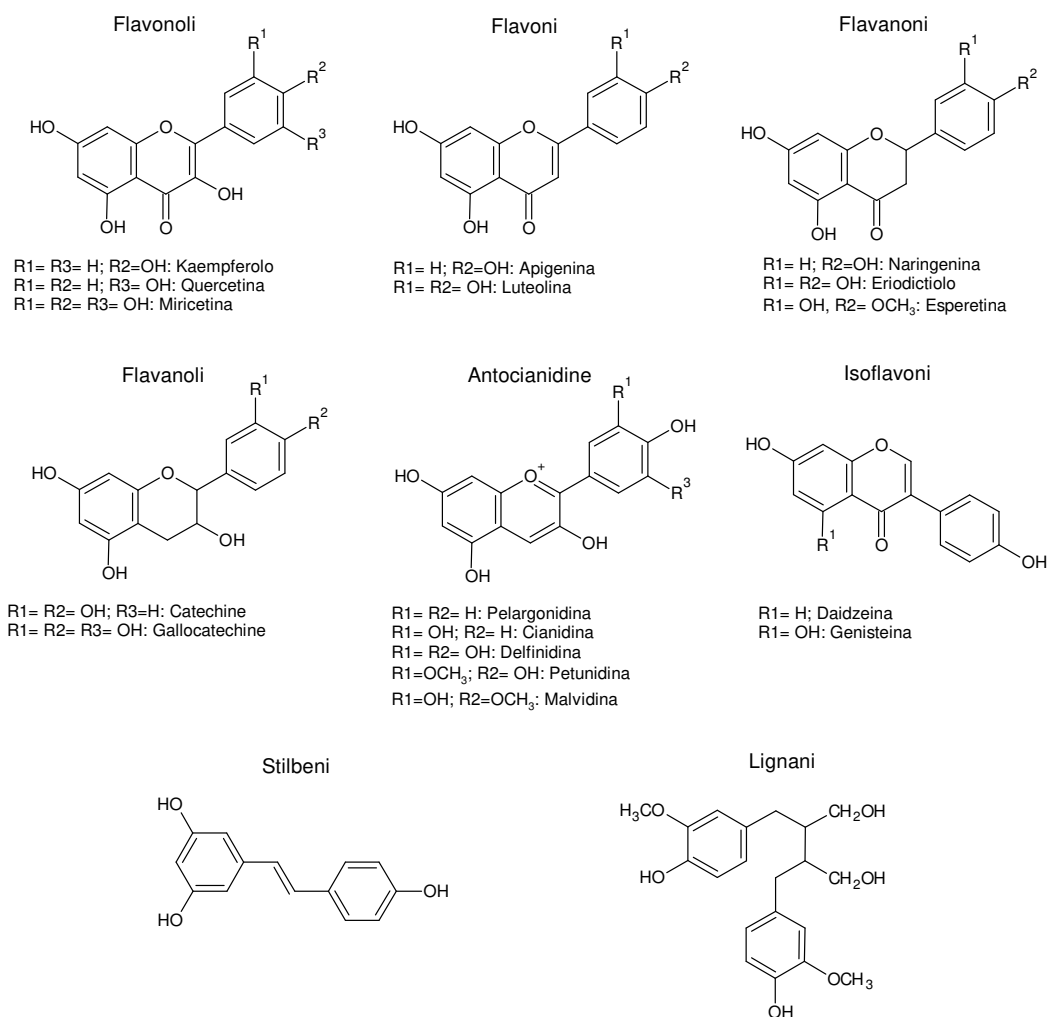


Figura 3. Strutture chimiche delle differenti classi di flavonoidi (flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli, isoflavoni e antocianidine), degli stilbeni e dei lignani.

Le *antocianine* sono pigmenti dei tessuti epidermici di fiori e frutti, a cui conferiscono colore rosa, rosso, blu o viola. Infatti, il termine antocianina deriva dal greco anthos- “fiore” e cyanos- “blu”. Le antocianine sono presenti anche in altri organi della pianta come fusto, foglie e radici, normalmente accumulate nei vacuoli cellulari, anche se in alcune specie sono localizzate in regioni specifiche del vacuolo, chiamate antocianoplasti (de Pascual Teresa *et al.*, 2008).

Questa classe di composti è altamente solubile in acqua e soluzioni alcoliche stabili a basso pH. In genere sono facilmente ossidabili perché sensibili a molti fattori che comprendono il pH, la temperatura e le radiazioni UV. Esistono in diverse forme chimiche, colorate e non colorate, in funzione del pH. Nella forma di aglicone (antocianidine) sono altamente instabili, perciò la possibile degradazione è prevenuta attraverso la glicosilazione o l'esterificazione. La glicosilazione può avvenire sia con zuccheri esosi, come glucosio e galattosio, sia con pentosi,

come ramnosio, arabinosio o xilosio, legati alle antocianidine come mono-, di- o tri-glucosidi. L'esterificazione avviene mediante il legame con unità acilanti, che sono in genere acidi fenolici, come acidi cinnamici, caffeico, ferulico e sinapico, e acidi organici, come acido acetico, malico, malonico, ossalico e succinico. Inoltre, le antocianine possono essere ulteriormente stabilizzate mediante la formazione di complessi con altri flavonoidi (co-pigmentazione).

Le più comuni antocianidine nelle piante superiori sono le delfinidine, cianidine, petunidine, pelargonidine, peonidine e malvidine (Figura 3). I glucosidi delle tre antocianidine non metilate (delfinidine, cianidine e pelargonidine) sono i più abbondanti in natura, rappresentando l'80% dei pigmenti delle foglie, il 69% nei frutti e il 50% nei fiori. L'antocianidina più diffusa nella maggioranza dei frutti è la cianidina-3-glucoside (de Pascual Teresa *et al.*, 2008), mentre nell'uva rossa e prodotti derivati (vino, succo, ecc.) i glucosidi della malvidina sono i più caratteristici. La delfinidina e i suoi derivativi metilati, le petunidine e malvidine sono la base per il colore blu e viola, mentre le cianidine e pelargonidine sono i principali pigmenti nei frutti colorati di rosso brillante.

Nella dieta, le antocianine sono presenti nel vino rosso, in alcune varietà di cereali, in verdura e ortaggi (melanzane, cavolo viola, fagioli, cipolle, ravanelli), ma sono più abbondanti nella frutta. Sono generalmente proporzionali all'intensità del colore e raggiungono fino a 2-4 g/kg di peso fresco nelle more e ribes nero (Manach *et al.*, 2004). Questi valori aumentano nei frutti maturi, tanto da essere considerati come veri e propri markers della maturazione. Le antocianine si accumulano prevalentemente nella buccia, tranne in alcuni tipi di frutta in cui sono presenti anche nella polpa (ciliegie e fragole). A tale riguardo, i frutti possono essere suddivisi in tre gruppi: quelli che accumulano antocianine sia nella buccia che nella polpa, quelli che hanno antocianine solo nella buccia e quelli che accumulano antocianine nella buccia come risposta allo stimolo della luce. Tuttavia alcuni frutti, per esempio mela (*Malus domestica*) e uva da vino (*Vitis vinifera*) appartengono a tutti e tre i tipi di categorie (Jaakola, 2014).

In generale, il background genetico della specie/varietà determina il tipo di antocianina che si troverà nel frutto, ma il fattore ambientale può influenzare la composizione qualitativa e quantitativa di diverse antocianine in modi differenti (Jaakola, 2014).

1.2.3. Lignani

I lignani sono formati da due unità di fenilpropano (Figura 3). Sono composti difenolici che contengono una struttura di 2,3-dibenzilbutano che è formata per dimerizzazione di due residui di acidi idrossicinnamici (Pandey *et al.*, 2009). Costituiscono i monomeri di lignina, che rinforza

le pareti delle cellule vegetali, fungendo da matrice per le microfibre di cellulosa. La più ricca fonte alimentare di lignani sono i semi di lino, che contengono prevalentemente secoisolariciresinolo. Altri cereali, frutti e verdura contengono tracce di lignani.

1.2.4. Stilbeni

Gli stilbeni contengono due residui fenilici connessi mediante un ponte metilenico a due atomi di carbonio (Figura 3). Il principale rappresentante di questa classe di composti è il resveratrolo (3,5,4'-triidrossi-*trans*-stilbene) che costituisce l'unità di base da cui derivano altri stilbeni, come il *cis*- e *trans*-piceide, forma glicosilata del resveratrolo tipica dei tessuti dell'uva, le viniferine, piceatannolo e pterostilbene, quest'ultimo etere metilato del resveratrolo, isolato nel legno di sandalo rosso (*Pterocarpus santalinus*; Seshadri, 1972) e in bacche del genere *Vaccinium*, e che presenta alcune proprietà farmacologiche particolarmente promettenti (Schmidlin *et al.*, 2008). Nei tessuti della pianta, la produzione di resveratrolo è sia costitutiva che inducibile ed è controllata dall'enzima chiave stilbene sintasi (STS). Diverse specie di piante, come *Polygonum cuspidatum* e *Pinus* spp., ne accumulano costitutivamente grandi quantità. La maggioranza degli studi ha mostrato che gli stilbeni sono presenti a bassi livelli in condizioni normali e si accumulano in risposta ad un ampio spettro di stress biotici ed abiotici, in conseguenza di un'aumentata trascrizione dei loro geni biosintetici (Vannozzi *et al.*, 2012), confermando così l'attività di fitoalessine. Gli stress abiotici includono danno meccanico, irradiazione con luce UV-C, trattamenti chimici e ormonali, come etilene e acido jasmonico. In termini di stress biotici, la biosintesi degli stilbeni è particolarmente documentata in vite, dove questi composti si accumulano a seguito di infezioni con diversi patogeni, come oidio (*Erysiphe necator*), peronospora (*Plasmopora viticola*), muffa grigia (*Botrytis cinerea*) e *Aspergillus carbonarius*. Oltre alle Vitaceae, gli stilbeni sono stati trovati in almeno 72 specie di piante distribuite tra 31 generi e 12 famiglie, comprese le Fagaceae, Liliaceae, Moraceae, Myrtaceae, Papilionaceae e Pinaceae (Vannozzi *et al.*, 2012). Considerando i prodotti di origine vegetale per il consumo umano, la presenza di resveratrolo è comunque ristretta a sole poche specie tra cui pinoli, arachidi, uva, mirtilli e more. I livelli più abbondanti si ritrovano nelle radici del Poligono del Giappone (*Polygonum cuspidatum*), usato per centinaia di anni nella medicina tradizionale dell'Asia nel trattamento dell'infiammazione (Giovinazzo *et al.*, 2012). L'uva è probabilmente la fonte più importante di resveratrolo, poiché questo composto è presente anche nel vino rosso, dove in genere sono presenti quantità relativamente basse (0,3-7 mg/L in forma aglicone, e approssimativamente 15 mg/L in forma glicosilata).

1.3. Via biosintetica dei flavonoidi

I flavonoidi sono sintetizzati attraverso l'azione concertata e sequenziale di diversi geni strutturali, codificanti enzimi che catalizzano le reazioni nella via biosintetica dei flavonoidi. La via è ben conosciuta e conservata. In Figura 4 sono schematizzate le principali reazioni.

La via biosintetica dei flavonoidi origina dall'amminoacido fenilalanina, che viene convertito mediante l'enzima fenilalanina-ammonio liasi (PAL) in 4-coumaroil-CoA. Questo composto è di cruciale importanza, poiché da esso derivano i calconi e di seguito tutti i flavonoidi del secondo tratto della via biosintetica. La molecola di 4-coumaroil-CoA è sintetizzata attraverso tre conversioni enzimatiche, collettivamente note come metabolismo generale dei fenilpropanoidi, catalizzate dalla fenilalanina ammonio-liasi (PAL), cinnamato 4-idrossilasi (C4H) e 4-cumarato-CoA ligasi (4CL). Nelle Solanacee e nel caffè, dal 4-coumaroil-CoA derivano anche gli acidi caffeoil quinici, di cui il principale rappresentante è l'acido clorogenico.

Il primo importante passaggio nella biosintesi dei flavonoidi è la formazione della naringenina calcone, catalizzata dalla calcone-sintasi (CHS), che condensa una molecola di 4-coumaroil CoA e 3 molecole di malonil-CoA. La naringenina calcone è richiesta per la sintesi di flavoni, flavonoli e antocianine, ma non degli stilbeni. Gli stilbeni, infatti, sono formati da 4-coumaroil CoA e malonil-CoA per mezzo dell'azione della stilbene sintasi, enzima strutturalmente correlato alla CHS.

La naringenina calcone è rapidamente isomerizzata nel flavanone naringenina, mediante l'enzima calcone isomerasi (CHI), sebbene questa isomerizzazione possa anche avvenire spontaneamente. La naringenina è un punto principale del ramo nella biosintesi dei flavonoidi: l'isoflavone sintasi (IFS) dirige la biosintesi verso la produzione degli isoflavonoidi, e la flavanone 3-idrossilasi (F3H), una diossigenasi 2-ossiglutarato-dipendente (OGD), idrossila la naringenina in posizione 3 producendo un diidroflavonolo, il diidrokaempferolo (DHK).

Usando il diidrokaempferolo come substrato, due enzimi citocromo p450, la flavonoide-3'-idrossilasi (F3'H) e la flavonoide-3'5'-idrossilasi (F3'5'H), catalizzano l'idrossilazione del DHK a formare diidroquercetina (DHQ) e diidromiricetina (DHM), rispettivamente. F3'H e F3'5'H sono enzimi chiave nel determinare la struttura delle antocianine e quindi il loro colore. Essi modificano il pattern di idrossilazione dell'anello B e svolgono un ruolo chiave nella formazione della cianidina e delphinidina, rispettivamente.

I diidroflavonoli DHK, DHQ e DHM fungono da precursori per la formazione dei 3 flavonoli kaempferolo, quercetina e miricetina, attraverso l'azione della flavonolo sintasi (FLS). La FLS non è richiesta per la produzione dei pigmenti antocianici, ma compete con F3'5'H, F3'H e DFR

per i comuni substrati diidroflavonoli e può influenzare la sintesi delle antocianine. Più a valle, la diidroflavonolo 4-reduttasi (DFR) riduce il kaempferolo, la quercetina e la miricetina alle loro corrispondenti leucoantocianidine. Queste sono substrati per l'antocianidina sintasi (ANS), un altro membro della famiglia OGD (diossigenasi 2-ossoglutarato-dipendenti), che catalizza la sintesi delle corrispondenti antocianidine colorate, pelargonidina, cianidina e delfinidina.

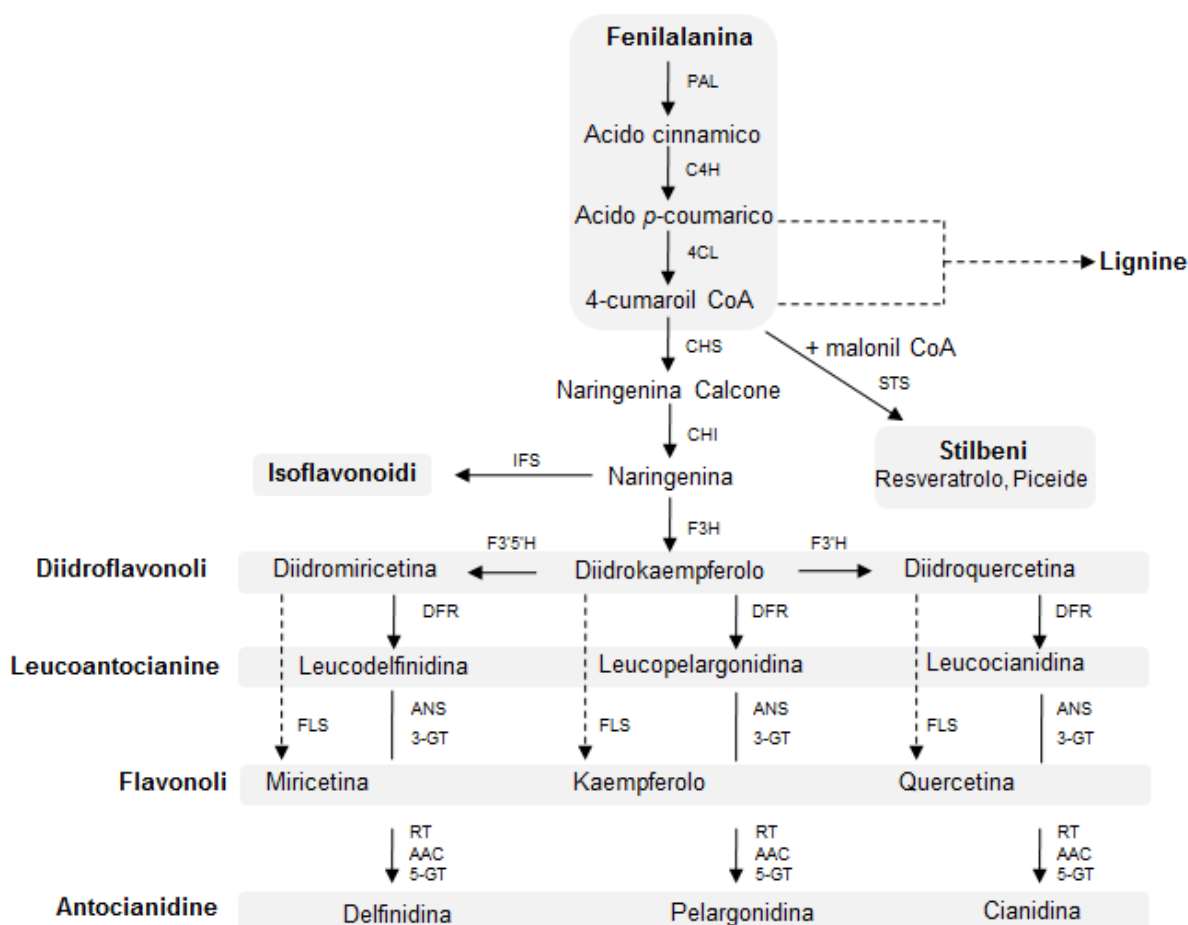


Figura 4. Rappresentazione schematica della via biosintetica dei flavonoidi. PAL, fenilalanina ammonia liasi; 4CL, 4-cumaroil-CoA ligasi; C4H, cinnamato 4-idrossilasi; CHS, calcone sintasi; CHI, calcone isomerasi; IFS, isoflavone sintasi; STS, stilbene sintasi; F3H, flavanone-3-idrossilasi; F3'H, flavonide-3'-idrossilasi; F3'5'H, flavonoide-3'5'-idrossilasi; FLS, flavonolo sintasi; DFR, diidroflavonolo reduttasi; ANS, antocianidina sintasi; 3-GT, flavonoide 3-O-glucosil-transferasi; RT, flavonoide 3-O-glucoside-ramnosil-transferasi; AAC, antocianina acil-transferasi; 5-GT, flavonoide 5-glucosil-transferasi.

1.4. Regolazione della via biosintetica dei flavonoidi

La complessità della via biosintetica necessita di una regolazione spaziale e temporale su diversi livelli, che avviene mediante fattori di trascrizione.

In generale, i fattori di trascrizione sono proteine che si legano a motivi regolatori del DNA all'interno dei *loci* target, modificando il livello di trascrizione e dunque l'espressione dei geni (Martin, 1996). Le famiglie di fattori di trascrizione principalmente coinvolte nella regolazione del metabolismo dei fenilpropanoidi e trovate in differenti specie, sono del tipo MYB, bHLH e WD40.

La famiglia dei fattori di trascrizione MYB è costituita da proteine caratterizzate da due regioni distinte: il comune dominio funzionale MYB, all'N-terminale, altamente conservato tra animali, piante e lieviti, che lega il DNA e coinvolto nella dimerizzazione della proteina, e una regione modulatrice al C-terminale, responsabile dell'attività regolatoria della proteina sull'espressione del gene target (attivazione o repressione). Il dominio MYB generalmente consiste di 4 o più sequenze amminoacidiche imperfette ripetute (R), ognuna delle quali forma 3 alfa eliche. La seconda e la terza elica di ciascuna ripetizione formano una struttura "helix-turn-helix" (HTH), che si intercala nel solco maggiore del DNA e presenta un "core" idrofobico coinvolto nella stabilità del legame al DNA (Ogata 1996). Il legame delle proteine MYB si stabilisce su cis-elementi del DNA, chiamati siti leganti MYB (MBSs).

Nella famiglia MYB, si distinguono le classi: R1 (proteine MYB ad una ripetizione, 1R-MYB), R2R3- (proteine con due ripetizioni, 2R- MYB), R1R2R3- (proteine MYB con tre ripetizioni, 3R-MYB), R1/R2-like (proteine MYB con quattro ripetizioni, 4R-MYB) (Du *et al.*, 2009; Dubos *et al.*, 2010; Stracke *et al.*, 2001) (Figura 5).

Le proteine bHLH, conosciute anche come proteine MYC, sono strutturalmente formate da una regione basica, una prima elica, un'ansa ed una seconda elica. La regione basica è essenziale per il legame al DNA proprio grazie ai suoi residui basici, tanto che proteine bHLH che mancano di questa regione, e che in *Arabidopsis* rappresentano circa il 20% dei fattori di trascrizione bHLH, possono agire come repressori, formando eteromeri incapaci di legare il DNA. Inoltre, a seconda del promotore target, le proteine bHLH possono legare il DNA sia da sole sia come eterodimeri con MYB (Hichri *et al.*, 2011).

Le proteine WDR (WD repeat proteins) sono anche note con il nome di WD40 la cui funzione è facilitare le interazioni proteina-proteina, pur non avendo alcuna attività enzimatica intrinseca (di legame al DNA o di regolazione dell'espressione di un gene). È stato infatti ipotizzato che queste proteine potrebbero formare una piattaforma di attracco su cui interagiscono altri partners

proteici, come le proteine MYB e bHLH, dato che hanno la capacità di legare più proteine simultaneamente (Ramsay & Glover, 2005; Hichri *et al.*, 2011). Finora è stato identificato un piccolo numero di proteine WD40 coinvolte nella regolazione della via di biosintesi dei flavonoidi, che includono AN11 di petunia (Anthocyanin 11), TTG1 di *Arabidopsis*, ed altri (Figura 6). Le proteine WD40 sembrano essere altamente conservate tra le specie.

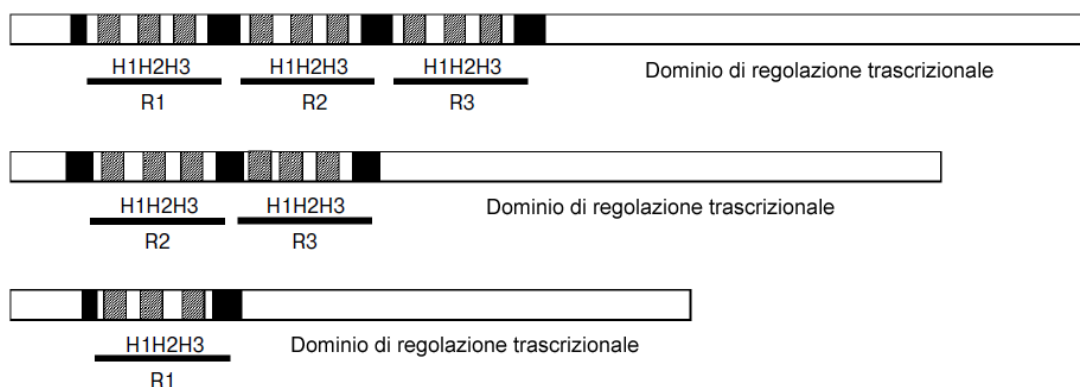


Figura 5. Rappresentazione schematica dei domini funzionali della proteina MYB. I box in grigio rappresentano i domini di legame al DNA conservati nelle proteine MYB (da Du *et al.*, 2009)

I fattori di trascrizione MYB, bHLH e WD40 possono agire di concerto formando un complesso proteico MYB-bHLH-WD40 (MBW), che regola l'espressione di molti geni target.

Un esempio dell'attività svolta da questo complesso ternario trascrizionale è proprio la regolazione della via biosintetica dei flavonoidi. I flavonoidi si accumulano diversamente in organi e tessuti, svolgendo funzioni biologiche differenti, e la loro distribuzione implica un'accurata regolazione spaziale e temporale della via biosintetica, con il reclutamento quindi dei fattori di trascrizione combinati in modo specifico.

La formazione del complesso MBW è stata chiaramente dimostrata in *Arabidopsis* e *Petunia* (Nesi *et al.*, 2001; Quattrocchio *et al.*, 1993). Il complesso è altamente organizzato, e ciascuna subunità adempie ad una funzione specifica: il legame al DNA, l'attivazione dell'espressione di un gene target e la stabilizzazione del complesso dei fattori di trascrizione.

1.4.1. Regolazione della biosintesi di flavonoidi in *Arabidopsis*, mais, tabacco e pomodoro

In *Arabidopsis*, il fattore di trascrizione MYB12 è stato identificato come regolatore positivo della sintesi di flavonoli (Merthens *et al.*, 2005).

MYB12 è un fattore di trascrizione del tipo R2R3MYB che lega differenti MREs (elementi di riconoscimento di MYB) in vari geni della biosintesi dei flavonoidi. Inoltre agisce indipendentemente da un coattivatore bHLH e mostra somiglianze strutturali e funzionali con l'omologo ZmP in mais. Entrambi i fattori mostrano identico pattern di attivazione su promotori di diversi geni come CHS, CHI e FLS, che sono tutti geni richiesti per la biosintesi di flavonoli. Il gene di *Arabidopsis* *AtF3H* viene indotto da MYB12 ma non da ZmP, viceversa il gene *AtDFR* è attivato da ZmP ma non da MYB12, differenza che probabilmente riflette la divergenza funzionale delle sequenze promotrici di questi due geni tra mais e *Arabidopsis*. Il gene *AtF3'H* invece non risulta attivato né da MYB12 né da ZmP, suggerendo quindi che l'attività di MYB12 non porta alla sintesi di antocianine (Merthens *et al.*, 2005).

In *Arabidopsis*, MYB12 esercita principalmente effetti quantitativi sull'espressione dei geni target, agendo direttamente sui promotori dei geni e ponendosi quindi come fattore a valle di una catena di trasduzione del segnale che causa l'attivazione dei geni flavonolo-specifici. Per questa ragione, MYB12 rappresenta un attivatore flavonolo-specifico e si propone quindi come candidato per la manipolazione del contenuto di flavonoli nelle piante.

In tabacco e pomodoro, il gene *AtMYB12* espresso sotto il controllo dei promotori 35S e E8, rispettivamente, agisce come regolatore positivo della via biosintetica dei flavonoli (Luo *et al.*, 2008).

In particolare, in pomodoro l'espressione frutto-specifica di *AtMYB12* porta all'induzione di tutti i geni coinvolti nella produzione dei flavonoli (a partire dai geni *PAL*, *C4H* e *4CL* a monte della via biosintetica, Figura 4) e loro derivati, e geni coinvolti nella sintesi di acido clorogenico e suoi derivati (geni *HCT*, *C3H* e *HQT*). In tabacco, l'attività di MYB12 si manifesta solo sulla via dei flavonoli, come accade per *Arabidopsis*, dove manca il gene *HQT* richiesto per la sintesi degli acidi caffeoil quinici (CQA), suggerendo che la regolazione della biosintesi dei CQA per MYB12 è, invece, addizionale in pomodoro.

1.4.2. Regolazione della biosintesi di antocianine in *Arabidopsis*, *Petunia* e *Anthirrinum*

In *Arabidopsis*, molti fattori di trascrizione delle famiglie MYB, bHLH e WDR sono coinvolti nella biosintesi di proantocianidine, tra questi troviamo i fattori di trascrizione MYB Transparent testa 2 (TT2), Production of Anthocyanin Pigment1 e 2 (PAP1 e PAP2), i bHLH Transparent Testa 8 (TT8) e WDR Transparent Testa Glabra 1 (TTG1).

L'attività di TT2 in *Arabidopsis* è fortemente correlata a quella di TT8 (Nesi *et al.*, 2001). Entrambi TT2 e TT8 sono richiesti per la sintesi dei flavonoidi e più in particolare sono coinvolti nella regolazione a valle della via biosintetica.

L'espressione di *PAP1* e *PAP2* in *Arabidopsis* porta ad una elevata espressione di *PAL* e *CHS* e *DFR*. L'ampia attivazione trascrizionale della via generale è accompagnata da un vasto numero di prodotti accumulati, come l'aumento di lignina, esteri degli acidi idrossicinnamici legati alla parete, flavonoli e antocianine (Borevitz *et al.*, 2000). Inoltre, *PAP1* e *PAP2* mostrano alta similarità di sequenza con *AN2*, *C1* e *PL*, suggerendo che possono essere gli ortologi di petunia e mais in *Arabidopsis*, con funzioni geneticamente definite nella regolazione della via dei fenilpropanoidi.

	<i>Arabidopsis</i> (At)		<i>Petunia</i> (Ph)		<i>Mais</i> (Zm)	<i>Antirrhinum</i> (Am)
	Proantocianidine	Antocianine	Proantocianidine	Antocianine	Antocianine	Antocianine
WD40	TTG1		AN11		PAC	
HLH1		GL3/EGL3		JAF13	B/R	Delila/Mutabilis
HLH2	TT8		AN1			
R2R3-MYB	TT2	PAP1 or 2		AN2/AN4	C1/PL	Rosea1/Rosea2/Venosa

Figura 6. Geni regolatori che controllano la sintesi dei pigmenti in *Arabidopsis*, petunia, mais e *Antirrhinum* (adattata da Koes *et al.*, 2005).

In petunia, il controllo della pigmentazione da antocianine è ben caratterizzato nel fiore e coinvolge fattori MYB, bHLH e WDR. *AN1* codifica per un fattore bHLH che attiva la trascrizione di geni strutturali, come *DFR* (Spelt *et al.*, 2000), ed è divergente sia dal punto di vista evolutivo sia funzionale da *JAF13*, l'apparente ortologo in petunia di *Delila* in *Antirrhinum majus*. L'espressione di *AN1* è inoltre regolata da AN2 e AN4, proteine della famiglia MYB. AN2 è tuttavia espresso solo nel limbo del fiore (Quattrocchio *et al.*, 1999), mentre AN4 è espresso nelle antere. L'attività di questi fattori di trascrizione sembra essere regolata a livello post-trascrizionale da AN11, una proteina citosolica WDR. Il gene *AN11* è richiesto per la produzione di antociani ed è espresso in modo indipendente da *AN1* e *AN2* durante lo sviluppo della pianta. Oltre alla regolazione della pigmentazione AN1, AN2 e AN11 controllano il pH vacuolare nelle cellule dei petali e la morfologia dell'epidermide del tegumento esterno del seme (Quattrocchio, 1994; Spelt *et al.*, 2002).

Un'altra proteina con dominio MYB è codificata da PH4, che è espressa nell'epidermide dei petali e può interagire, come AN2, con AN1 e JAF13. AN1 è richiesto per la sintesi delle antocianine e per l'acidificazione vacuolare, suggerendo il suo importante ruolo nell'attivazione di differenti vie metaboliche attraverso interazioni con diverse proteine MYB.

Geni che regolano la sintesi delle antocianine e che codificano per fattori di trascrizione bHLH (Delila) e MYB (Rosea1, Rosea2 e Venosa) sono stati caratterizzati anche in *Anthirrinum majus* (Schwinn *et al.*, 2006). Questi geni sono coinvolti nel controllo della pigmentazione da antocianine nel fiore attraverso un meccanismo complesso. I tre geni MYB sono espressi nel tubo e nei lobi del fiore, ma hanno differenti pattern spaziali di espressione. Ad esempio, *Rosea 1* si esprime nel tubo e nei lobi, *Rosea 2* ha minore espressione e relativa solo ai lobi. Anche *Venosa* mostra un'espressione spaziale minoritaria e può solo esprimersi negli strati più interni dell'epidermide, coprendo le venature dei petali. *Delila* si esprime sia nel tubo sia nei lobi della corolla, al contrario di *Mutabilis*, un altro fattore del tipo bHLH che ha funzione solo nel lobo. Così, Rosea1, Rosea 2 e Venosa possono interagire con Delila nel tubo. Rosea1 e Venosa possono interagire sia con Delila che con Mutabilis nel lobo, mentre Rosea2 può interagire solo con Delila (Schwinn *et al.*, 2006).

Capitolo 2.

2.1. Ingegneria metabolica

Negli ultimi anni è aumentato l'interesse verso lo sviluppo di strategie atte ad incrementare i livelli e la composizione di polifenoli nelle piante, ed in generale di molecole bioattive, in prodotti di largo consumo alimentare, come frutta e verdura. Un primo approccio, attuato soprattutto per specie di interesse agronomico, consiste nell'utilizzo di incroci tradizionali e di linee di introgressione. Un altro tipo di approccio utilizzato si basa sull'ingegneria metabolica, che fornisce un valido strumento per ottenere nuovi prodotti arricchiti in specifiche classi di biocomposti.

L'ingegneria metabolica consiste nella modificazione del flusso metabolico agendo sulle reazioni enzimatiche per ridurre o aumentare la produttività di un metabolita di interesse. Mediante l'ingegneria metabolica, infatti, è possibile: i) migliorare la produzione di composti esistenti, ii) produrre nuovi composti o iii) ridurre la produzione di composti non desiderabili. In tal modo vengono re-direzionate le attività cellulari mediante modificazione degli enzimi, la localizzazione endocellulare e le funzioni regolatrici all'interno delle cellule (Giovinazzo *et al.*, 2013).

Il controllo del flusso metabolico è generalmente legato a più di un singolo passaggio enzimatico. Questo vuol dire che nell'ambito di una via metabolica possono esserci diversi passaggi limitanti la produzione di un metabolita, passaggi spesso sotto regolazione dipendente da condizioni ambientali, metaboliche e di sviluppo. Proprio questa distribuzione differenziata del controllo crea diverse opportunità di modificazione del flusso. Nel tempo sono stati fatti molti tentativi per identificare le principali reazioni limitanti o i geni chiave di molte vie metaboliche per cercare di amplificarne o ridurne la loro espressione. Tuttavia queste azioni hanno spesso prodotto risultati nei migliori dei casi, modesti. Questo problema può essere risolto attraverso l'espressione ectopica di geni codificanti per fattori di trascrizione, agendo così sull'espressione di tutti i loro geni target. Inoltre, la modulazione del flusso può essere ottenuta senza l'identificazione, isolamento e caratterizzazione molecolare di tutti i geni implicati nella biosintesi e può essere particolarmente vantaggioso nel caso di vie biosintetiche secondarie, le cui attività enzimatiche non sono completamente caratterizzate (Martin, 1996).

2.1.1. Modificazione della via biosintetica dei flavonoidi in pomodoro mediante geni strutturali e regolatori

Il campo di applicazione dell'ingegneria metabolica è piuttosto vasto, dal momento che può essere impiegata per differenti scopi, che vanno dallo studio funzionale di base delle vie metaboliche, al miglioramento genetico e nutrizionale in specie da raccolto. Un esempio di miglioramento del valore nutrizionale, attuato mediante l'ingegneria metabolica, è dato dalle modificazioni della via biosintetica dei flavonoidi in pomodoro. Il pomodoro è considerato uno dei principali candidati per il miglioramento del contenuto di polifenoli, essendo un prodotto alimentare ampiamente diffuso a livello mondiale (Butelli *et al.*, 2008). I polifenoli nella bacca di pomodoro sono poco rappresentati, in quanto le maggiori quantità sono riscontrabili nella buccia (Slimestad *et al.*, 2008). Le quantità prodotte normalmente sono state considerate “sub-ottimali” (Butelli *et al.*, 2008), considerando che la buccia è una delle componenti minoritarie dell'intera bacca (circa l'1%).

Uno degli approcci dell'ingegneria metabolica più utilizzato riguarda la sovra-espressione di uno o più geni strutturali implicati nelle vie biosintetiche (Schijlen *et al.*, 2004). Per esempio, l'aumento dei livelli di flavonoli nel pomodoro è stato raggiunto potenziando il gene calcione isomerasi (CHI) di *Petunia* (Muir *et al.*, 2001), oppure per sovra-espressione del gene codificante per l'enzima idrossicinnamoil-CoA chinato transferasi (HQT), che ha portato alla sintesi di livelli più elevati di acido clorogenico (CGA) (Niggeweg *et al.*, 2004).

Un approccio differente consiste nell'introduzione di geni coinvolti in altre ramificazioni della via metabolica, come l'utilizzo di geni coinvolti nella sintesi di stilbeni in piante transgeniche di pomodoro. In particolare, l'enzima stilbene sintasi (STS), che catalizza la sintesi degli stilbeni, tra cui il resveratrolo, solo in alcune specie di piante, come la vite, è stato utilizzato per la trasformazione costitutiva di piante di pomodoro (Giovinazzo *et al.*, 2005, Schijlen *et al.*, 2006) portando così all'accumulo di nuovi composti, nelle nuove linee.

Infine, l'utilizzo di fattori di trascrizione (TF) che regolano l'espressione di geni del metabolismo dei flavonoidi, è un'altra strategia utilizzata per incrementare i livelli di metaboliti (Ranish & Hahn, 1996). Tra i primi tentativi c'è stato l'impiego di *LC* e *CI*, due geni regolatori della biosintesi di antocianine in mais, la cui sovra-espressione in pomodoro ha portato all'aumento di livelli di flavonoli, ma inaspettatamente non di antocianine (Bovy *et al.*, 2002), a conferma che esiste una differente specificità per i geni target nelle differenti specie. Maggiore successo si è ottenuto con la sovra-espressione del gene *MYB12* di *A. thaliana* in pomodoro, utilizzata per

la produzione di elevati livelli di flavonoli e acidi idrossicinnamici (Luo *et al.*, 2008). Un altro esempio è dato dai fattori di trascrizione *Delila* (Del) e *Roseal* (Ros1) da *Antirrhinum majus*, che sono stati impiegati per ottenere linee transgeniche di pomodoro in cui è attivata la sintesi di antocianine (Butelli *et al.*, 2008).

La sovra-espressione di geni strutturali o di fattori regolatori consente, dunque, di ottenere linee ingegnerizzate con nuove vie metaboliche o di modificare quelle già esistenti, consentendo un miglioramento della resistenza agli stress biotici e/o del valore nutrizionale dei frutti.

2.2. Le nuove tecnologie di genome editing

Il *genome editing* sta emergendo come un'alternativa ai metodi basati sugli incroci tradizionali oppure sulla transgenesi, con lo scopo di aumentare la produttività delle specie da raccolto e garantire una migliore produzione alimentare (Belhaj *et al.*, 2013). In particolare, le tecniche convenzionali di incrocio si basano sulla variazione genetica esistente in natura, e i programmi di incrocio estensivi necessitano di tempi lunghi per introdurre nuovi tratti genetici selezionati. Nuovi alleli possono essere introdotti per mutagenesi in maniera casuale, e ciò deve essere seguito da analisi di popolazioni, che richiedono molto tempo, per l'identificazione di mutanti con le proprietà desiderate. Il *genome editing* può accelerare il processo di incrocio permettendo l'introduzione di modificazioni precise e prevedibili (Bortesi & Fisher, 2015).

Nel *genome editing* si fa uso di nucleasi sequenza-specifiche (*sequence specific nucleases*, SSNs), strumenti molecolari utilizzati per generare rotture su entrambi i filamenti del DNA (DSBs) in un punto di interesse del genoma. Le DSBs vengono sottoposte all'attività di meccanismi di riparo cellulari naturali, che possono intervenire in modi diversi. I due principali sistemi di riparazione possono intervenire per “*non-homologous end joining*” (NHEJ) e per omologia (*homology directed repair*, HDR). L'NHEJ utilizza la DNA ligasi IV per ricongiungere le estremità separate. Se le basi sono state delete o le estremità sono state processate dalle nucleasi (causando delezioni o inserzioni), la riparazione può essere imperfetta. L'HDR usa un “templato” per la riparazione, ovvero una sequenza sulla base della quale poter “copiare”. In una situazione naturale, il cromatidio fratello costituirebbe il “templato” per la riparazione (Belhaj *et al.* 2015). I due sistemi di riparazione sono antagonisti e in pianta la preferenza verso la via NHEJ fa sì che l'efficienza di riparo mediata dalla via HDR sia più bassa (Bortesi & Fisher, 2015, Schiml & Puchta, 2016).

Nelle cellule di mammifero è stato osservato che le DSBs stimolano la ricombinazione omologa nel sito di rottura. In pianta, invece, inserzioni in loci desiderati sono state osservate solo a basse

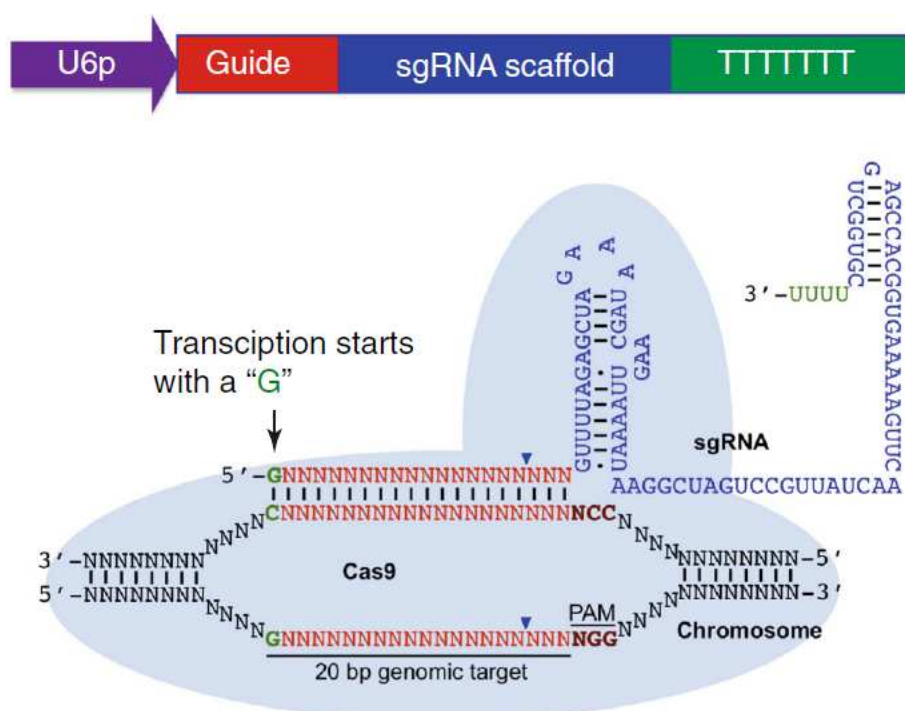
frequenze. Nonostante questo, l'inserzione genica mediata da HDR rimane una sfida in pianta. Finora molte delle modificazioni del genoma hanno utilizzato la via NHEJ per *knockout* genico (per esempio introducendo una mutazione o rimuovendo per delezione un frammento di grandi dimensioni) e solo pochi sono gli esempi di inserzione genica mediata da HDR. I *knockout* genici mediati da NHEJ, infatti, sono più semplici da sviluppare rispetto all'inserzione genica (Bortesi & Fisher, 2015).

Negli ultimi dieci anni, sono state usate in pianta diverse nucleasi sequenza-specifiche, come le nucleasi *zinc finger* (ZFNs) e *TAL effector* (TALENs) nucleasi, che permettono di mutagenizzare geni su loci specifici. ZFNs e TALENs sono enzimi artificiali bipartiti, che consistono di un dominio legante il DNA e un dominio per la nucleasi FokI al C-terminale. In entrambi i casi, il dominio di legame del DNA può essere ingegnerizzato per riconoscere una specifica sequenza di DNA. Tuttavia, il disegno e la costruzione di queste proteine modulari è piuttosto laborioso e costoso. Inoltre, la specificità per le ZFNs di riconoscimento e taglio della specifica sequenza di DNA non è al momento molto elevata (Belhaj *et al.*, 2015).

2.2.1. Il sistema CRISPR/Cas9

Un metodo alternativo è rappresentato da un'endonucleasi monomerica batterica, nota come Cas9 (CRISPR-associated protein 9), che può essere indirizzata su una specifica sequenza genomica da una sequenza guida ad RNA di 20 bp, facilmente ingegnerizzabile, che si lega al suo DNA target. Il riconoscimento del target è dipendente dal cosiddetto "*protospacer adjacent motif*" (sequenza PAM), per il quale la sequenza consenso, NGG, è adiacente all'estremità 3' del target di 20 bp. Nei genomi batterici, il gene che codifica per Cas9 è stato trovato in stretta associazione con sequenze brevi, altamente omologhe, arrangiate in ripetizioni dirette, alternate a sequenze spaziatrici non omologhe. Queste regioni, CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) hanno un ruolo nel sistema immunitario adattivo procariotico (Jinek *et al.*, 2012).

L'utilità del sistema CRISPR/Cas9 consiste nel fatto che solo un singolo RNA è richiesto per generare la specificità target, e quindi è possibile riprogrammare, a seconda dei casi, la specificità dell'endonucleasi CRISPR/Cas9. Il sistema CRISPR/Cas9 ha comunque il problema delle cosiddette attività off-target, mutazioni indotte dall'attività dell'endonucleasi in siti del genoma differenti da quelli desiderati. Una serie di soluzioni sono state suggerite per la riduzione dell'attività off-target. Ad esempio, l'abbassamento del livello di espressione della Cas9 (e/o sgRNA può ridurre questa attività), sebbene ciò possa determinare anche una ridotta efficacia



Arabidopsis (Li *et al.* 2013; Jiang *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2014; Fauser *et al.*, 2014), specie da raccolto come grano (Shan *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014), mais (Liang *et al.*, 2014), riso (Jiang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014) e pomodoro (Brook *et al.*, 2014; Ron *et al.*, 2014; Čermák *et al.*, 2015). Un'alta efficienza del sistema (oltre il 90%) è stata riportata sia in *Arabidopsis* che in riso (Miao *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2014). Se l'evento di mutagenesi avviene precocemente nella rigenerazione in pianta, prima che la cellula embrionale si divida, dà come risultato una pianta diploide che può essere: 1) eterozigote, se è stato mutagenizzato il *locus* su uno dei due cromatidi fratelli, 2) omozigote, se entrambi gli alleli sono stati mutagenizzati e le rotture sono state riparate con la stessa mutazione, o 3) biallelico, se entrambi gli alleli sono stati mutagenizzati ma il riparo è avvenuto in modo diverso sui due alleli. In molti casi, la mutazione potrebbe avvenire più tardi nello sviluppo e indipendentemente in diversi tessuti, dando luogo ad una pianta chimerica, che consiste di cellule con diversi genotipi, come *wild-type*, eterozigoti, omozigoti o biallelici. Mutazioni omozigoti o bialleliche indotte da CRISPR/Cas9 nella prima generazione di transgenici sono state riportate in *Arabidopsis* (Feng *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2013), riso (Zhang *et al.*, 2014) e pomodoro (Brook *et al.*, 2014). Se i mutanti omozigoti o biallelici non sono generati come trasformanti primari, essi possono essere ricercati nella generazione successiva conducendo un'analisi del fenotipo caratterizzato dalla perdita di funzione. Alcuni studi hanno infatti dimostrato l'ereditabilità mendeliana di mutazioni indotte da CRISPR/Cas9 in *Arabidopsis* (Jiang *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2014; Fauser *et al.*, 2014), riso (Jiang *et al.*, 2013) e pomodoro (Brook *et al.*, 2014).

La semplicità del sistema CRISPR/Cas9 fa sì che sia uno strumento molto interessante per il gene editing in specie vegetali. Finora, le applicazioni hanno riguardato prevalentemente *knockout* genici. Sono state riportate larghe delezioni cromosomali, generate con CRISPR/Cas9, che possono essere ottenute non solo con una singola guida, ma anche con guide sgRNA multiple, facilmente assemblabili in un singolo vettore di espressione usando il clonaggio Golden Gate (Belhaj *et al.*, 2015; Brook *et al.*, 2014). Pochi sono, invece, i casi in cui è stata ottenuta l'integrazione di sequenze sfruttando il sistema HDR. Interessante è, per esempio, il caso di inserzione di un'intera sequenza promotrice (promotore 35S) a monte del gene *ANT1*, coinvolto nella sintesi di antocianine, in pomodoro (Čermák *et al.*, 2015), mediata dal sistema HDR. Ad ogni modo, la ricombinazione omologa finalizzata all'inserimento di geni rimane un'importante sfida per le modificazioni geniche in pianta con il sistema CRISPR/Cas9, che si pone dunque come uno strumento biotecnologico utile e versatile per svariate applicazioni.

Capitolo 3.

3.1. Proprietà salutistiche dei polifenoli

L'abbondanza dei polifenoli, ed in particolare dei flavonoidi, nella dieta umana ed il riconoscimento delle proprietà antiossidanti ad essi attribuite, hanno portato negli ultimi anni all'aumento dell'interesse e degli studi su questi composti. Studi epidemiologici hanno suggerito associazioni tra il consumo di alimenti o bevande ricchi di polifenoli e la prevenzione di malattie legate allo stress ossidativo. Oltre alle proprietà antiossidanti, i polifenoli hanno mostrato anche proprietà molecolari di natura antinfiammatoria e di protezione contro la progressione tumorale e contro malattie croniche, come le patologie cardiovascolari o le malattie infiammatorie croniche intestinali.

3.1.1. Attività antiossidanti

I polifenoli sono tra i più abbondanti antiossidanti presenti nella dieta umana. Una prima ragione che spiega le attività antiossidanti dei polifenoli è legata alla struttura chimica, per la presenza dei gruppi fenolici, in particolare catecolici, idrochinonici o gallolici. I polifenoli sono agenti riducenti ed insieme ad altri, come vitamina C, E e carotenoidi, proteggono le cellule dallo stress ossidativo. Quest'ultimo è implicato nella patogenesi di molte malattie e i polifenoli possono agire su di esso in maniera sia diretta che indiretta (Scalbert & Williamson, 2000; Espley *et al.*, 2014).

In qualità di agenti riducenti, i polifenoli possono esercitare una diretta attività antiossidante su radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno (anione superossido, radicali idrossilici e perossili). Oltre allo “*scavenging*” sui radicali liberi, le attività antiossidanti dirette includono anche la riduzione della formazione di idroperossidi e l'inibizione dell'ossidazione lipidica (Li *et al.*, 2014). I polifenoli agiscono come antiossidanti mediante effetti diretti sul plasma, sulle membrane cellulari, su fattori di trascrizione e attività enzimatiche. La quercetina, ad esempio, induce diverse attività enzimatiche come la glutathione perossidasi, superossido dismutasi e catalasi o glutathione reduttasi (Han *et al.*, 2007).

Gli effetti antiossidanti indiretti consistono, invece, nella modulazione di vie di segnale cellulari endogene, come ad esempio le vie coinvolte nella risposta immunitaria, specialmente a livello intestinale (Romier *et al.*, 2009; Espley *et al.*, 2014; Cavalcanti *et al.*, 2014; Delvecchio *et al.*,

2015; De Santis *et al.*, 2015). Questa risposta coinvolge mediatori dell'infiammazione sia molecolari (citochine pro- e anti-infiammatorie) sia cellulari, che modulano il processo infiammatorio. Altre vie di segnale riguardano l'attività pro-ossidante, che può indurre l'apoptosi di cellule tumorali e prevenire lo sviluppo di tumori, attività per esempio osservata nel caso dell'acido gallico (Verma *et al.*, 2013; López de Felipe *et al.*, 2014), e l'interazione con recettori estrogenici, con conseguenti effetti nelle funzioni endocrine, come nel caso degli isoflavoni (Martin *et al.*, 2013).

3.1.2. Attività antinfiammatorie

L'infiammazione è considerata un fattore critico per l'insorgenza di molte patologie, come le malattie cardiovascolari e neurodegenerative, l'obesità, il diabete di tipo II (Li *et al.*, 2014). Sia studi *in vitro* che studi preclinici hanno mostrato gli effetti anti-infiammatori di flavonoidi e stilbeni (Larrosa *et al.*, 2009a; Sánchez-Fidalgo *et al.*, 2010, Montrose *et al.*, 2010), e di metaboliti derivati dai flavonoidi, prodotti dal microbiota intestinale (Larrosa *et al.*, 2009 b; Monagas *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015).

In generale, esistono diversi meccanismi anti-infiammatori dei polifenoli: alcuni coinvolgono direttamente l'attività di mediatori dell'infiammazione, mentre altri si esplicano a livello vascolare, in particolare con effetti sulla sintesi e sul rilascio di ossido nitrico.

Un primo meccanismo anti-infiammatorio riguarda la modulazione di mediatori dell'infiammazione, come gli enzimi fosfolipasi A2 e ciclo-ossigenasi. I polifenoli sono in grado di ridurre l'attività e l'espressione genica della ciclo-ossigenasi 2 (COX-2) in diverse linee cellulari animali (D'Introno *et al.*, 2009; Serra *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). Anche le citochine, i maggiori mediatori delle comunicazioni locali e intercellulari nei processi immunitari e infiammatori, sono modulate dai polifenoli. Infatti, è stato evidenziato che alcuni flavonoidi sono in grado di ridurre l'espressione di citochine IL1 β , IL8 e TNF α (Larrosa *et al.*, 2009 b; Cavalcanti *et al.*, 2014).

Oltre agli effetti sui mediatori dell'infiammazione, i polifenoli sono in grado di modulare, sia *in vitro* che *in vivo*, alcune vie di segnale coinvolte nelle risposte infiammatorie, ed in particolar modo quelle intestinali, come la via dell'NF κ B, implicata anche nelle risposte immunitarie, proliferative e apoptotiche (Karin *et al.*, 2000), e quella delle MAP chinasi (Mitogen-Activated protein kinase) (Soobrattee *et al.*, 2005; Romier *et al.*, 2009).

Un secondo importante meccanismo anti-infiammatorio riguarda la produzione di ossido nitrico a livello vascolare. L'ossido nitrico è un componente anti-trombotico essenziale nel

mantenimento della salute vascolare, anche se provoca una risposta infiammatoria se convertito in perossinitrito, in presenza di radicali liberi. Diversi studi suggeriscono che i polifenoli inibiscono il rilascio dell'NO sopprimendo l'espressione degli enzimi ossido nitrico sintetasi (NOS) e l'attività enzimatica NOS. I polifenoli agiscono anche sulle attività di rimodellamento vascolare e hanno un effetto inibitorio sugli enzimi che degradano la matrice extracellulare, in particolare le metallo-proteinasi 2 e 9 (Calabriso *et al.*, 2016 a e b).

Un altro meccanismo antinfiammatorio emergente sembrerebbe essere legato all'omeostasi e al metabolismo cellulare del ferro in cellule coinvolte nella risposta immunitaria adattativa intestinale, come le cellule dendritiche (DCs). Il bilancio tra il flusso intracellulare e il trasporto extracellulare del ferro (import/export) è associato all'attivazione delle cellule immunitarie intestinali, in particolare delle DCs. L'infiammazione favorisce l'ingresso del ferro in cellula, mentre uno stato fisiologico di tolleranza agli stimoli antigenici favorisce la degradazione e l'uscita del ferro, mediati da alcune attività enzimatiche come l'emeossigenasi 1 (Hmox-1) e la Ferroportina-1. E' stato osservato che la somministrazione del flavonolo quercetina su cellule dendritiche ed in modelli murini di infiammazione intestinale, induce fortemente l'up-regolazione dell'Hmox-1 e della Ferroportina-1, risultando in un rilascio del ferro nel compartimento extracellulare ed un ridotto contenuto di ferro citoplasmatico, portando dunque ad uno status di tipo anti-infiammatorio (Galleggiante *et al.*, 2017). Questo comportamento può quindi contribuire a spiegare ulteriormente le abilità anti-infiammatorie dei polifenoli.

3.2. Biodisponibilità e metabolismo

Un aspetto rilevante per comprendere gli effetti sulla salute dei polifenoli assunti con la dieta è la loro biodisponibilità. Questa è correlata alla complessità della loro struttura chimica, e più in generale, alla loro bio-accessibilità. Infatti, molte proprietà fisico-chimiche dei polifenoli e le modificazioni condotte su di essi dagli enzimi intestinali, possono influenzare notevolmente il rilascio e la solubilità di questi composti durante la digestione e l'assorbimento (Ozdal *et al.*, 2016). Un altro importante fattore che influenza la biodisponibilità è la composizione della matrice alimentare in cui i polifenoli sono presenti, dal momento che proteine, fibre, lipidi e altri fitochimici possono influenzare il loro assorbimento, ritardandolo o promuovendolo. Molti polifenoli della dieta sono presenti in forme glicosilate o acilate, ovvero in forme coniugate. Nell'intestino tenue, la maggioranza dei polifenoli è de-coniugata da enzimi intestinali, mediante reazioni di ossidazione o idrolisi, per rilasciare gli agliconi dalle forme glicosilate. Attraverso il circolo entero-epatico, gli agliconi rilasciati raggiungono il fegato, dove sono estensivamente

coniugati per formare *O*-glucuronidi, *O*-metil-eteri o esteri solfati (Scalbert *et al.*, 2002). L'insieme di queste modificazioni serve a rendere i polifenoli più idrofilici, facilita la loro escrezione nella bile e nelle urine ed il trasporto nel circolo sanguigno, attraverso il legame con proteine plasmatiche, come l'albumina, e infine riduce la loro potenziale tossicità (Manach *et al.*, 2004). Una volta passate dal circolo entero-epatico, le nuove forme coniugate dei polifenoli raggiungono l'intestino con la bile e possono essere ulteriormente metabolizzate dapprima nel tenue e successivamente nel colon dalla microflora intestinale, dove possono essere convertiti in agliconi e/o in composti aromatici più semplici e più assorbibili (Santino *et al.*, 2017).

3.3. Polifenoli e microbiota intestinale

Diversi studi suggeriscono che l'interazione tra i polifenoli e il microbiota intestinale sia una corrispondenza reciproca, poiché i gruppi microbici sono capaci di cambiare la struttura dei polifenoli in forme più assorbibili, e al contempo i polifenoli hanno la capacità di modulare la composizione del microbiota (Ozdal *et al.*, 2016; Santino *et al.*, 2017). In questa reciproca interazione, molto importante è la plasticità del microbiota (Jandhyala *et al.*, 2015), intesa come abilità di cambiare e modellarsi in differenti associazioni microbiche, a seconda degli stimoli esterni, ad esempio provenienti dalla dieta. D'altra parte, i polifenoli e i prodotti del loro metabolismo possono agire come modulatori della composizione del microbiota, promuovendo per esempio la crescita di gruppi benefici, e quindi esercitare attività prebiotica (Cardona *et al.*, 2013; Faria *et al.*, 2014).

A livello intestinale, il microbiota opera delle bio-trasformazioni sui composti polifenolici. La trasformazione su flavonoidi come quercetina, kaempferolo e miricetina consiste nella rottura dell'anello C dello scheletro carbonioso, che comporta la separazione degli anelli A e B, dando luogo a differenti sottoprodotti. I principali gruppi microbici coinvolti nelle modificazioni dei flavonoidi appartengono ai generi *Clostridium* e *Eubacterium* (Selma *et al.*, 2009; Ozdal *et al.*, 2016; Santino *et al.*, 2017). La bio-trasformazione delle antocianine consiste principalmente nella de-glicosilazione catalizzata da glicosidasi e ramnosidasi batteriche, con produzione di agliconi altamente instabili. Questa instabilità può generare intermedi, che possono andare incontro a rotture dello scheletro carbonioso. La degradazione delle antocianine segue successivamente un destino simile agli altri flavonoidi, ovvero la rottura dell'anello C e la sintesi di sottoprodotti, principalmente acidi fenolici, come acido caffeico, *p*-cumarico, ferulico, gallico e protocatecuico (Selma *et al.*, 2009; Ozdal *et al.*, 2016).

Oltre alla capacità di alcuni gruppi del microbiota intestinale di convertire i polifenoli in forme biodisponibili, esiste anche l'influenza dei polifenoli nella crescita di alcuni gruppi batterici, modulando così il profilo microbico intestinale. Ad esempio, la somministrazione di polifenoli contenuti nel vino rosso, sia in studi su ratto che su uomo, ha portato ad aumenti significativi in alcuni gruppi probiotici, come i *Bifidobacteria* e *Lactobacilli* (Dolara *et al.*, 2009; Queipo-Ortuño *et al.*, 2012), così come la somministrazione di antocianine e bevande a base di mirtilli (Faria *et al.*, 2014; Vendrame *et al.*, 2015).

3.4. Ruolo dei polifenoli per la cura delle patologie croniche intestinali (IBD)

Negli ultimi anni è stato evidenziato il ruolo dei polifenoli nella prevenzione delle patologie croniche intestinali, note come IBD (*inflammatory bowel diseases*). Le IBD sono causate da un'inappropriata risposta immunitaria, che avviene in soggetti geneticamente suscettibili, in risposta ad una complessa interazione tra fattori ambientali (fumo, dieta), microbici e sistema immunitario intestinale (Danese *et al.*, 2006; Ananthakristnan, 2015). Si distinguono due tipologie di infiammazioni croniche intestinali: colite ulcerosa e morbo di Crohn. Si tratta di patologie con diverso decorso clinico, ma i cui fattori di rischio sono in generale gli stessi. Le IBD colpiscono 1.5 milioni di Americani, 2.2 milioni di Europei e diverse migliaia di persone nel mondo (Molodecky *et al.*, 2012; Ananthakristnan, 2015), dunque con una maggiore incidenza e prevalenza nei paesi occidentali industrializzati. Si tratta di patologie multifattoriali, per la cui patogenesi è stato recentemente attribuito un ruolo molto importante al microbiota intestinale. Nei pazienti IBD, l'infiammazione deriva da un disordine dell'omeostasi intestinale con mancanza di tolleranza verso gli antigeni della normale microflora enterica da parte del sistema immunitario. Questa condizione è caratterizzata da infiltrazioni linfocitarie, seguite da distruzione tissutale e tentativi di riparazione e alterata integrità epiteliale. Nelle IBD il bilanciamento tra cellule T regolatorie e T effettrici del sistema immunitario è alterato ed è stimolata la produzione di citochine pro-infiammatorie. La terapia per le IBD è correntemente basata su agenti immunosoppressivi, corticosteroidi e anticorpi anti-TNF α (Rutgeerts *et al.*, 2009), trattamenti che aiutano ad abbassare le risposte del sistema immunitario aberrante e le cascate infiammatorie, ma che non risolvono di fatto il problema. L'uso di queste terapie è piuttosto limitante, a causa degli effetti collaterali per lunghi periodi di trattamento e per l'alto costo (Ha & Katz, 2013). Per queste ragioni, sono urgenti strategie adiuvanti, o possibilmente preventive, da affiancare alle terapie farmacologiche. Un approccio è rappresentato da strategie di tipo nutrizionale, con diete arricchite da biocomposti. I polifenoli potrebbero essere in grado

di prevenire o ritardare la progressione delle IBD, e questo può essere possibile per diversi motivi:

- a) per le proprietà antiossidanti dirette e indirette;
- b) per le proprietà anti-infiammatorie;
- c) per l'azione sul microbiota intestinale, dal momento che possono comportarsi come prebiotici, ovvero favorire la crescita di gruppi probiotici; questi, infatti, possono avere il ruolo di competitori di altri gruppi patogenici all'interno delle comunità microbiche, favorendo così lo stato di salute intestinale;
- d) per l'impatto sulla barriera intestinale: è stato osservato infatti che i polifenoli promuovono l'espressione e l'assemblaggio delle proteine che costituiscono le giunzioni strette (tight junctions, TJs), e di conseguenza l'integrità della barriera intestinale (Suzuki *et al.*, 2011).

Gli studi *in vitro* finora condotti su linee cellulari intestinali dimostrano che i polifenoli sono efficaci modulatori delle cascate di trasduzione infiammatorie e modificano la produzione di diversi markers infiammatori (Zhou *et al.*, 2016). Tuttavia, non è possibile generalizzare questi effetti ad una sola classe di polifenoli, dal momento che relazioni dirette causa-effetto non sono state ancora chiaramente stabilite.

Per studiare l'efficacia dei polifenoli *in vivo*, vengono impiegati diversi modelli di roditori. I modelli di IBD possono essere basati sull'induzione dell'infiammazione mediante agenti chimici, sul trasferimento delle cellule immunitarie o su manipolazioni genetiche che riflettono i danni sull'integrità epiteliale o del sistema immunitario. L'induzione chimica è generalmente basata su sodio destrano solfato (DSS), acido 2,4,6,-trinitrobenzensulfonico (TNBS) o acido acetico. Il DSS è tipicamente impiegato per modelli di colite acuta, con la caratteristica di danneggiare l'integrità della barriera intestinale e innescare una risposta infiammatoria da parte delle cellule T helper 1, (Th1), T helper 2 (Th2) e T helper 17 (Th17). Studi *in vivo*, utilizzando modelli animali di colite sperimentalmente indotta, hanno indicato che i polifenoli possono essere efficaci nella prevenzione dell'infiammazione intestinale. Ulteriori studi, tuttavia, sono richiesti per chiarire i meccanismi d'azione, in particolare il ruolo dei polifenoli sul sistema immunitario, e soprattutto per verificare la corrispondenza tra gli effetti ottenuti sui modelli animali e i reali effetti sull'uomo.

SCOPO DEL LAVORO

I polifenoli sono metaboliti secondari delle piante presenti in diversi alimenti, prodotti e bevande di origine vegetale comunemente consumati nella dieta. Ad essi sono state attribuite proprietà antiossidanti ed antinfiammatorie, che possono almeno in parte spiegare come diete ricche in polifenoli possano prevenire importanti patologie dell'uomo (Romier *et al.*, 2009). L'ingegneria metabolica rappresenta uno strumento valido per il miglioramento del valore nutrizionale di alimenti di origine vegetale e, in particolare, per il miglioramento del contenuto di polifenoli in specie di interesse agronomico. Il pomodoro è un buon candidato per tale miglioramento mediante ingegneria metabolica, poiché nel frutto di questa specie la via biosintetica dei flavonoidi è poco attiva.

L'obiettivo del presente lavoro si articola in due sezioni principali:

Sezione I. Sviluppo di nuove linee di pomodoro ad alto contenuto di polifenoli e valutazione delle proprietà salutistiche dei nuovi frutti di pomodoro ottenuti.

Sezione II. Applicazione di tecniche di gene editing mediate dal sistema CRISPR/Cas9 per l'inserzione del promotore frutto-specifico E8 a monte di *SIMYB12*, gene implicato nella regolazione della sintesi di flavonoidi in pomodoro.

La Sezione I ha previsto lo sviluppo di nuove linee ad alto contenuto di polifenoli nell'ambito della collaborazione tra l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari del CNR di Lecce (ISPA-CNR), con il tutoraggio del Dott. Angelo Santino e della Dott.ssa Giovanna Giovinazzo, ed il John Innes Centre, con la supervisione della Prof.ssa Cathie Martin e del Dott. Eugenio Butelli.

Questa prima attività è stata svolta nel corso del primo anno di Dottorato, comprendendo un periodo presso il John Innes Centre, Norwich, Regno Unito. I frutti delle nuove linee ingegnerizzate di pomodoro sono stati caratterizzati da un punto di vista nutrizionale, valutandone il profilo metabolico ed il potere antiossidante.

Successivamente, è stata condotta una valutazione delle proprietà salutistiche sul modello animale C57Bl/6. Gli esperimenti *in vivo* sono stati condotti in collaborazione con il Dott. Marcello Chieppa, nel corso del secondo anno di Dottorato, presso il laboratorio di Immunopatologia Sperimentale, Istituto di Gastroenterologia I.R.C.C.S. "S. de Bellis" di

Castellana Grotte (Bari). Nell'ambito di questa collaborazione, sono stati studiati gli effetti delle differenti diete sul microbiota intestinale e sull'espressione di geni implicati in diverse vie di segnalazione cellulare. Inoltre, sono state valutate le proprietà anti-infiammatorie delle diete, basate su diverse combinazioni di composti polifenolici, su un modello di infiammazione cronica intestinale.

La Sezione II ha previsto un'attività preliminare di utilizzo del sistema CRISPR/Cas9 in pomodoro, nell'ambito dell'applicazione agroalimentare. Questo sistema può costituire un metodo alternativo a quello già impiegato nelle attività sperimentali della Sezione I, partendo comunque da alcuni aspetti di base. Tra questi, vi è l'importanza del promotore E8 nell'indirizzare in maniera frutto-specifica la sintesi di composti bioattivi nel frutto di pomodoro, e in secondo luogo l'utilizzo del fattore di trascrizione MYB12, come regolatore chiave nella sintesi di flavonoidi in pomodoro. L'attività condotta nella Sezione II ha avuto lo scopo di inserire, mediante tecnologia CRISPR/Cas9, la sequenza del promotore frutto-specifico E8 a monte del gene *MYB12* di *Solanum lycopersicum*, evitando così l'inserzione del transgene *AtMYB12*. Questa attività è stata condotta nella prospettiva, più a lungo termine, di sviluppare nuove linee di pomodoro migliorate nella sintesi di flavonoidi, ed è stata svolta nel corso del terzo anno di Dottorato, in collaborazione con il John Innes Centre. È stato sviluppato un costrutto plasmidico per direzionare l'attività endonucleasica di Cas9, successivamente utilizzato per un saggio di trasformazione transiente, al fine di studiare l'efficienza del sistema e la validità dell'approccio sperimentale, in una futura prospettiva di trasformazione stabile.

MATERIALI E METODI

Sezione I.

Sviluppo di linee di pomodoro ad alto contenuto di polifenoli e valutazione delle proprietà salutistiche dei nuovi frutti

1.1. Piante e condizioni di crescita

Le piante di pomodoro (*cv* Money Maker) sono state cresciute in serra con ciclo luce:buio di 16h:8h e temperatura di 23-25°C (John Innes Centre, Norwich, UK). Le piante generate da seme e genotipizzate sono state propagate per talea in terra o micropropagate su MS Agar 0.7% (Moorashige and Skoog), in camera di crescita, con fotoperiodo di 16h e temperatura di 25°C.

1.2. Incroci

Gli incroci sono stati eseguiti mediante emasculazione del fiore della pianta parentale che è stata scelta come pianta madre. Sono stati selezionati fiori non ancora completamente aperti e con stami non ancora giunti a piena maturità. L'emasculazione è stata condotta tramite rimozione degli organi maschili dal fiore (stami), estraendo delicatamente l'intera corolla del fiore. Per impedire impollinazioni indesiderate, sono stati rimossi completamente tutti i fiori vicini al fiore emasculato. Il giorno successivo all'emasculazione, è stata condotta l'impollinazione manuale strofinando le antere della pianta impollinatrice sullo stigma della pianta madre.

1.3. Isolamento dei semi

Semi raccolti da frutti di pomodoro maturi sono stati trattati con HCl 50% (v/v) per 10 minuti, per disgregare la polpa circostante e ripulirli, successivamente con buffer sodio fosfato 10% (p/v) per 10 minuti, per tamponare l'azione dell'HCl e ripristinare la neutralità. I semi sono stati successivamente lavati con acqua distillata, raccolti con un setaccio e lasciati asciugare per qualche giorno in luogo fresco e asciutto.

1.4. Selezione delle piante

1.4.1. Selezione fenotipica

La sterilizzazione dei semi ha previsto un trattamento con etanolo 70% per 5 min, successivamente con candeggina al 50% e 3 lavaggi con acqua distillata (20 minuti per ogni lavaggio).

La germinazione dei semi è stata ottenuta in scatole sterili su terreno selettivo (MS Agar 0.8% con Kanamicina 100 µg/ml) in camera di crescita (16h luce:8h buio, 25-26°C).

Una prima selezione fenotipica è stata fatta sulle piantine ottenute, che presentano radici purpuree, indice di espressione di geni coinvolti nella sintesi delle antocianine e pertanto espressione dei fattori di trascrizione Del/Ros1. Successivamente, l'analisi molecolare mediante PCR ha permesso di confermare la selezione ulteriore delle piante transgeniche.

1.4.2. Estrazione del DNA genomico

Foglie verdi e giovani raccolte dalle piante cresciute su terreno selettivo e sottoposte ad iniziale screening fenotipico, sono state utilizzate per l'estrazione del DNA genomico. Le foglie sono state lavate, congelate in azoto liquido e polverizzate. L'estrazione del DNA genomico è stata condotta secondo il protocollo indicato dalla casa produttrice (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen). Il DNA è stato quantificato mediante metodica spettrofotometrica, utilizzando Nanodrop UV-Vis (Thermoscientific).

1.4.3. Genotipizzazione mediante PCR

La genotipizzazione delle piante è stata condotta mediante analisi PCR per verificare la presenza delle sequenze dei transgeni di interesse (*AtMYB12* e *StSy*) nel genoma della progenie ottenuta dagli incroci. Le seguenti coppie di primers sono state utilizzate su 10-20 ng di DNA genomico:

AtMYB12_FW: GGTCCGCTATGAAACCAAAA;

AtMYB12_RV: TGTTATGCAACTCCCCATCA;

VvStSy_FW: ACCCCCGACCACTGTGTCTACCA;

VvStSy_RV: GATTACAGCTGCAGACCCATCACCA.

Le amplificazioni sono avvenute secondo le seguenti condizioni, per *AtMYB12*: iniziale denaturazione a 94°C per 2 min, seguita da 35 cicli a 94°C per 30 sec, 57°C per 30 sec, 72°C per 30 sec, con estensione finale a 72°C per 10 min; per *StSy* è stato usato lo stesso protocollo con

una temperatura di annealing di 60°C. I prodotti amplificati sono stati visualizzati dopo elettroforesi su gel di agarosio 0.8%.

1.5. Estrazione dei polifenoli da frutti di pomodoro

Frutti allo stadio maturo di sviluppo sono stati raccolti, lavati con acqua distillata, ridotti in frammenti, congelati in azoto liquido, liofilizzati per quattro giorni e polverizzati. A 200 mg di polvere dei liofilizzati sono stati aggiunti 5 ml di metanolo 80% e messi in agitazione per 15 ore a 4°C al buio. Il giorno successivo gli estratti sono stati centrifugati a 4000 g per 20 min a 4°C e i sovrantanti raccolti e conservati a 4°C. Ai pellet sono stati aggiunti 5 ml di metanolo 80% e lasciati in agitazione per 3 ore al buio. Gli estratti sono stati nuovamente centrifugati a 4000 g per 20 min a 4°C, i sovrantanti sono stati raccolti, riunificati ai precedenti, ulteriormente centrifugati e filtrati su membrana con diametro 0.22 µ, aliquotati e conservati a -80°C fino al loro utilizzo.

1.6. Analisi LC/MS e quantificazione dei composti polifenolici

Gli estratti preparati sono stati utilizzati per la separazione condotta mediante HPLC/MS (Shimadzu Nexera LC system, collegato ad uno spettrometro di massa IT ToF). Gli estratti sono stati caricati su colonna XB-C18 (Phenomenex) 2.6 µm Kinetex (diametro interno 100 x 2.1 mm). La separazione è stata condotta usando un gradiente lineare di acetonitrile e acido formico 0.1% in acqua, a 0.5ml/min a 40°C. Le antocianine ed i flavonoidi sono stati rilevati mediante assorbanza a 200-600 nm, e mediante spettrometria di massa elettrospray, ottenendo gli spettri dal rapporto m/z 200-2000. Gli eventi di frammentazione primari e secondari sono stati determinati usando il programma Shimadzu in modalità postRun. I flavonoidi e gli stilbeni sono stati quantificati usando le curve di calibrazione costruite per i seguenti standards: per kaempferolo-rutinoside, rutina, acido clorogenico, naringenina, naringina, resveratrolo, piceide. Le analisi dei campioni sono state condotte dal Dr Lionel Hill (John Innes Centre, Norwich, UK).

1.7. Estrazione dei carotenoidi da frutti di pomodoro e analisi HPLC

A 50 mg di polvere liofilizzata di pomodoro maturo, sono stati aggiunti 2ml di KOH 60%, 2ml Etanolo assoluto, 1 ml NaCl 1% e 5 ml di idrossitoluene butilato (BHT) (0.05% (w/v) in acetone). La miscela è stata incubata in bagnetto termostato a 60°C per 30 min, successivamente raffreddata in ghiaccio e ad essa aggiunti 15 ml di NaCl 1% per prevenire l'emulsione. Sono state effettuate estrazioni con 15 ml esano-etilacetato (9:1) fino alla perdita di pigmentazione del

pellet, centrifugando a 3000 g per 5 min e recuperando la fase organica. Gli estratti sono stati portati a secco con rotavapor e i residui solubilizzati in 1 ml di etilacetato. I campioni così preparati sono stati analizzati mediante HPLC, secondo il metodo descritto da Lenucci e collaboratori (2010).

1.8. Saggio TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

Il saggio è basato sull'attività di estinzione o "scavenging" degli antiossidanti, del radicale cationico ABTS valutata in confronto ad un antiossidante standard. Il radicale cationico ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) è stato generato dissolvendo in una soluzione di ABTS (7 mM) del persolfato di potassio (2.45 mM) ed incubando la miscela al buio a temperatura ambiente per 12-16 ore prima dell'utilizzo. Per il saggio, la soluzione di $\text{ABTS}^{\cdot+}$ è stata diluita con acqua fino a rilevare un'assorbanza di 0.70 (± 0.2) a 734 nm. Alla soluzione $\text{ABTS}^{\cdot+}$ diluita sono state aggiunte diluizioni seriali di una soluzione standard di Trolox, che è un analogo della vitamina E, (da 0 a 25 μM) per la costruzione della curva di calibratura, o l'estratto da frutto da analizzare. La capacità antiossidante è stata espressa in μmol di Trolox/g DW.

1.9. Saggio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Il saggio è stato condotto in una piastra da 96 pozzetti, in tampone fosfato 75 mM (ph 7.4) in una miscela finale di reazione di 200 μl . La soluzione di antiossidante e fluoresceina (concentrazione finale di 70 nM) sono state introdotte in ciascun pozzetto e preincubate a 37°C. La soluzione di 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (AAPH) (12 mM) è stata rapidamente aggiunta e la fluorescenza è stata misurata per 60 minuti a distanza di un minuto (a lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione di 485 nm e 527 nm, rispettivamente). Il grado di protezione mediata dall'antiossidante è stato quantificato sulla base di una curva di calibratura costruita con differenti concentrazioni (1-6 μM) di Trolox.

1.10. Saggio Folin-Ciocalteu

Il saggio Folin-Ciocalteu è stato condotto per la determinazione del contenuto totale dei polifenoli negli estratti da frutto di pomodoro. A 500 μl di reattivo di Folin-Ciocalteu, precedentemente diluito 1:10 in acqua distillata, sono stati aggiunti 400 μl di una soluzione di Na_2CO_3 (75g/L). Alla miscela sono stati aggiunti 100 μl di diluizioni seriali di acido gallico, utilizzato come standard per la costruzione della retta di calibratura, o gli estratti da frutto. Le miscele sono state agitate e incubate al buio per 2 ore a temperatura ambiente e l'assorbanza

determinata a 765 nm. Il contenuto totale di polifenoli è stato espresso in acido gallico equivalenti (GAE) (mg/g DW).

1.11. Standard etici per l'utilizzo degli animali

Gli esperimenti *in vivo* per la valutazione delle proprietà nutrizionali dei frutti di pomodoro sono stati condotti nel laboratorio di Immunopatologia Sperimentale dell'IRCCS "S. De Bellis" di Castellana Grotte (BA), sotto la supervisione del Dott. M. Chieppa. Gli studi *in vivo* sono stati condotti in accordo con gli standard etici, secondo la Dichiarazione di Helsinki e le linee guida nazionali ed internazionali. Femmine di topo dell'età di 6- /8- settimane sono state acquistate dai laboratori Jackson: Wild-Type C57Bl/6, Stock No: 000664; peso medio pari a 20 g. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in accordo con la Direttiva EEC 86/609 sostenuta dal D.L. italiano n. 116 1992 e approvato dalla Commissione sull'Etica per gli esperimenti animali del Ministero della Salute – Direzione Generale Sanità Animale (Prot. 2012/00000923 A00: Eo_GINRC) e l'ufficiale veterinario RBM.

1.12. Organizzazione dei gruppi comparativi con differenti diete e trattamento con DSS

Per ciascuna linea di pomodoro sono stati messi a disposizione gruppi di 5 femmine adulte di topi della linea C57Bl/6. I gruppi di topi sono stati alimentati con mangime standard (pellet, Mucedola, Italia) arricchito con l'1% di polvere di liofilizzato di pomodoro maturo, opportunamente miscelato. In Tabella 1 è riportata la composizione nutrizionale del mangime. Sono stati quindi organizzati 5 diversi gruppi alimentati con le seguenti diete: A) pellet (gruppo di controllo); B) pellet arricchito con pomodoro wild type; C) pellet arricchito con pomodoro Indigo; D) pellet arricchito con pomodoro High-Resv; E) pellet arricchito con pomodoro Bronze. I gruppi di animali sono stati alimentati per un periodo di circa due settimane. A partire dalla terza settimana, è stato avviato il trattamento con l'agente infiammatorio sodio destrano solfato (DSS) all'1% in acqua, contestualmente alle diete precedentemente descritte, per un periodo di due settimane.

Tabella 1. Composizione del mangime base utilizzato per le diete.

Nutrienti grezzi in materia secca	Quantità
Proteine	19.4%
Grassi	2.58 %
Fibre	5.54 %
Ceneri	6.76%
Energia Metabolizzabile (kCal/Kg)	2668
Minerali e vitamine	Integrati

1.13. 454 pyrosequencing per l'analisi del microbiota intestinale

L'analisi metagenomica del microbiota intestinale è stata condotta da Genomix4life (Baronissi, Salerno). Da ciascun animale di ogni gruppo di dieta sono stati prelevati 2 g di campioni fecali, a partire da due giorni precedenti al sacrificio. I campioni di feci sono stati congelati e conservati a -80°C fino al loro utilizzo. Da ogni campione, 300 mg sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA usando QIAmp DNA Stool Mini kit (Qiagen), secondo il protocollo indicato dal kit. La qualità e la quantità del DNA (5-10 µg) sono state misurate mediante NanoDrop (Thermoscientific). Il profilo fecale del microbiota è stato condotto mediante sequenziamento ad alta efficienza degli ampliconi del gene 16rRNA. Per la reazione di PCR delle regioni ipervariabili V1-V3 del rRNA 16S sono stati impiegati i due primers universali 27F e 533R. Il primer 533R include un'unica sequenza tag per legarsi ai campioni. Le sequenze dei primers sono le seguenti:

27F-5'- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
- 3';

533R-5'-

CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGNNNNNNNNNNCATTACCGCGGCTG
CTGGCA-3', dove le sequenze in corsivo e sottolineate sono i primers B e A di sequenziamento

454 Life Sciences® Titanium, e i caratteri in grassetto indicano i primers universali 16rRNA 27F e 533R. La sequenza *barcode* all'interno del primer 533R è denotata con 12N. I geni rRNA 16S sono stati amplificati in piastre da 96 pozzetti. La presenza di ampliconi è stata confermata e quantificata usando il QIAxcel System (Qiagen) e quantità equimolari (~100 ng) di ampliconi di PCR miscelate in tubi singoli. I primers di amplificazione e il buffer di reazione sono stati rimossi

processando la miscela degli ampliconi con il Kit AMPure (Agencourt). Le miscele purificate di ampliconi sono state sequenziate mediante 454 FLX Titanium pyrosequencing dal service Genomix4life (Salerno, Italia). Le “Operational Taxonomic Units” (OTU) sono state definite dopo rimozione delle sequenze presenti solo una volta nel database, con *clustering* al 97% di similarità (3% di divergenza). Le OTU sono state classificate e compilate secondo il livello tassonomico. Il controllo di qualità e gli assegnamenti tassonomici sono stati fatti in QIIME e mediante “Ribosomal Database Project Bayesian classifier” in combinazione con altri strumenti informatici implementati da Genomix4life per l’analisi delle comunità microbiche.

Dal momento che tutti i generi più abbondanti trovati sono risultati contenuti nel database NCBI, è stato generato l’albero filogenetico usando PhyloT, implementato e visualizzato con Interactive Tree Of Life (iTOL) tool, versione 2.2.2., che genera alberi filogenetici sulla base della tassonomia NCBI. La co-presenza di generi nei campioni è stata stimata sulla base dell’analisi di correlazione di Pearson ($P < 0.05$), con *clustering* e visualizzazione delle correlazioni ottenute con “corrplot” in R.

Le abbondanze relative dei generi ottenute per ciascun gruppo di dieta, sono state successivamente utilizzate per l’analisi di correlazione con i principali composti polifenolici presenti nei frutti di pomodoro addizionati alla dieta standard, calcolando i coefficienti di correlazione di Spearman. L’analisi di correlazione è stata effettuata usando Bioconductor package “limma”, in R.

1.14. Estrazione dell’RNA da colon

Al termine del periodo di dieta di 2 settimane e al termine del periodo di trattamento con DSS 1%, sono stati prelevati i colon dai differenti gruppi di animali. I colon sono stati lavati opportunamente in soluzione fisiologica e suddivisi in tre tratti principali, rispetto al cieco: colon prossimale, colon mediale e colon distale (porzione rettale). Per le analisi molecolari è stato utilizzato il tratto del colon mediale. I campioni di tessuto dissolti in Trizol Reagent (Sigma) sono stati vortexati brevemente e ad essi aggiunti 200 µl di cloroformio, vortexati e lasciati ad incubare a temperatura ambiente per 10 minuti; centrifugati per 15 min a 4°C a 13000 g e i sovrantanti sono stati recuperati (400 µl). Ad essi sono stati aggiunti 500 µl di isopropanolo, quindi vortexati e lasciati ad incubare 10-20 minuti a -20°C, per permettere la precipitazione degli acidi nucleici. I campioni sono stati centrifugati a 13000 g per 10 min a 4°C. I pellet lavati con 200 µl di etanolo al 70% (10 min a 13000 g a 4°C) e lasciati asciugare a temperatura ambiente, sono stati risospesi in 30-50 µl di acqua nucleasi-free e conservati a -20°C fino

all'utilizzo. Il dosaggio dell'RNA nei campioni è stato eseguito spettrofotometricamente mediante Nanodrop (Thermoscientific).

1.15. Sintesi del cDNA

La reazione di sintesi di cDNA per piastre per la colite ulcerosa (BioRad) è stata condotta utilizzando per ogni campione: 4 µl di 5X Buffer iScript cDNA advanced synthesis (BioRad), 1 µl iScript Reverse cDNA advanced synthesis Enzyme, 1 µl RT control template, 2 µg di RNA e Sigma Water nuclease-free fino al volume totale di reazione di 20 µl. L'*RT control template* consiste in un RNA sintetico che non presenta alcuna omologia con RNA umano o animale, e che viene utilizzato come controllo di avvenuta reazione di retrotrascrizione. La reazione è stata sottoposta al ciclo: 42°C per 30 min e 85°C per 5 min. I campioni sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

1.16. Real time q-PCR

Per le Real Time q-PCR sono state utilizzate piastre per la colite ulcerosa (BioRad) che presentano in ogni pozzetto primers precostituiti, permettendo di testare l'espressione di geni implicati nelle vie metaboliche infiammatorie e metaboliche che possono essere attivati nel corso dell'infiammazione cronica intestinale. Le Real time q-PCR sono state condotte secondo le istruzioni del kit Sso Advanced TM Universal SYBR® Green (BioRad). 20µl della reazione di retrotrascrizione di ogni campione sono stati portati ad un volume finale di 100 µl (*working solution*). Ad 1 µl della *working solution* sono stati aggiunti 10 µl Sso Advanced Mix e 9 µl Sigma Water nucleasi-free fino ad un volume finale di 20 µl totali per pozzetto della piastra. La reazione è stata condotta in CFX96 Thermocycler (BioRad) secondo le seguenti condizioni: iniziale attivazione a 95°C per 2min, seguita da 39 cicli a 95°C per 5 sec e 60°C per 30 sec, e un ciclo a 65°C - 95°C per 5 sec a step (ogni step dato da incrementi di 0.5°C). I dati sono stati analizzati con software CFX Manager 3.1 version (BioRad) e visualizzati con CRAN-mirror package 'gplots' in R (R Development Core Team, 2008).

1.17. Valutazione dell'attività infiammatoria

Il peso corporeo, l'alimentazione media giornaliera, la condizione generale di ogni topo e differenti parametri infiammatori (consistenza delle feci, presenza di sangue occulto nelle feci, eventuale presenza di prolassi, sanguinamenti e generale stato infiammatorio rettale) sono stati monitorati giornalmente. Sulla base di questi parametri, insieme alla valutazione del rapporto tra

la lunghezza e il peso del colon di ogni topo, è stato stabilito uno “*score* infiammatorio” per ciascun gruppo, definendo così un indice di attività infiammatoria (DAI, *Disease Activity Index*) (Cavalcanti *et al.*, 2014).

1.18. Analisi istologica

Le sezioni di tessuto dal colon prossimale e distale sono state fissate in formalina al 10% e incorporate in paraffina. Sezioni di 6 µm sono state colorate con ematossilina eosina e le immagini acquisite mediante Leica LMD 6500.

1.19. Isolamento delle popolazioni linfocitarie e marcature intracellulari per l'analisi citofluorimetrica

I linfonodi mesenterici sono stati prelevati e immersi in 1ml di RPMI completo. Gli organi sono stati disgregati su membrana (40 µ) in condizioni di sterilità. Le cellule sono state raccolte in PBS+EDTA 0,5 M (pH7.4) sterile in un volume di 5ml e la soluzione è stata centrifugata. Il pellet è stato risospeso in 500 µl di RPMI completo e le cellule utilizzate per le successive marcature intracellulari.

Una miscela di PBS e CD3 è stata dispensata in pozzetti di una piastra multipozzetto da 12 ed incubata a 37°C per permettere l'adesione del CD3 alle pareti. Successivamente 400 µl di cellule, raccolte dopo la disgregazione, sono stati piastrati nei pozzetti. Per la stimolazione dei linfociti, ai 400 µl di cellule in ogni pozzetto è stata aggiunta una soluzione di RPMI completo, CD28 e Brefeldina ed incubate a 37°C overnight. I campioni sono stati centrifugati a 17000 g per 8 min a 4°C e il pellet risospeso in 100 µl MACS Buffer contenente 2 µl CD4 FITC. I campioni sono stati incubati per 1 h a 4°C al buio e dopo centrifugazione risospeso in 100 µl Fixing Buffer (BD). Dopo incubazione al buio a 4°C per mezz'ora, ai campioni è stato aggiunto 1ml Perm Buffer 1X e centrifugati per il lavaggio. In condizioni di sterilità sono state preparate e miscele di anticorpi singole e multiple (singole: 100 µl Perm Buffer 1X + 2 µl di anticorpo1; multiple: 100 µl Perm Buffer 1X + 2 µl anticorpo1 + 2 µl anticorpo2). I pellet sono stati risospesi in 700 µl di Perm Buffer e distribuiti in 3 tubi per le differenti combinazioni di anticorpi ed un tubo di raccolta di pool cellulari (per marcatura singola CD4 FITC). Ad ogni campione è stata aggiunta la miscela di anticorpi precedentemente preparata. Dopo incubazione al buio a 4°C per 2 h è stato aggiunto 1 ml Perm Buffer 1X e i campioni sono stati centrifugati per il lavaggio.

I campioni sono stati fissati con 100 μ l di Fixing Buffer fino al momento della lettura al citofluorimetro.

Per la marcatura intracellulare del Foxp3, 100 μ l di cellule, raccolte dopo la disgregazione del linfonodo, sono stati distribuiti in tubi per citofluorimetria. A 100 μ l di cellule sono stati aggiunti 100 μ l Perm Buffer (EBioscience) e centrifugati a 17000 g per 8 min a 4°C per il lavaggio. Il pellet è stato risospeso in 100 μ l di una soluzione di 1,2 ml Perm Buffer e 24 μ l di anticorpo CD4⁺ ed incubato a 4°C al buio overnight. Dopo centrifugazione, i campioni sono stati ulteriormente risospesi in 2 ml PBS EDTA e centrifugati per un ulteriore lavaggio. Ad ogni tubo sono stati aggiunti 100 μ l Fix:Perm Buffer (EBioscience) in rapporto 1:3 ed incubati mezz'ora al buio a 4°C. Ad ogni campione è stato aggiunto 1 ml di Perm Buffer 1X e centrifugato; successivamente per ogni tubo sono stati aggiunti 100 μ l Perm Buffer e 2 μ l anticorpo Foxp3 ed incubati mezz'ora al buio a temperatura ambiente. Ad ogni tubo è stato aggiunto 1ml Perm Buffer 1X e dopo centrifugazione, i campioni sono stati fissati con 100 μ l di Fixing Buffer fino al momento della lettura al citofluorimetro. Poco prima della lettura i campioni sono stati centrifugati e risospesi in 100 μ l di PBS EDTA. I dati sono stati acquisiti al citofluorimetro e analizzati con FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

1.20. Analisi statistica

I dati sono espressi come valori $\pm$ DS. Le differenze nei profili metabolici o antiossidanti tra le differenti linee di pomodoro sono state analizzate mediante ANOVA seguita dai test di Tukey o Dunnett, usando GraphPad Prism 5 e considerando $P < 0.05$ statisticamente significativo. L'analisi statistica sulle abbondanze relative dei generi del microbiota intestinale è stata condotta mediante Duncan's multiple-range test, con limite di significatività di 0.05. Per l'analisi di correlazione di Spearman sui generi del microbiota ed i polifenoli nella dieta, le correlazioni significative sono state considerate con un P value < 0.05 corretto in FDR (*false discovery rate*). Infine, se non altrimenti specificato, i restanti dati sono stati analizzati e confrontati con test t di Student indipendente o accoppiato.

Sezione II.

Gene editing mediato dal sistema CRISPR/Cas9 sul gene *SlMYB12*

2.1. Metodiche molecolari generali per il clonaggio

2.1.1. Vettori di clonaggio e cellule competenti

Tutti i plasmidi ed i protocolli utilizzati per i clonaggi sono stati forniti da The Sainsbury Laboratory (TSL, Norwich, UK). La trasformazione delle cellule competenti (Dh5 α) è stata condotta mediante shock termico. Le cellule sono state incubate con 10-20 ng di DNA plasmidico in ghiaccio per 30-45 min, successivamente è stato effettuato shock termico a 42°C per 1 minuto e le cellule sono state poste subito in ghiaccio. Le cellule sono state incubate in 750 μ l di S.O.C. medium per 1h a 37°C in agitazione e successivamente piastrate su terreno contenente l'antibiotico specifico per la selezione data dal tipo di vettore (carbenicillina, ampicillina, spectinomomicina o kanamicina, soluzioni madri: 100 mg/ml) e X-Gal e IPTG, utilizzati per la selezione bianco/blu. Le colonie bianche positive sono state selezionate e poste a crescere in colture liquide contenenti l'opportuno antibiotico.

2.1.2. Isolamento del DNA plasmidico da *E.coli*

Inoculi (5-10 ml) di cellule batteriche (Dh5 α) contenenti il vettore di interesse, sono state utilizzate per l'isolamento del DNA plasmidico mediante QIAprep Spin Mini kit (Qiagen), secondo il protocollo indicato dalla casa di produzione. Le colture batteriche sono state centrifugate e risospese in tampone di lisi. Il DNA plasmidico legato alle membrane delle colonne fornite, è stato risospeso in 30 μ l di buffer di eluizione (Qiagen) e quantificato al Nanodrop (ThermoFisher).

2.1.3. Disegno dei primers

Specifici primers sono stati disegnati per l'amplificazione ed il clonaggio delle sequenze del promotore *pSlMYB12*, del promotore *E8* e del gene *SlMYB12*, per i sequenziamenti degli inserti nei vettori plasmidici e per la selezione delle radici trasformate, utilizzando Primer3Plus e Geneious (versione R10).

2.1.4. Sequenziamento

Tutti i sequenziamenti per le verifiche dei clonaggi sono stati condotti dal DNA Sequencing Service di Eurofin Genomics (www.eurofinsgenomics.eu). Per le reazioni di sequenziamento, i campioni sono stati preparati nelle seguenti miscele: DNA plasmidico (a partire da 100ng), 2 µl di primer 10 µM e acqua sterile nucleasi-free per un volume finale di 17µl. I risultati sono stati analizzati mediante Chromas Lite e Geneious (versione R10).

2.2. Disegno della guida sgRNA

Per il disegno della guida, è stata utilizzata una parte della sequenza del promotore di *SIMYB12*, a monte del gene, ovvero nella regione in cui si desidera che avvenga il taglio da parte dell'endonucleasi Cas9. Mediante un software online di disegno delle guide (crispr.dbcls.jp), sono state ottenute cinque possibili guide con minimizzata possibilità di attività off-target. Tra queste, è stata scelta la guida in prossimità della sequenza del gene *SIMYB12*, e dunque più a valle della sequenza del promotore.

Sulla base di questa guida è stata disegnata la seguente coppia di primers:

Forward primer: tgtggtctca ATTG CTATTTATTGGCATTCTAT gtttagagctagaatagcaag

Reverse Primer: tgtggtctca AGCG TAATGCCAACTTTGTAC

di cui il primo contiene la sequenza specifica della guida (sottolineata) ed il secondo contiene una sequenza standard, da utilizzare per ottenere lo *scaffold* della guida (paragrafo 2.3.5.).

2.3. Sviluppo del costrutto pSIMYB12_pE8_SIMYB12 mediante Golden Gate

2.3.1. Il Golden Gate

Il clonaggio Golden Gate è basato sull'utilizzo di enzimi di restrizione di tipo II (Type IIS Restriction endonucleases, Type IIS RENs). Le RENs di tipo II tagliano fuori il loro sito di restrizione. Gli enzimi usati nel clonaggio Golden Gate di questo lavoro sono:

BbsI (BpiI): GAAGACNN↓NNNN

BsaI: GGTCTCN↓NNNN

Queste RENs lasciano sporgenze di 4pb (NNNN):

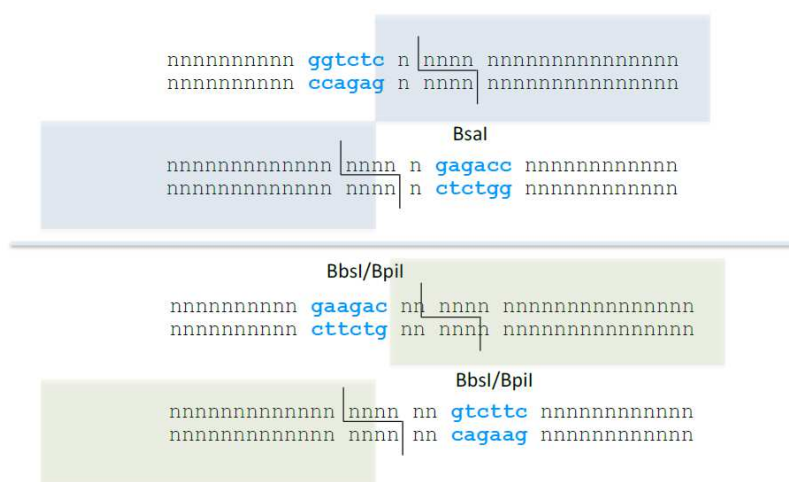


Figura 1. Rappresentazione dei siti degli enzimi di restrizione di tipo II (RENs) BsaI e BpiI (BbsI).

Se le sporgenze di 4 pb sono complementari, i riquadri più scuri, indicati in Figura 1, possono essere ligati insieme, non lasciando traccia dei siti di restrizione nelle molecole finali. Quando le 4 pb sono usate per ricongiungere le molecole esistenti nella sequenza originale, questo assemblaggio viene definito “scarless” poiché non rimane alcuna “lesione” o traccia del taglio dal processo di assemblaggio.

Poiché il Golden Gate consiste nell’assemblaggio di moduli, esistono delle sporgenze da 4 pb standard per l’inizio e la fine di ciascun modulo (Tabella 2).

Tabella 2. *Overhangs* da 4 bp specifici per la parte iniziale e terminale di ogni modulo utilizzato nell’assemblaggio del Golden Gate.

	5' 4bp o/h	3' 4bp o/h
P = Promoters	GGAG	TACT
P + 5U = Promoters with 5' UTLs	GGAG	AATG or CCAT ¹
5U = 5' UTL	CCAT	AATG or CCAT ¹
NT = N terminal tags/peptides	CCAT	AATG
CD = CoDing sequences	AATG	GCTT or TTCG ²
CT = C terminal tags/peptides	TTCG	GCTT
T = 3' UT/terminator/polyA signals	GCTT	CGCT

(¹Per i moduli NT e ² per moduli CT)

Questi moduli vengono chiamati Livello 0. I livelli 0 possono essere assemblati in un vettore accettore per formare il Livello 1.

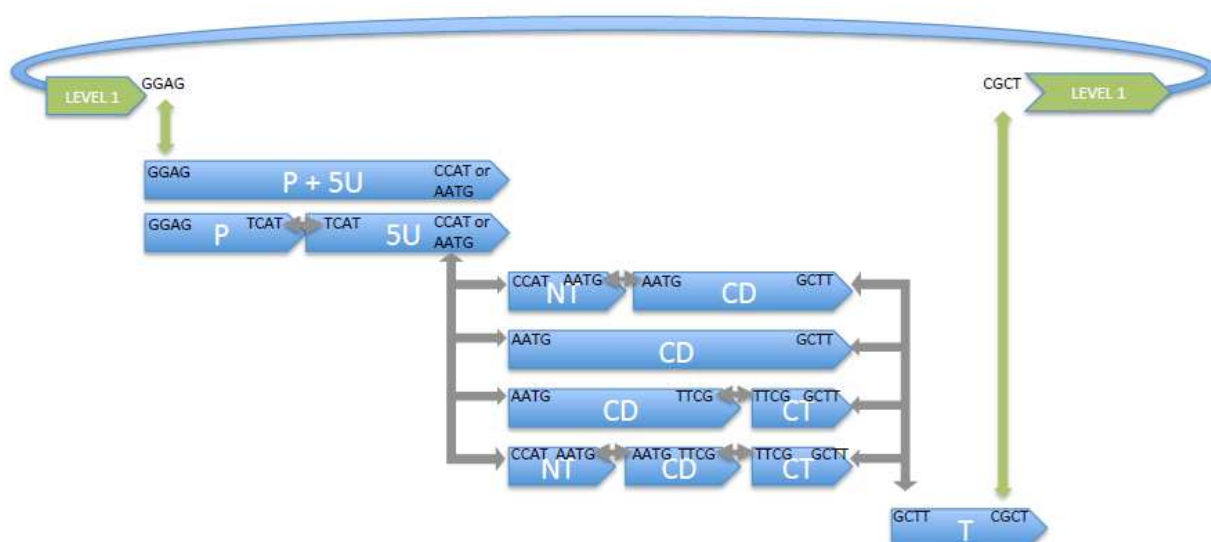


Figura 3. Rappresentazione dei possibili assemblaggi di moduli con gli specifici *overhangs* per la formazione del Livello 1.

La reazione che lega i moduli insieme è chiamata “*dig-lig*” (digestione e ligazione) ed è una reazione di un unico passaggio, dove si inseriscono enzima di restrizione, ligasi, tutti i vettori di Livello 0 che contengono le sequenze che si vogliono legare insieme, ed il vettore accettore di Livello 1, nello stesso tubo.

I vettori accettori di Livello 0 hanno i siti dell’enzima BsbI (BpiI). Quando sarà formato il Livello 0, ossia il vettore accettore conterrà la sequenza di interesse, i siti BbsI saranno persi e saranno disponibili i siti BsaI, utilizzabili nell’assemblaggio del livello successivo (Livello 1). Per inserire le sequenze di interesse nei vettori accettori di Livello 0 o di Livello 1, sarà necessario fornirle di estremità caratterizzate dai siti BsbI o BsaI, e dunque è necessario disegnare i primers con gli adattatori specifici per questi siti. Inoltre, è necessario che le sequenze di interesse siano internamente prive di siti BsbI o BsaI.

Inoltre, con lo stesso meccanismo di assemblaggio, è possibile assemblare Livelli 1 multipli in un vettore accettore di Livello 2, ottenendo in questo modo costrutti multi-genici.

2.3.2. PCR da DNA genomico di pomodoro per le sequenze di *pSIMYB12* e *SIMYB12*

Per ottenere le sequenze di interesse del promotore endogeno (*pSIMYB12*) e del gene *SIMYB12*, è stato utilizzato il DNA genomico da foglia, estratto secondo la procedura descritta nel paragrafo 1.4.2 della Sezione I. Le sequenze dei primers utilizzati per l’amplificazione delle regioni di interesse sono state disegnate aggiungendo i siti di restrizione per l’enzima BsaI: *pSIMYB12*_-738_BsaI_FW: TGTGGTCTCAGGAGGTTCTGAAATCCGATGTCGATAG

pSIMYB12_BsaI_pE8_REV:

TGTGGTCTCAGATGAGAGACAACACAAATAAATGGACC

SIMYB12_BsaI_FW: TGTGGTCTCAGAAGATGGGAAGAACACCTTGTTGTGA

SIMYB12_770_BsaI_REV: TGTGGTCTCAAGCGGTTGTTAGATCGGGCACCAAAT

Le PCR sono state condotte utilizzando 40 ng di DNA genomico nella miscela di reazione, secondo il protocollo commerciale indicato per 5X Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB Biolabs). È stata successivamente effettuata una corsa elettroforetica dei prodotti di PCR su gel di agarosio 0.8% e ottenute le bande dell'altezza attesa (738pb per *pSIMYB12* e 770pb per *SIMYB12*). Le bande sono state estratte da gel utilizzando il kit Gel extraction mini kit (Qiagen) e quantificate al Nanodrop (Thermofisher).

2.3.3. PCR per il promotore E8

La sequenza del promotore E8 (*pE8*) è stata ottenuta mediante PCR da DNA plasmidico, gentilmente fornito dal Dr Eugenio Butelli (John Innes Centre, Norwich, UK). I primers utilizzati sono:

pE8_BsaI_FW: TGTGGTCTCACATCCCTAATGATATTGTTTAC

pE8_BsaI_REV: TGTGGTCTCACTTCTTTTGCCTGTGAATGATTAG

La PCR è stata condotta utilizzando lo stesso protocollo descritto per *pSIMYB12* e *SIMYB12*.

2.3.4. Assemblaggio dell'inserto pSIMYB12_pE8_SIMYB12 nel vettore pICSL86900 di Livello 1

I prodotti di PCR sono caratterizzati dalla presenza di code di BsaI aggiunte alle estremità durante le amplificazioni, per realizzare il clonaggio Golden Gate. Questo clonaggio ha previsto l'utilizzo dell'enzima BsaI per effettuare dei tagli che vengono ricongiunti con l'enzima T4 DNA ligasi. La reazione di restrizione e quella di ligazione (*dig-lig*) sono state realizzate nella stessa miscela. È stata dunque calcolata la quantità di DNA da utilizzare nella reazione, per ottenere un rapporto inserto:vettore di 3:1.

La miscela di reazione *dig-lig* è la seguente:

<i>pMYB12-pE8-MYB12 in pICSL86900</i>		
	c.i.	volume (μl)
pICSL86900	100 ng/μl	1
pE8_tail_BsaI	12 ng/μl	7.40
pSIMYB12_pE8tail_BsaI	32 ng/μl	0.87
SIMYB12_pE8tail_BsaI	26 ng/μl	1.23
BsaI	20 U/μl	1

T4 Ligase	400 U/ μ l	0.5
Ligase buffer	10X	1.5
BSA	10X	1.5
H2O		0.00
		15

Il clonaggio è stato effettuato secondo le seguenti condizioni: 37°C x 20min, seguiti da 27 cicli a 37°C x 3min e 16°C x 4min, e successivamente da un ciclo a 50°C x 5min e 80°C x 5min. Per trasformare cellule Dh5 α per shock termico sono stati utilizzati 4 μ l di questa miscela di reazione. Le colonie positive sono state prelevate e da esse è stato isolato il nuovo DNA plasmidico, su cui è stato condotto il sequenziamento per verificare la presenza corretta dell'inserto.

2.3.5. Assemblaggio della guida nel vettore accettore pICH47751 di Livello 1

Lo *scaffold* della guida è stato ottenuto a partire dal plasmide pICSL70001, che ne contiene la sequenza. Per assemblare la guida sgRNA è stata quindi effettuata una PCR utilizzando sia il primer Forward specifico (paragrafo 2.2.) sia il primer universale (Reverse) dello *scaffold*, secondo il protocollo indicato per 5X Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB Biolabs). Il prodotto di PCR è stato estratto da gel, quantificato ed utilizzato per il clonaggio nel vettore pICH47751 di Livello 1. Dal momento che il promotore della guida scelto è stato pU6, contenuto in un vettore di Livello 0, la reazione *dig-lig* è stata la seguente:

<i>pU6-sgRNA in pICH47751</i>		
	c.i.	volume (μ l)
Level 1 acceptor pICH47751	100 ng/ μ l	1.00
sgRNA	11 ng/ μ l	1.03
pICSL90001 (pU6)	100 ng/ μ l	0.83
BsaI	20 U/ μ l	1
T4 Ligase	400 U/ μ l	0.5
Ligase buffer	10X	1.5
BSA	10X	1.5
H2O		7.64
		15

Il clonaggio e la successiva trasformazione delle cellule competenti sono stati condotti come descritto nel paragrafo 2.3.4. La corretta sequenza della guida sgRNA è stata verificata mediante sequenziamento.

2.3.6. Assemblaggio NPTII_Cas9_sgRNA_LIR nel vettore accettore pAGM8031 di Livello 2

Con questo assemblaggio sono state assemblate la cassetta che conferisce resistenza alla kanamicina (per la successiva selezione dei trasformanti), la sequenza utile per la sintesi della Cas9, la sequenza della guida e la sequenza LIR (*Long Intergenic Region*), che rappresenta l'origine di replicazione e che farà dunque parte del vettore virale finale. In questo clonaggio, per poter legare il modulo LIR al vettore accettore, è stato opportuno aggiungere un “*EndLinker*”, un piccolo modulo con la sporgenza necessaria all'assemblaggio nel vettore. La reazione *dig-lig* è la seguente:

<i>NPTII_Cas9_sgRNA_LIR_EndLinker in pAGM8031</i>		
	c.i.	volume (μl)
Level 1 acceptor pAGM8031	100 ng/μl	0.56
NPTII (in pICH47732)	145 ng/μl	1.96
Cas9 (in pICH47742)	300 ng/μl	0.95
sgRNA_SIMYB12 (in pICH47751)	460 ng/μl	0.62
LIR (in pICH47761)	100 ng/μl	2.76
EndLinker (in pAGM50900)	120 ng/μl	1.58
BpiI	20 U/μl	1
T4 Ligase	400 U/μl	0.5
Ligase buffer	10X	1.5
BSA	10X	1.5
H2O		2.07
		15

Il clonaggio e la successiva trasformazione delle cellule competenti sono stati condotti come descritto nel paragrafo 2.3.4. Tutte le sequenze sono state verificate mediante sequenziamento.

2.3.7. Assemblaggio RepLIR nel vettore accettore pAGM8081 di Livello 2

Con questo assemblaggio è stata ottenuta la parte finale virale, caratterizzata dalla sequenza RepLIR, che codifica per le replicasi Rep e RepA che mediano la replicazione circolare virale (*rolling circle replication*) (Čermák *et al.*, 2015). Anche in questo caso, è stato inserito un *EndLinker* adatto per la chiusura nel vettore accettore pAGM8081.

La reazione *dig-lig* è la seguente:

RepLIR_endLinker in pAGM8081

	c.i.	volume (μl)
Level M pAGM8081	100 ng/μl	0.46
RepLIR (in pICH47781)	140 ng/μl	1.95
EndLinker (in pICH50927)	100 ng/μl	0.95
BpiI (BbsI)	10 U/μl	1
T4 Ligase	400 U/μl	0.5
Ligase buffer	10X	1.5
BSA	10X	1.5
H2O		7.135
		15

La reazione per il clonaggio e la successiva trasformazione delle cellule competenti, sono stati condotti come descritto nel paragrafo 2.3.4. La sequenza RepLIR è stata verificata mediante sequenziamento.

2.3.8. Assemblaggio finale dei costrutti nel vettore accettore di Livello P

Per l'assemblaggio finale (Fig. 4), è stata dapprima condotta una PCR per aggiungere all'inserto pSIMYB12_pE8_SIMYB12 nuove code BsaI, in modo da ottenere delle sporgenze compatibili con i costrutti di Livello 2. La PCR è stata condotta utilizzando il vettore pICSL86900 contenente l'inserto, e una nuova coppia di primers in modo da creare le sporgenze desiderate:

pMYB12_-738_BsaI_CAGA_FW: tgtggtctcaCAGAGTTCTGAAATCCGATGTCGATAG

MYB12_770_BsaI_TGTG_REV: tgtggtctcaCACAGTTGTTAGATCGGGCACCAAAT.

Il prodotto di PCR è stato estratto da gel, quantificato e sequenziato. Questo inserto con code di BsaI è stato utilizzato nella seguente reazione *dig-lig*:

Final Assembly in pICSL427-Pi (Level P)

	c.i.	volume (μl)
Level P acceptor pICSL4723-Pi	68 ng/μl	1.47
pAGM8031 construct	70 ng/μl	2.20
pSIMYB12_pE8_SIMYB12_BsaI_tailed	17 ng/μl	6.50
pAGM8081 construct	270 ng/μl	0.53
End Linker in pICH79300	200 ng/μl	0.48
BsaI	20 U/μl	1
T4 Ligase	400 U/μl	0.5
Ligase buffer	10X	1.5
BSA	10X	1.5
H2O		0
		15

La reazione è stata utilizzata per il clonaggio e la successiva trasformazione delle cellule competenti Dh5 α . La sequenza dell'intero costrutto è stata verificata per sequenziamento, dopo isolamento del DNA plasmidico dalle colonie risultate positive.

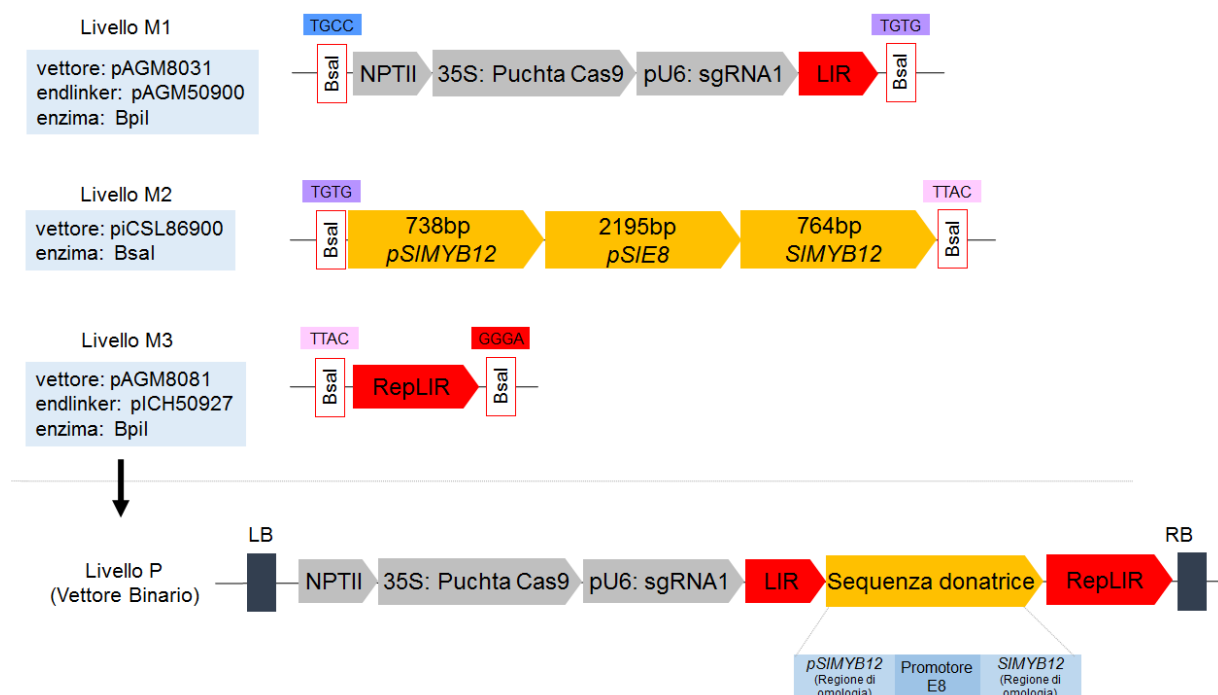


Figura 4. Assemblaggio del costrutto plasmidico per il sistema CRISPR/Cas9.

2.4. Trasformazione mediata da *Agrobacterium rhizogenes*

Semi di pomodoro (cv. Money Maker) sono stati sterilizzati in 70% (v/v) etanolo per 5min e 50% candeggina per 20 min, e lavati per tre volte con acqua sterile. I semi sono stati posti su terreno MS agar 0.8% (Murashige and Skoog) e incubati a 23-25°C (fotoperiodo di 16h luce:8h buio) per 7-10 giorni, fino ad avere i cotiledoni pienamente espansi e le prime foglie vere appena emergenti.

Un'aliquota (50 μ l) di *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC 15834) è stata trasformata per elettroporazione con circa 100 ng del vettore di espressione. Le cellule di agrobatterio sono state inoculate in 800 μ l di TY medium e incubate a 28°C per 2h in agitazione. Le cellule sono state piastrate su terreno TY selettivo, contenente l'opportuno antibiotico (kanamicina). Dopo tre giorni di incubazione, sono state prelevate alcune colonie trasferite in terreno liquido di crescita TY (5-10 ml) contenente l'agente selettivo. Gli inoculi così ottenuti sono stati successivamente utilizzati per una coltura da 100 ml in TY selettivo. La crescita è stata

monitorata mediante OD a 600 nm (valore compreso tra 0.2 e 0.5). La coltura è stata centrifugata a 2700 g per 10 min e risospesa in 40ml di MS liquido, in condizioni di sterilità. La coltura batterica così risospesa è stata utilizzata per trasformare circa 30 cotiledoni di pomodoro, che sono stati tagliati con lama sterile in MS liquido e successivamente immersi nella coltura di agrobatterio per circa 20min. Ciascun cotiledone è stato posto su carta da filtro sterile per rimuovere l'eccesso di terreno e successivamente passato su piastre con terreno MS agarizzato senza selezione, con la pagina inferiore (superficie abassiale) rivolta verso l'alto. La co-coltivazione è stata eseguita al buio per tre giorni in camera di crescita (23-25°C). Successivamente, gli espianti sono stati trasferiti su terreno MS 0.6% contenente Cefotaxime (100 µg/ml) e Kanamicina (100 µg/ml) e incubati per circa 15 giorni al buio. Ogni singola radice sviluppatasi da ogni espianto è stata trasferita su piastra indipendente (MS 0.6% contenente cefotaxime e kanamicina). Le radici ottenute sono state utilizzate per l'estrazione del DNA genomico.

2.5. Selezione su colture di radici aeree

2.5.1. Selezione per la verifica della presenza di Cas9

Questa selezione ha permesso di valutare la percentuale di campioni di radici trasformate, e quindi in cui è presente la sequenza di Cas9.

Per questo screening è stata eseguita una PCR utilizzando il protocollo indicato per Paq5000 Hotstart Master Mix (Applied Biosystem) e la seguente coppia di primers per la sequenza Cas9:

Cas9P_3_FW: GAGGATTACTTCAAGAAAATCGAGT;

Cas9P_4_RV: CGAGCTTTGACTTGAGGGTGATA.

2.5.2. Selezione per la verifica dell'inserzione di *pE8* tra *pSIMYB12* e *SIMYB12*

Questa selezione ha permesso di valutare l'eventuale inserzione del promotore *pE8* tra le sequenze endogene di *pSIMYB12* e *SIMYB12*.

Per questo screening è stata eseguita una PCR utilizzando il protocollo indicato per Platinum Taq (Invitrogen) e i seguenti primers:

A) pSIMYB12_-1035_FW: ACGATGTTGATCGAAAGGGAG

B) 544/SIE8-seq-R1: CGCAAAGTTAAGTGAAGTAACGA

C) 546/SIE8-seq-R2: ACTTGTGGACTAAACCCGAAAAT

D) 545/SIE8-seq-F2: TCGGCCCTTATTCAAAAATAACT

E) 547/SIE8-seq-F3: CAACAACGTTTTGGTTGTTATGA

F) *SIMYB12_1064_RV*: CACACGAACAACAGCTGAGA

Le coppie A-B e A-C sono state utilizzate per amplificare la regione compresa tra il promotore *pSIMYB12* e *pE8*, mentre le coppie F-D e F-E sono state utilizzate per la regione compresa tra *pE8* e *SIMYB12*. I prodotti di PCR sono stati visualizzati su gel di agarosio 1% e analizzati mediante sequenziamento.

RISULTATI

Sezione I.

1.1. Sviluppo di nuove linee di pomodoro ad alto contenuto di polifenoli.

Per lo sviluppo di nuove linee di pomodoro ad alto contenuto di polifenoli è stato programmato un piano di incroci basati su linee di pomodoro pre-esistenti, fornite sia dal laboratorio della Prof.ssa Cathie Martin (John Innes Centre, Norwich, UK) sia dalla dott.ssa Giovanna Giovinazzo (CNR-ISPA Lecce, IT). In particolare, sono state utilizzate:

- Linea E8::*AtMYB12*: queste piante sono caratterizzate da un'espressione frutto-specifica del gene *MYB12* di *Arabidopsis thaliana*, sotto il controllo del promotore E8 di *Solanum lycopersicum* e caratterizzate da un aumento del contenuto di flavonoli nel frutto (Luo *et al.*, 2008);
- Linea E8::*AmDel/Ros1*: queste piante sono caratterizzate dall'espressione frutto-specifica dei geni che codificano per i fattori di trascrizione Delila e Rosea1 che inducono l'accumulo di antocianine sia nella buccia sia nella polpa del frutto (Butelli *et al.*, 2008);
- Linea 35S::*VvStSy*: questa linea è caratterizzata dall'espressione costitutiva del gene che codifica per l'enzima stilbene sintasi di vite (*StSy*), sotto il controllo del promotore 35S; i frutti di queste piante accumulano stilbeni in quantità limitate (Giovinazzo *et al.*, 2005).

Le linee parentali e gli incroci effettuati sono illustrati in Figura 1.

Mediante gli incroci sono state inizialmente generate la linea Indigo (E8::*AtMYB12*-E8::*AmDel/Ros1*) e la linea HighResv (E8::*AtMYB12*-35S::*VvStSy*) (Zhang *et al.*, 2015). La linea Indigo presenta la combinazione dei geni regolatori della via biosintetica dei flavonoidi *AtMYB12*, *AmDel* e *AmRos1*, mentre la linea HighResv presenta la combinazione di un gene regolatore (*AtMYB12*) con un gene strutturale (*VvStSy*) (Figura 1).

Le linee Indigo e HighResv sono state incrociate per ottenere una nuova linea E8::*AtMYB12*-E8::*AmDel/Ros1*-35S::*VvStSy*. Questa nuova linea è stata denominata Bronze, per il colore metallico della buccia del frutto maturo (Figura 1)

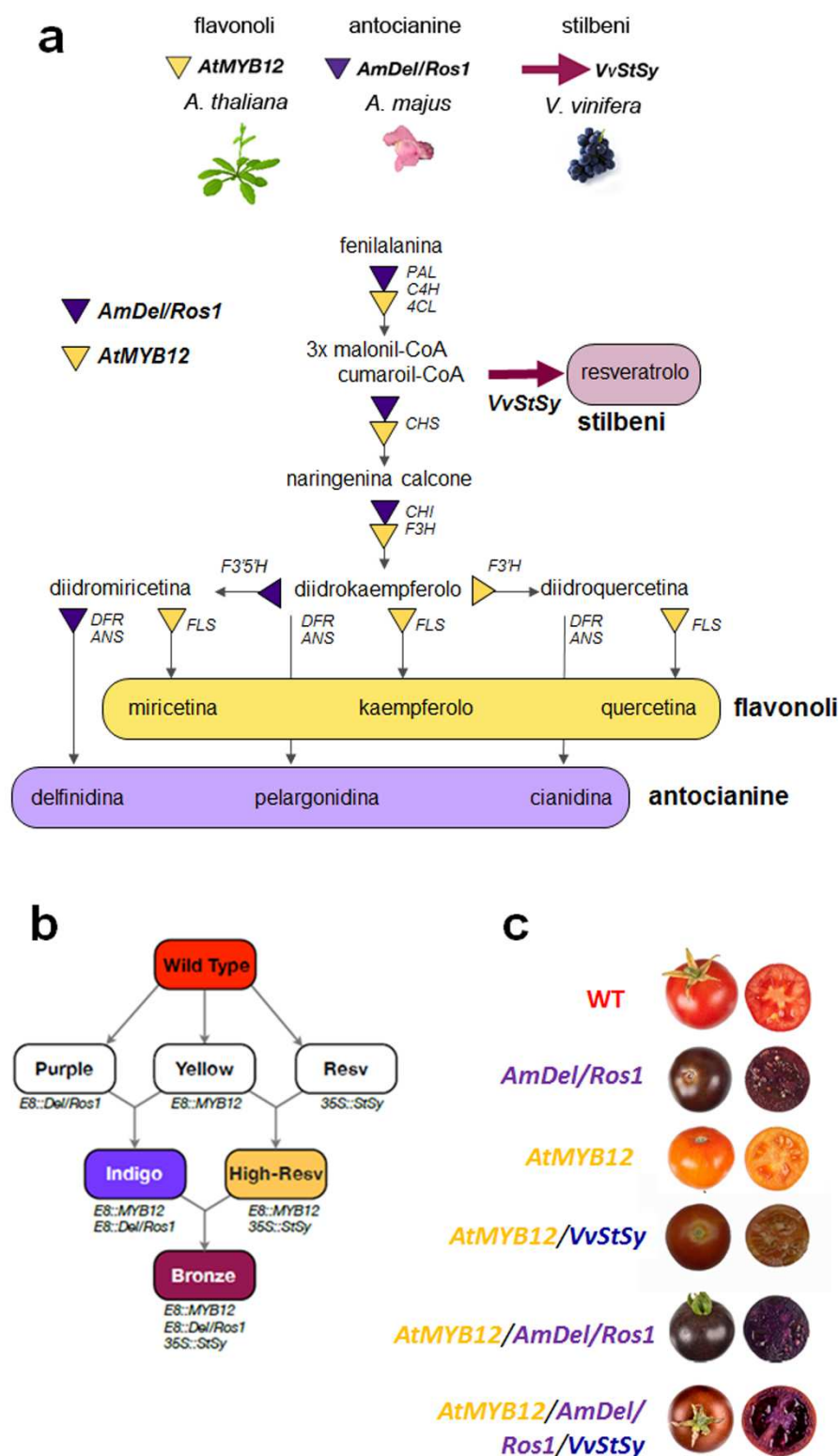


Figura 1. Sviluppo di nuove linee di pomodoro ad alto contenuto di polifenoli. **a)** Rappresentazione schematica dell'azione dei geni regolatori *MYB12* da *Arabidopsis*, *Del/Ros1* da bocca di leone (*Antirrhinum majus*) e del gene strutturale *StSy* di vite sulla via biosintetica dei flavonoidi. **b)** Schema illustrativo del piano di incroci effettuati per ottenere le linee arricchite in polifenoli; **c)** Fenotipo dei frutti di pomodoro maturi delle diverse linee.

1.2. Confronto del profilo metabolico dei frutti di pomodoro delle linee Indigo, HighResv e Bronze

L'analisi metabolica è stata condotta mediante LC/MS su estratti dei frutti interi di pomodoro. L'analisi ha mostrato che i flavonoli sono i polifenoli più abbondanti nella linea Indigo e Bronze. Sebbene non raggiungessero i livelli osservati nei frutti Indigo, il contenuto di flavonoli in Bronze è risultato approssimativamente di 15 volte superiore rispetto al pomodoro wild-type (Figura 2; dettagli in Appendice: Figura A1, Tabella A1). I più abbondanti flavonoli sono i derivati del kaempferolo (circa 10 mg/g peso secco), della quercetina e della miricetina. L'acido clorogenico si conferma essere il principale acido fenolico.

Gli stilbeni sono il secondo gruppo più abbondante di polifenoli presenti nel frutto Bronze. I livelli di resveratrolo e della forma glicosilata (piceide) sono circa 2 volte inferiori della linea parentale HighResv, anche se è stata osservata la presenza di altri stilbeni, variamente glicosilati e metilati (Figura A2, Tabella A2). Ad ogni modo, il contenuto totale di stilbeni è risultato superiore di circa 3 volte rispetto alla linea originale StSy (Giovinazzo *et al.*, 2005).

Le antocianine sono risultate essere il terzo gruppo di polifenoli più abbondante nei frutti Bronze. Il contenuto totale di antocianine è di circa 2,5 mg/g peso secco, inferiore di circa il 50 % rispetto a quello dei frutti Indigo (~4,5 mg/g peso secco), anche se non sono state osservate differenze significative nei rapporti tra le diverse classi di antocianine, che risultano prevalentemente derivate dalla petunidina (Figura 2; dettagli in Appendice: Figura A3, Tabella A3).

1.3. Profilo antiossidante dei nuovi frutti arricchiti con polifenoli

La capacità antiossidante è stata misurata su estratti idrofilici e lipofilici dei frutti, mediante saggi TEAC e ORAC. In Figura 3 (a e c) è illustrato il profilo antiossidante di ciascuna linea di pomodoro, e la relazione lineare tra la capacità antiossidante ed il contenuto totale di polifenoli misurato mediante saggio Folin-Ciocalteu (Figura 3 b e d). Con riferimento alla frazione idrofilica, i frutti della linea Bronze, caratterizzati dalla presenza di flavonoli, antocianine e stilbeni, hanno mostrato un potere antiossidante superiore di circa 7 volte rispetto ai frutti della linea wild-type (cv Money Maker) e superiore anche ai frutti delle linee parentali Indigo e HighResv. Per quanto riguarda la frazione lipofilica, non sono state riscontrate differenze significative tra le varie linee ed in particolare tra la linea Bronze e la linea wild-type. In linea con questi risultati, non sono state rilevate differenze significative nel contenuto totale di carotenoidi tra le diverse linee (Figura 4).

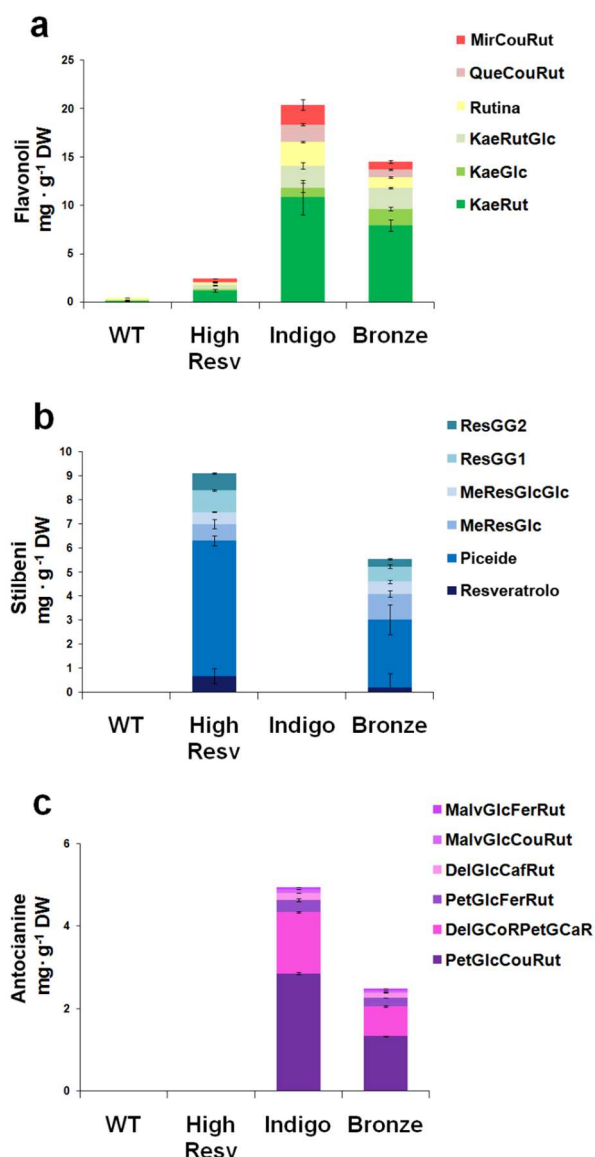


Figura 2. Profilo metabolico delle linee di pomodoro arricchite in polifenoli. Analisi HPLC/MS su estratti di frutti maturi interi per la determinazione del contenuto di flavonoli. I dati sono riportati come media dei valori $\pm$ DS ($n=3$ esperimenti dipendenti) (a), stilbeni (b) e antocianine (c). Abbreviazioni: MirCouRut, miricetina-cumaroil-rutinoside; QueCouRut, quercetina-cumaroil-rutinoside; KaeRut, kaempferolo-rutinoside; KaeGlc, kaempferolo-glucoside; KaeRutGlc, kaempferolo-rutinoside-glucoside; ResGG1, resveratrolo-glucoside isoforma 1; ResGG2, resveratrolo-glucoside isoforma 2; MeResGlc, metil-resveratrolo-glucoside; MeResGlcGlc, metil-resveratrolo-diglucoside; PetGlcCouRut, petunidina-glucoside-cumaroil-rutinoside; PetGlcFerRut, petunidina-glucoside-feruloil-rutinoside; DelGCoRPetGCaR, delfinidina-glucoside-cumaroil-rutinoside; DelGlcCafRut, delfinidin-glucoside-caffeoil-rutinoside; MalGlcCouRut, malvidina-glucoside-cumaroil-rutinoside; MalGlcFerRut, malvidina-glucoside-feruloil-rutinoside. I dettagli dell'analisi metabolica sono illustrati in Appendice (Figure A1, A2, A3; Tabelle A1, A2, A3)

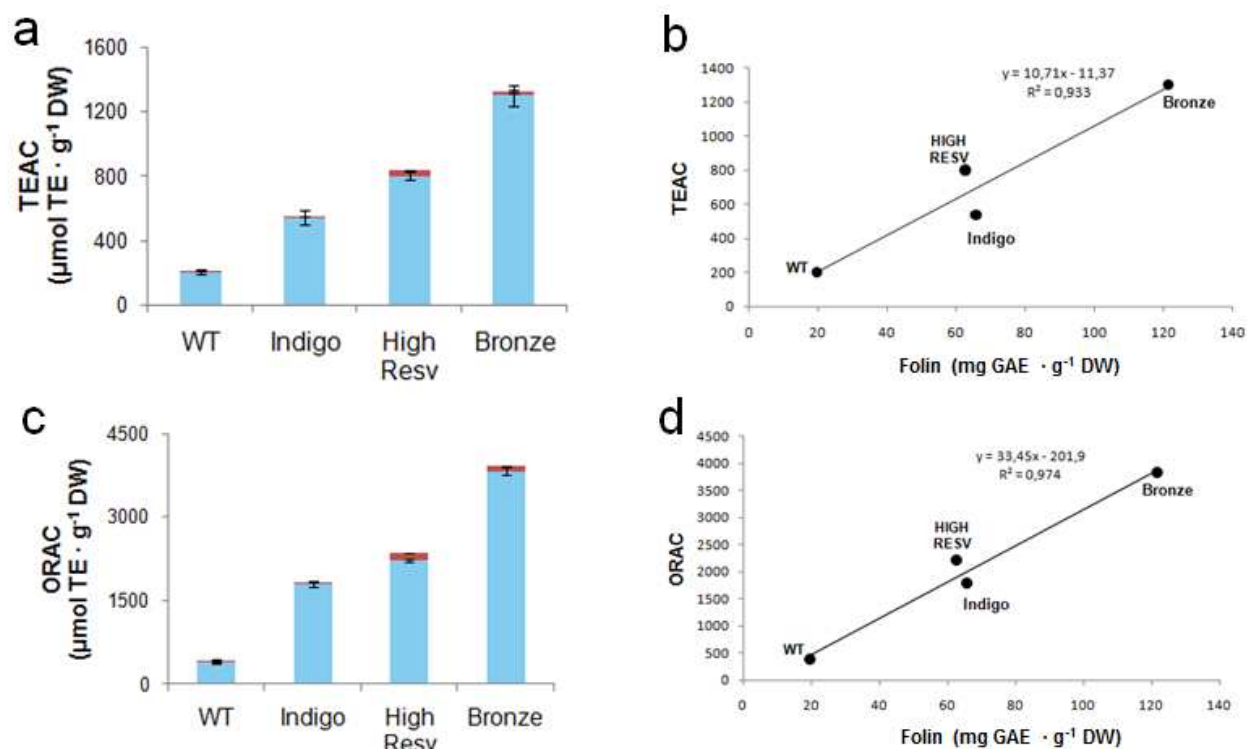


Figura 3. a) e c) Profilo antiossidante della frazione idrofilica (in azzurro) e della frazione idrofobica (in rosso) degli estratti dai frutti di pomodoro arricchiti in polifenoli, determinato mediante saggi TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) e ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), rispettivamente. b) e d) relazioni tra i profili antiossidanti ed il contenuto totale di polifenoli misurato mediante saggio Folin-Ciocalteu. I dati sono riportati come media dei valori $\pm$ DS ($n=3$ esperimenti dipendenti).

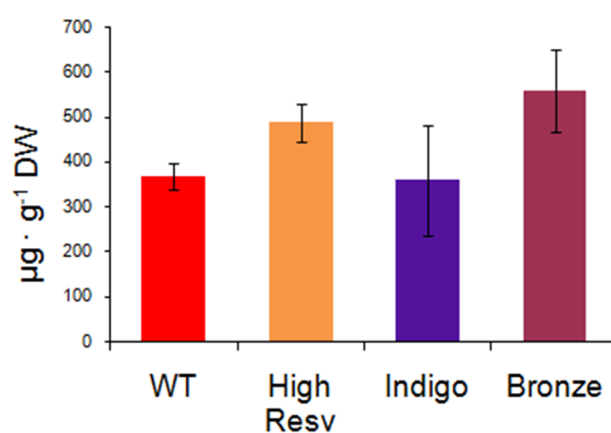


Figura 4. Contenuto totale di carotenoidi determinato mediante analisi HPLC su estratti da frutti interi *wild-type* e delle linee HighResv, Indigo e Bronze. I dati sono espressi come media dei valori $\pm$ DS.

1.4. Effetti delle diete arricchite in polifenoli sul tratto gastrointestinale e sul microbiota del modello C57Bl/6 in assenza di infiammazione

Per valutare gli effetti sullo stato intestinale e sul microbiota di specifiche classi di polifenoli, all'interno di un'unica matrice alimentare, sono state sviluppate diete specifiche a base di mangimi arricchiti con l'1% di polvere di liofilizzato di pomodoro di ciascuna linea (WT, Indigo, High-Resv e Bronze). Queste diete sono state somministrate per un periodo di due settimane ad una linea di topi wild-type C57Bl/6. Il peso ed il generale stato di salute di ogni topo sono stati monitorati 3 volte a settimana, insieme al consumo di mangime e di acqua. Per ogni individuo (5 topi per dieta, $n=5$), sono state raccolte le feci nei giorni 13 e 14 dall'inizio della dieta, e da esse estratto il DNA totale per l'analisi metagenomica del microbiota. Il giorno 14 i topi sono stati sacrificati, i colon sono stati isolati, misurati e ripuliti per le successive analisi. La porzione prossimale al cieco e la porzione distale (porzione rettale) sono state preparate per l'analisi istologica, mentre la regione centrale del colon è stata utilizzata per l'estrazione dell'mRNA e l'analisi del profilo di espressione genica. La Figura 5 mostra a) l'andamento del peso corporeo durante le due settimane di dieta per ogni gruppo, b) la misura dei colon e c) le sezioni istologiche rappresentative per ogni gruppo di dieta. I risultati indicano l'assenza di infiammazione intestinale in tutti i gruppi, alimentati con diete a base di pomodoro o con dieta standard, priva di liofilizzato di pomodoro.

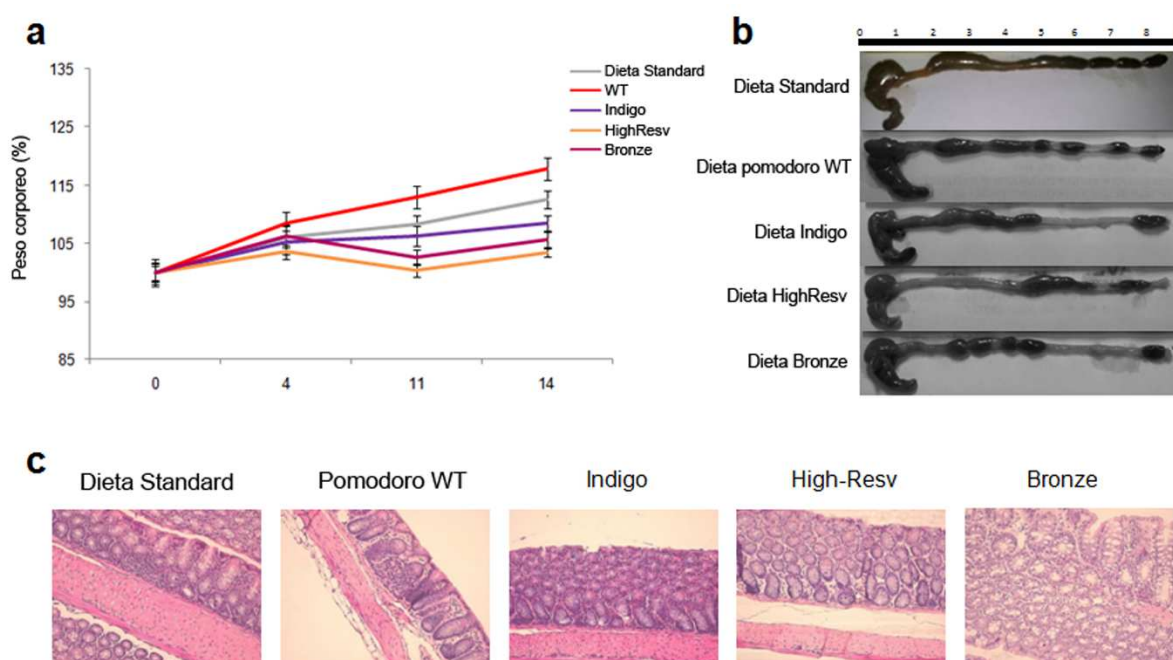


Figura 5. a) Andamento del peso corporeo, b) morfologia di colon rappresentativi dei gruppi di diete, confrontati alla dieta controllo, e c) analisi istologica di sezioni rappresentative di colon in topi alimentati con dieta standard o con diete arricchite con i liofilizzati di pomodoro.

L'analisi di sequenziamento dell'rRNA 16s (454 pyrosequencing) condotto sulle feci ha permesso di quantificare l'abbondanza dei diversi *phyla* e *genera* che compongono il microbiota intestinale e di verificarne l'ecologia, in termini di generale biodiversità e associazioni dei generi all'interno della comunità microbica. La Figura 6a descrive la dominanza dei principali *phyla*, ovvero *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. Quantificando le abbondanze relative, l'analisi metagenomica ha evidenziato un cambiamento consistente sia a livello di *phyla* che a livello di generi (Figura 6 a, b e c). I topi alimentati con diete Bronze e HighResv sono caratterizzati da un significativo aumento del *phylum Bacteroidetes* ed un decremento nei *Firmicutes*. Come conseguenza di ciò, è stato osservato un cambiamento del rapporto *Bacteroidetes:Firmicutes*. Infatti, la ratio è risultata quasi raddoppiata nei topi alimentati con diete HighResv e Bronze (1.739 e 1.793, rispettivamente, $P < 0.05$) rispetto ad una normale dieta (0.861).

Un'analisi più dettagliata a livello di genere ha rivelato un aumento significativo del genere *Parabacteroides* nei gruppi alimentati con diete ad alto contenuto di polifenoli (Indigo, HighResv e Bronze) confrontate ai gruppi alimentati con dieta standard o arricchita con pomodoro wild-type. Il genere dei *Lactobacilli* è risultato significativamente più abbondante

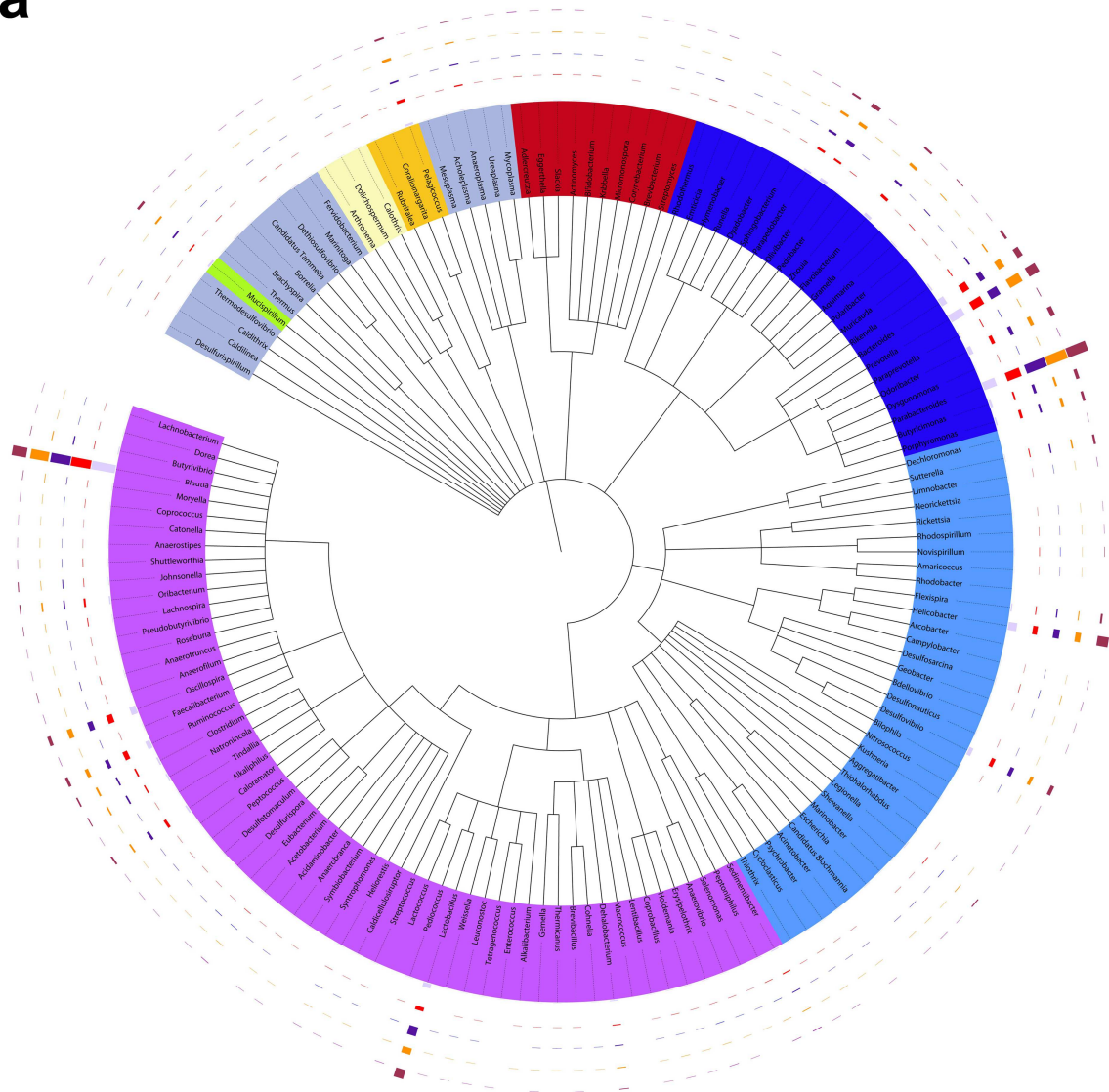
nei gruppi di diete Indigo e Bronze, che si caratterizzano per la presenza di antocianine, assenti negli altri gruppi. Una diminuzione significativa ($P<0.05$) dell'abbondanza dei generi *Blautia* e *Oscillospira* è stata trovata nei gruppi alimentati con diete a base di pomodoro ed in particolare nel gruppo con dieta Bronze. Non sono state osservate, invece, differenze significative nei generi *Clostridium* e *Prevotella* tra i vari gruppi, con solo un leggero aumento nei gruppi con dieta HighResv.

Per analizzare l'effetto della dieta sulle interazioni tra i vari componenti delle comunità microbiche, è stata condotta un'analisi di correlazione di Pearson, tra i 30 generi più abbondanti trovati in tutti i gruppi di diete. I risultati hanno evidenziato cambiamenti significativi nella co-presenza di questi generi tra i diversi gruppi di topi. Per esempio, nelle diete standard, Indigo e High-Resv, i *Lactobacilli* correlano positivamente con i *Clostridium*, ma negativamente con i *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Blautia* e *Prevotella*. Nel caso della dieta Bronze, i *Lactobacilli* correlano positivamente con *Parabacteroides* e *Prevotella*, e negativamente con i *Clostridium*, *Bacteroides*, *Oscillospira* e *Blautia* (Figura 7).

Per valutare se alcuni generi possano essere in maniera specifica associati alle diverse classi di polifenoli contenuti nella dieta, è stata condotta un'ulteriore analisi di correlazione. La Figura 8 mostra che i *Parabacteroides* correlano positivamente con flavonoli, antociani e stilbeni. Il genere *Clostridium* presenta una correlazione positiva con gli stilbeni, mentre i *Lactobacilli* mostrano una correlazione positiva significativa con flavonoli e antocianine. Invece, i generi *Prevotella* e *Bacteroides* correlano negativamente con tutte le classi di composti.

Nel complesso, questi dati indicano che l'arricchimento della dieta con varie classi di polifenoli è in grado di promuovere un cambiamento del microbiota in termini di composizione, favorendo la crescita di diversi generi ed un cambiamento nelle associazioni tra le comunità microbiche intestinali.

a



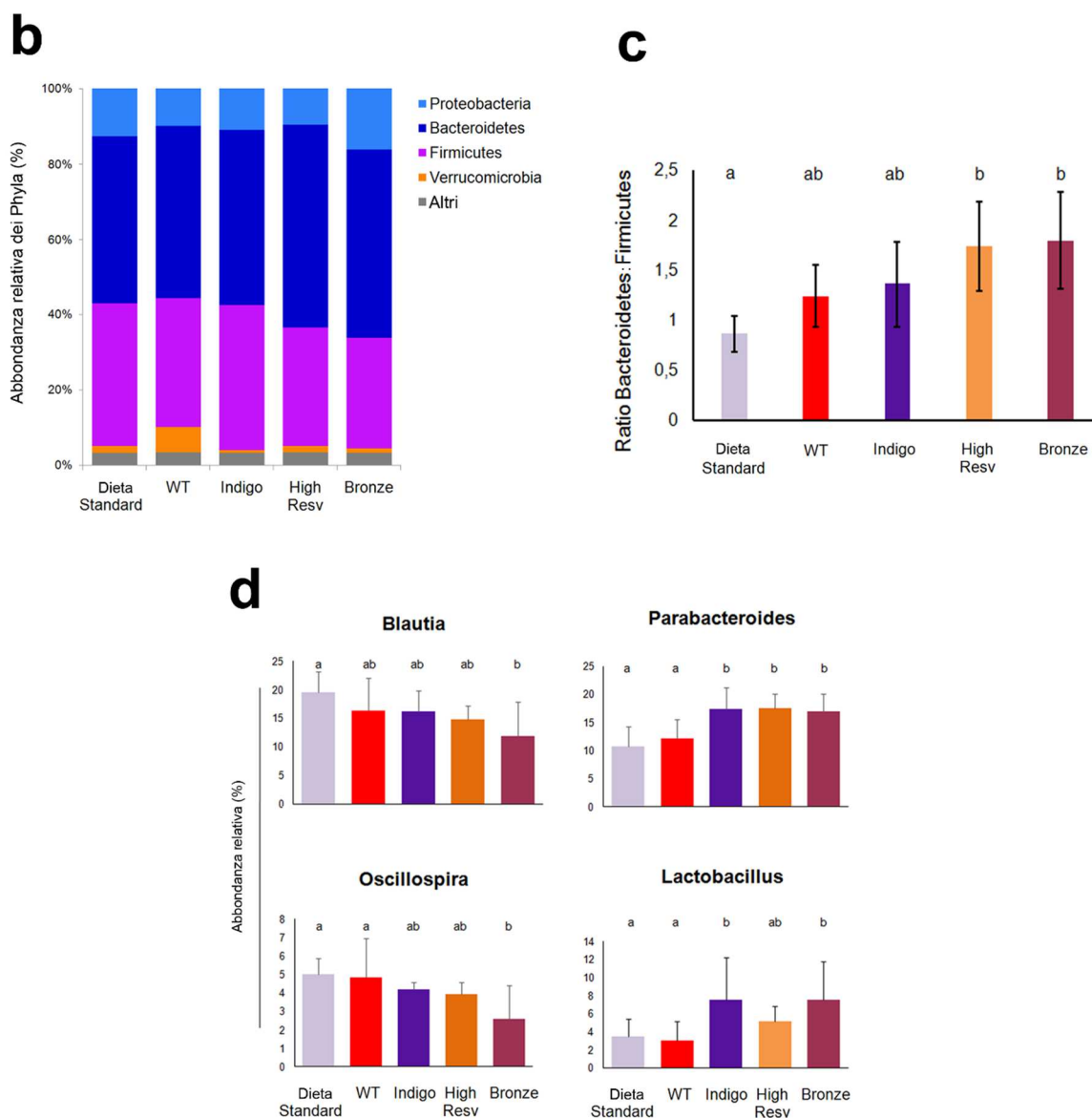


Figura 6. Effetti delle diete arricchite in polifenoli sul microbiota intestinale in topi C57Bl/6. **a)** Rappresentazione circolare dell'albero filogenetico dei principali generi del microbiota intestinale mediante analisi meta-genomica. Le bande più interne indicano i generi colorati per *phylum* di appartenenza. I tratti circolari esterni mostrano un diagramma multi-barre, che indica le abbondanze relative per ciascun genere nelle diverse condizioni di dieta. **b)** Analisi delle abbondanze relative dei principali *phyla* rilevati nel microbiota intestinale. **c)** Rapporto *Bacteroidetes:Firmicutes* indicativo dello stato di salute intestinale, calcolato per ogni gruppo di dieta; differenti lettere indicano differenze di significatività, calcolate mediante Duncan's multiple-range test, con limite di significatività di 0.05. **d)** Abbondanze relative dei generi del microbiota intestinale con differenze significative tra i vari gruppi di dieta; differenti lettere indicano differenti valori di significatività (Duncan's multiple-range test).

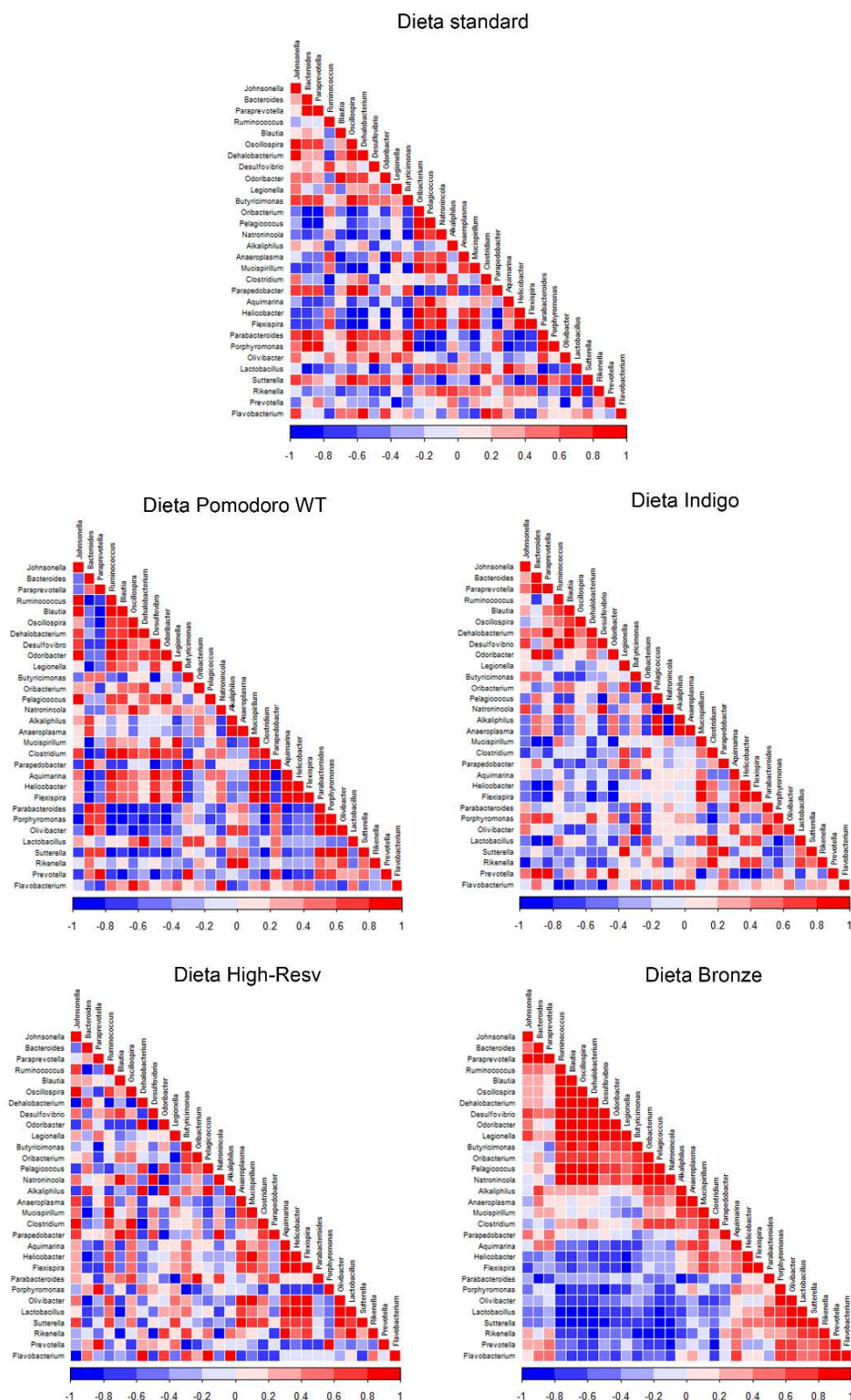


Figura 7. Co-associazioni tra i generi più abbondanti nel microbiota intestinale di topi alimentati con diete arricchite con pomodori ad alto contenuto di polifenoli. I diagrammi mostrano le correlazioni di Pearson tra i generi, a seconda del tipo di dieta, e visualizzate in scala cromatica dal blu (-1, correlazioni negative) al rosso (1, correlazioni positive).

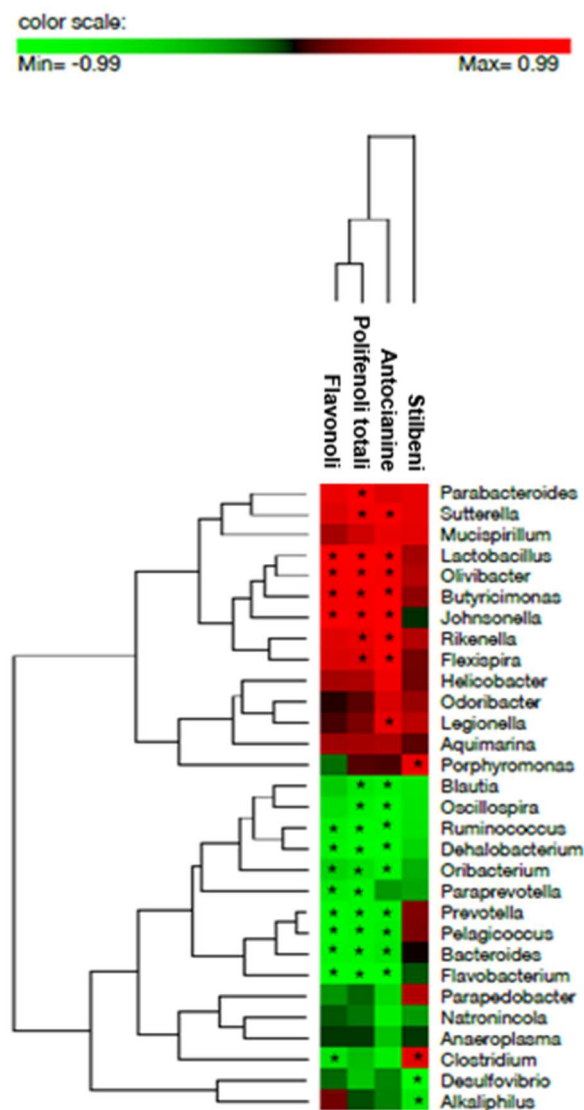


Figura 8. Analisi di correlazione tra i polifenoli della dieta e i generi del microbiota. Nel diagramma è illustrato il confronto del grado di associazione nell'intervallo compreso tra -0.99 (correlazione negativa indicata in verde) e 0.99 (correlazione positiva indicata in rosso). Il *clustering* gerarchico è basato sulla distanza Euclidea e sul metodo di Ward (Murtagh & Legendre, 2014). Gli asterischi indicano le correlazioni significative dopo correzione del p-value (FDR>0.05).

Dati in letteratura hanno messo in evidenza la capacità dei polifenoli di determinare cambiamenti nell'espressione genica delle cellule del tratto gastro-intestinale dell'ospite (Cardona *et al.*, 2013; Cavalcanti *et al.*, 2014; Delvecchio *et al.*, 2015; De Santis *et al.*, 2015). Per verificare questa ipotesi anche in presenza di diete a base di frutti di pomodoro arricchiti in polifenoli, sono stati analizzati i profili di espressione di un set di geni correlati all'infiammazione, all'immunità e al metabolismo del colon dell'ospite (Figura 9). A tal fine, i colon sono stati prelevati dopo due settimane di dieta arricchita in polifenoli, ed utilizzati per l'analisi di espressione genica in piastre q-PCR Real time.

Riguardo all'espressione di geni coinvolti in vie infiammatorie, non sono stati evidenziati cambiamenti significativi associati alle diete. Tuttavia, tra i geni coinvolti nella risposta immunitaria, il gene *Il1rn*, che codifica un recettore per l'interleuchina IL1R e che modula l'attività delle citochine pro-infiammatorie IL1 α e β (Dinarelli *et al.*, 1994), è sovra-espresso nelle diete “Bronze” e “High-Resv”, suggerendo che l'aumento dei livelli di espressione può essere correlato alla presenza di stilbeni. Inoltre, con la dieta “Bronze” è stata osservata una riduzione dell'espressione di *SOCS3*, regolatore positivo della segnalazione delle citochine (Carow & Rottemberg, 2014), *Muc1*, la cui sovra-espressione è associata ad IBD (Andoh *et al.*, 2009) e *S100a8*, ritenuto un *marker* clinico di IBD (Fang *et al.*, 2015).

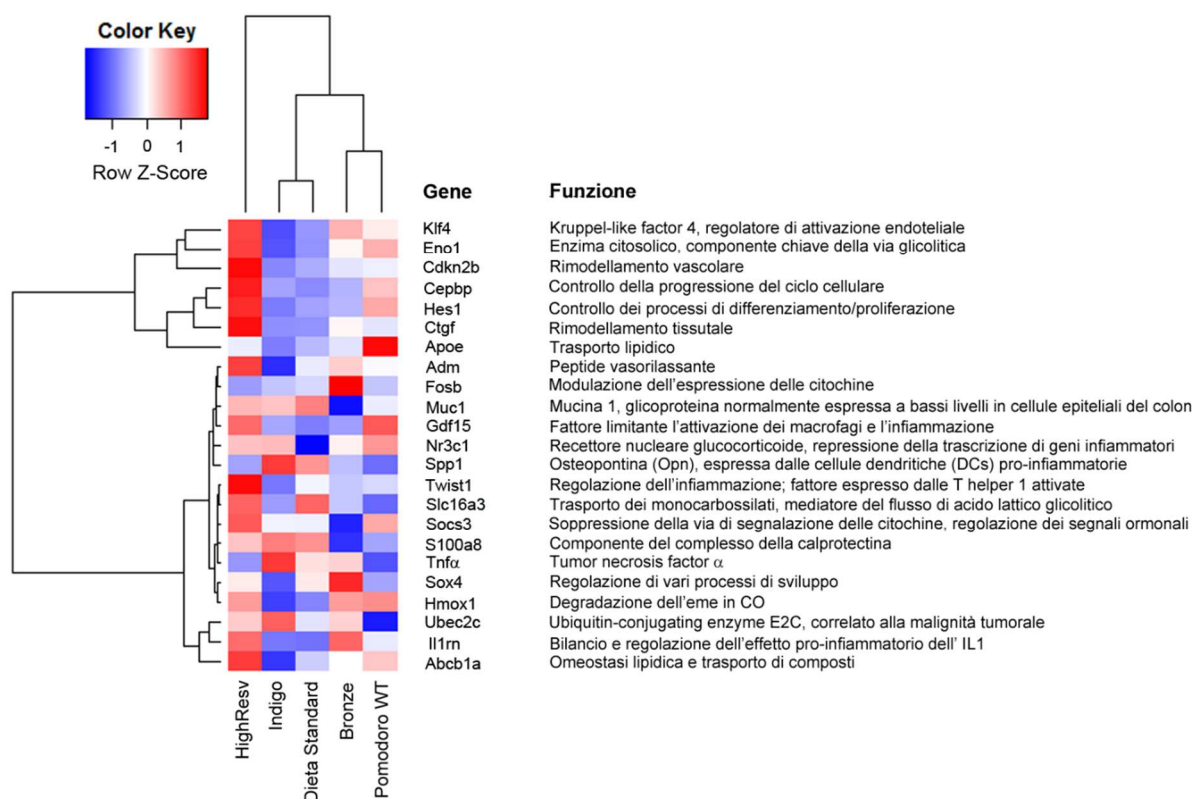


Figura 9. Profilo di espressione dei geni coinvolti nella vie di infiammazione, nell'immunità e nel metabolismo dell'ospite. L'analisi di espressione è stata condotta in real-time qPCR su RNA estratto da colon di topi alimentati con le differenti diete. Il diagramma rappresenta la comparazione dell'espressione genica tra i gruppi di diete (valori medi di $n=3$ esperimenti indipendenti), schematizzata come *clustering* gerarchico, basato su distanza Euclidea e sul metodo di Ward (Murtagh & Legendre, 2014), ottenuto in R. I valori, calcolati come *fold change* e convertiti in espressione scalare, denotata come Row Z-Score, sono visualizzati in scala cromatica dal blu, indicando ridotta espressione, al rosso, indicando alta espressione.

1.5. Effetti delle diete arricchite in polifenoli sull'infiammazione cronica intestinale indotta da DSS

Gli effetti delle diete arricchite in polifenoli sono stati successivamente valutati su un modello di infiammazione intestinale, consistente nella somministrazione di DSS (sodio destrano solfato) all'1% in acqua da bere, a topi della linea C57Bl/6, per un periodo di due settimane. La somministrazione del DSS è comunemente utilizzata per l'induzione dell'infiammazione acuta intestinale, generalmente alla concentrazione del 2% (Perše & Cerar, 2012). Tuttavia, la somministrazione al 2% nelle nostre condizioni sperimentali ha dato luogo alla perdita repentina di circa il 30% del peso corporeo nel periodo di una sola settimana, un'induzione troppo aggressiva per valutare i benefici degli interventi nutrizionali oggetto di studio. Pertanto è stata utilizzata una concentrazione inferiore (1%) per ottenere un'infiammazione prolungata e moderata, che può mimare la condizione della colite ulcerosa in una fase non acuta della patologia. L'andamento del peso corporeo, il sanguinamento rettale e le condizioni di salute generale degli animali sono state monitorate giornalmente per ciascun topo ($n=5$). I risultati illustrati in Figura 10 (a e c), indicano che sebbene il peso corporeo non presenti drastici cambiamenti nel corso del trattamento, la somministrazione di DSS all'1% è stata sufficiente per indurre differenze significative nell'indice di attività infiammatoria (*disease activity index*, DAI), definito come presenza di sangue nelle feci, consistenza delle stesche e perdita di peso. Come evidenziato in Figura 10 c, la dieta a base “Bronze” è stata l'unica in grado di ridurre significativamente l'indice di attività infiammatoria, mentre per le altre i risultati erano simili all'indice calcolato per la dieta standard. Dopo due settimane di trattamento, tutti gli animali sono stati sacrificati ed i colon sono stati espunti e misurati. In primo luogo, dal punto di vista macroscopico, la riduzione della lunghezza del colon è un parametro comunemente considerato come segno di infiammazione. Tra i topi trattati con DSS, la lunghezza del colon del gruppo alimentato con dieta “Bronze” è risultata paragonabile alla lunghezza misurata in animali che non hanno ricevuto DSS e maggiore di tutti gli altri gruppi sperimentali (Figura 10 b). Inoltre, nel gruppo “Bronze” la consistenza delle feci è risultata incrementata ed il sanguinamento intraluminale ridotto. L'analisi istologica ha confermato le osservazioni macroscopiche: diverse lesioni focali sono state osservate in tutti i gruppi, ma l'infiltrazione di cellule infiammatorie e la presenza di edemi sono meno evidenti nel gruppo “Bronze”. Le analisi morfologiche suggeriscono che la dieta “Bronze” non protegge completamente dall'infiammazione, ma nonostante questo il danno è risultato ridotto ed in uno stadio iniziale rispetto agli altri gruppi di diete (Figura 10 b e c). Per valutare ulteriormente il ruolo della

risposta immunitaria, è stata analizzata la produzione intracellulare di citochine, che definisce quali gruppi di linfociti (cellule T) di tipo regolatorio (T reg) oppure di tipo “helper” (T h), sono presenti all’interno di popolazioni cellulari isolate dai linfonodi mesenterici. I risultati hanno mostrato una ridotta percentuale di cellule pro-infiammatorie Th1 (IFN γ ⁺) e Th17 (IL-17⁺) nei topi alimentati con dieta “Bronze”, rispetto agli altri gruppi. Non è stata invece osservata alcuna differenza per le cellule T reg (Foxp3⁺) (Figura 10 d). Nel complesso, questi dati suggeriscono che la dieta arricchita con pomodori della linea “Bronze” è in grado di attenuare l’effetto infiammatorio a livello intestinale, rinforzando la risposta antinfiammatoria della mucosa intestinale.

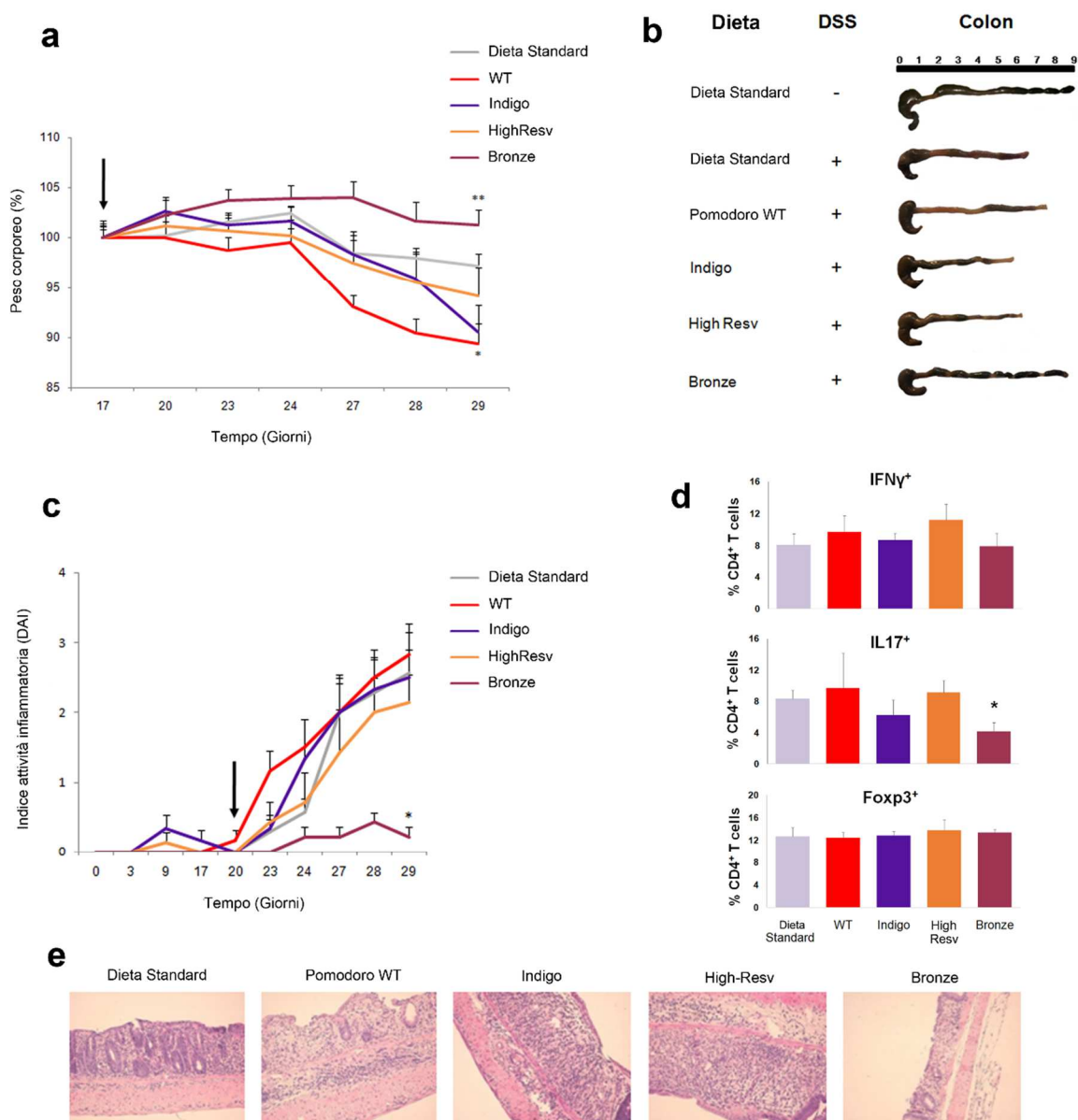


Figura 10. **a)** Andamento del peso corporeo durante il trattamento con DSS, contestuale alla somministrazione delle differenti diete. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, t Student's test. **b)** Morfologia di colon rappresentativi dei differenti gruppi. **c)** Indice di attività infiammatoria (DAI) per ogni gruppo, calcolato mediante score infiammatorio (Cavalcanti *et al.*, 2014), considerando la perdita del peso corporeo, sanguinamenti intraluminali, consistenza e caratteristiche fecali. **d)** Analisi citofluorimetrica sulle popolazioni linfocitarie dei linfonodi mesenterici, distinguibili per le marcature intracellulari in cellule T helper 1 (Th1, IFN γ ⁺) e 17 (Th17, IL-17⁺) e cellule T regolatorie (Treg, Foxp3⁺). **e)** Analisi istologica di sezioni rappresentative di colon di topi trattati con DSS e alimentati con dieta standard o con diete arricchite con i liofilizzati di pomodoro.

Sezione II.

2.1. Sviluppo del costrutto plasmidico per il sistema CRISPR/Cas9

Il sistema CRISPR/Cas9 costituisce un nuovo approccio di gene editing, utile per lo sviluppo di nuove varietà vegetali. In questo contesto, un primo passo per l'utilizzo di questa nuova strategia è stato testare l'efficienza del sistema CRISPR/Cas9 in pomodoro.

Nel presente lavoro, le attività del CRISPR/Cas9 sono state progettate per il gene *MYB12* di pomodoro, gene regolatore chiave della via biosintetica dei flavonoidi, e di conseguenza utile per l'induzione della sintesi di polifenoli con valenza salutistica. Per questo scopo, è stato sviluppato un costrutto plasmidico utilizzando il clonaggio Golden Gate (i dettagli sono descritti in Materiali e Metodi).

La sequenza Cas9 di Puchta, sotto il controllo del promotore 35S, la guida sgRNA sotto il controllo del promotore U6 di *Arabidopsis* e la sequenza donatrice per l'evento GT (*gene targeting*) sono state clonate all'interno del vettore finale binario, utilizzato successivamente per il saggio di trasformazione transiente.

2.2. Saggio di trasformazione transiente e selezione delle radici aeree

Per valutare la frequenza di trasformazione con il costrutto ottenuto e verificare l'efficienza di trasformazione, in via preliminare è stato scelto il saggio delle colture di radici aeree di pomodoro, poichè è un sistema di facile studio della trasformazione (Ron *et al.*, 2015).

Le colture di radici aeree sono state co-coltivate con un ceppo di *Agrobacterium rhizogenes*, contenente il vettore di espressione. Ciascuna radice sviluppata dopo trattamento con *A. rhizogenes* è stata prelevata e trasferita su terreno selettivo. Dalle radici espanse è stato estratto il DNA genomico, che è stato analizzato per verificare l'avvenuta trasformazione mediante analisi molecolare.

Una prima analisi PCR è stata eseguita per verificare la reale trasformazione delle radici, e dunque la presenza della sequenza *Cas9*. I risultati hanno mostrato il 95% di frequenza di trasformazione. Successivamente, è stata condotta una seconda analisi PCR per verificare l'avvenuta inserzione del promotore E8 nella regione guida della Cas9. A tale scopo, sono stati utilizzati primers disegnati al di fuori della regione di omologia, sia del promotore *pSIMYB12* che del gene *SIMYB12* (Figura 12) e primers interni al promotore E8 (*pSIE8*). Le amplificazioni

con i primers A-C e D-F, illustrati in Figura 12, hanno dato, però, prodotti aspecifici, che non hanno permesso di distinguere nettamente l'avvenuta inserzione del promotore E8.

È stata quindi condotta un'ulteriore analisi PCR utilizzando i primers A-B e E-F, per ottenere ampliconi di più basso peso molecolare. Su 60 campioni testati, un campione è risultato positivo dopo amplificazione della regione *pSIE8_SIMYB12* (Figura 13). Il sequenziamento della regione *pE8_SIMYB12* ha confermato l'inserzione della parte terminale del promotore in corrispondenza del sito target (Figura 13). Lo stesso campione è risultato positivo anche dopo amplificazione della regione *pSIMYB12_pSIE8*. Ulteriori indagini sono, tuttavia, in corso per confermare questo dato.

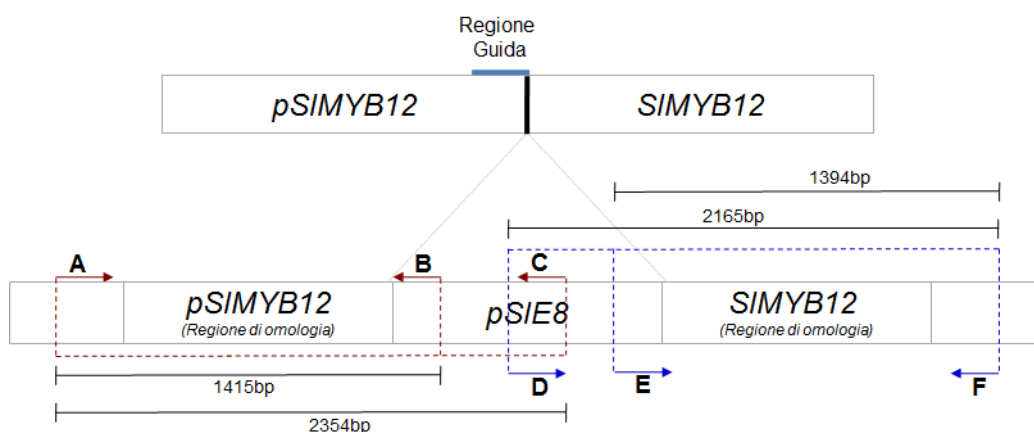


Figura 12. Schema di PCR condotte per l'analisi di eventi avvenuti a livello della regione target della Cas9.

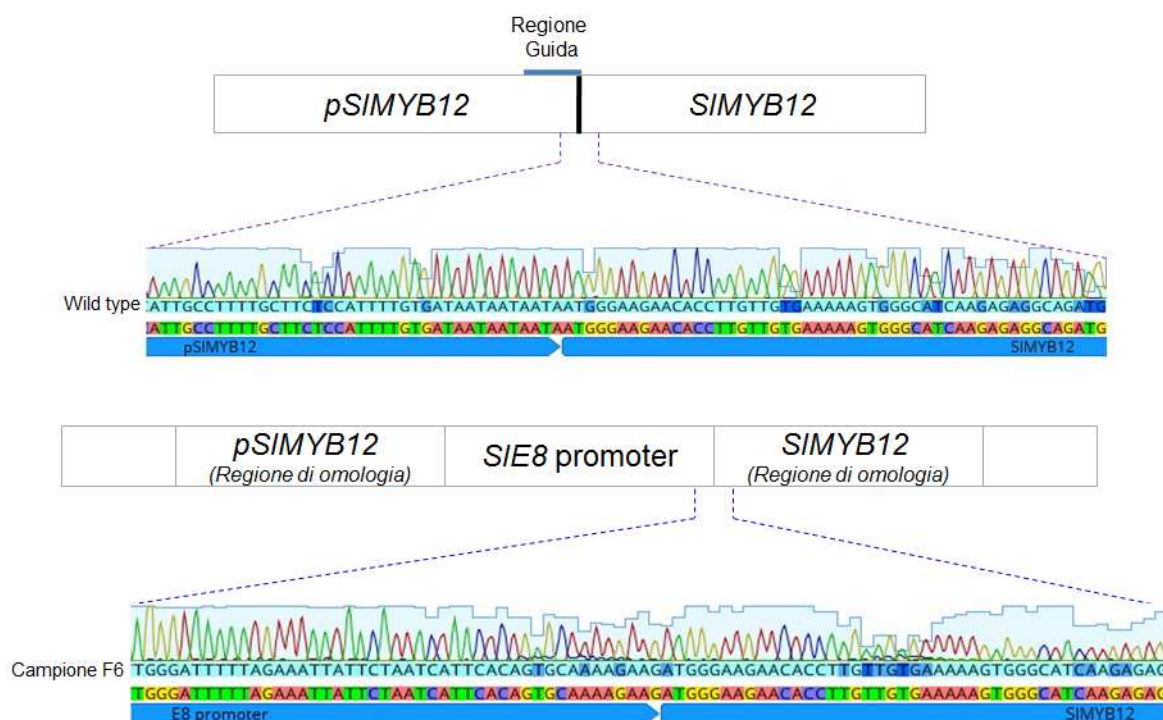


Figura 13. Sequenziamento della regione target nel campione controllo wild-type, che non presenta inserzione, e nel campione F6, in cui è mostrata l'inserzione della parte terminale del promotore E8.

DISCUSSIONE

Sezione I.

Il presente lavoro costituisce uno studio multidisciplinare che ha avuto l'obiettivo di verificare il possibile utilizzo dell'ingegneria metabolica per il miglioramento delle qualità nutrizionali del pomodoro. Lo sviluppo di nuove linee di pomodoro ad alto contenuto di polifenoli mediante incrocio tra linee preesistenti, ha rappresentato un approccio utile per lo studio degli effetti di diverse classi di polifenoli nel contesto di un'unica matrice alimentare.

Inizialmente, l'attività sperimentale condotta sul modello murino è stata finalizzata ad evidenziare possibili problematiche relative all'introduzione nella dieta di queste nuove linee di pomodoro. Esperimenti ripetuti hanno confermato che non si riscontrano differenze significative tra i topi alimentati con pomodori delle linee ottenute mediante ingegneria metabolica ed il pomodoro controllo o la dieta standard, in termini di peso, indice di infiammazione intestinale, analisi della morfologia dei colon ed espressione di geni pro-infiammatori. L'insieme di questi risultati confermano che il consumo di tali pomodori non è tossico per il modello sperimentale adottato in questo lavoro.

Successivamente, sono stati studiati gli effetti delle diverse diete sul microbiota intestinale. Non è risultata di semplice interpretazione la valutazione dei livelli di protezione dall'infiammazione intestinale, mediata da cambiamenti indotti dalla dieta sulla composizione del microbiota intestinale e sulla risposta dell'ospite. Infatti, le diete arricchite in flavonoli e antocianine (Indigo) o stilbeni (HighResv) non hanno prodotto gli stessi risultati della dieta Bronze, inducendo la stessa riduzione dei sintomi dell'infiammazione, nel nostro modello di infiammazione intestinale (Figura 10). L'analisi comparativa delle diverse diete suggerisce che gli stilbeni possono interagire in sinergia con le antocianine ed in parte anche con i flavonoli. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nell'abilità delle antocianine e dei flavonoidi di contrastare/modulare le proprietà talvolta pro-ossidative degli stilbeni quando presenti in alte dosi (de la Lastra & Villegas, 2007). Infatti, in questo studio la dieta HighResv, che fornisce un apporto totale giornaliero di stilbeni superiore alla dieta Bronze, con assenza di antocianine ed un basso apporto di flavonoli, non ha portato ad alcun segno di riduzione dell'infiammazione intestinale. Inoltre, l'analisi di espressione genica ha evidenziato la sovra-espressione di alcuni geni pro-infiammatori nel caso della dieta con pomodoro HighResv.

Tuttavia, gli stilbeni sembrano svolgere un importante ruolo nell'incremento osservato nei *Bacteroidetes* del microbiota intestinale, che in parallelo si riflette nell'aumento del rapporto *Bacteroidetes:Firmicutes* (Figura 6). L'aumento di questo rapporto è stato precedentemente riportato anche in casi di diete ad alto contenuto di grassi arricchite con mirtilli rossi (Heyman-Lindén *et al.*, 2016) o con altri polifenoli (Ettxeberria *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2015). Nonostante l'effetto del rapporto *Bacteroidetes/Firmicutes* nelle patologie umane sia ancora oggetto di controversie (Duncan *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2013; Marchesi *et al.*, 2016), probabilmente per l'alta variabilità inter-individuale tra i gruppi di pazienti, l'aumento di questa *ratio* può essere considerato un indice di buono stato di salute intestinale, dal momento che la sua riduzione è generalmente associata a condizioni patologiche, come l'obesità (Ley *et al.*, 2005; Guinane *et al.*, 2013; Ettxeberria *et al.*, 2015; Kasai *et al.*, 2015).

In questo studio, sia le antocianine che gli stilbeni hanno incrementato i livelli di *Parabacteroides*, sebbene la mancanza di effetti aggiuntivi nella dieta Bronze suggerisca che entrambi i tipi di polifenoli influenzano la composizione di questo genere mediante lo stesso meccanismo. Un aumento significativo del genere *Parabacteroides* è stato riportato dopo somministrazione di mirtilli rossi in un modello murino (Heydman-Lindén *et al.*, 2016) e di quercetina in un modello di ratto (Ettxeberria *et al.*, 2015). Nello stesso studio, in presenza di resveratrolo non sono stati evidenziati cambiamenti significativi.

Le antocianine e gli stilbeni contenuti nelle diete, hanno effetti negativi sui livelli di *Blautia* e *Oscillospira* nel microbiota, con effetti più marcati nella dieta Bronze, suggerendo che diversi polifenoli influenzano questi generi microbici mediante meccanismi differenti. Una riduzione del genere *Oscillospira* è stata riportata dopo somministrazione di polifenoli (Heydman-Lindén *et al.*, 2016). È da considerare che un aumento di *Oscillospira* è stato osservato in topi diabetici (Kryck *et al.*, 2016); inoltre, *Blautia* spp. sono risultate aumentate in pazienti affetti da sindromi del colon irritabile (IBS) (Rajilić-Stojanović *et al.*, 2016). Infine, un incremento in *Blautia hydrogenotrophica* è stato osservato in pazienti obesi (Kasai *et al.*, 2015).

L'analisi di correlazione condotta in questo studio indica che il genere *Clostridium* correla negativamente con flavonoli e antocianine e positivamente con gli stilbeni. Riguardo a questo genere, precedenti studi mostrano una riduzione di molti gruppi di tipo clostridiale dopo somministrazione di polifenoli (Queipo-Ortuño *et al.*, 2012; Ettxeberria *et al.*, 2015), mentre un aumento di *Clostridium* sp.XB90 è stato riportato dopo aggiunta di *trans*-resveratrolo nella dieta (Ettxeberria *et al.*, 2015).

Nel presente studio, un dato interessante è rappresentato dalla correlazione positiva dei *Lactobacilli* con tutte le classi di polifenoli. Un simile risultato è stato già riportato in precedenti studi, dopo somministrazione di antocianine (Hidalgo *et al.*, 2012; Faria *et al.*, 2014) e polifenoli (Dolara *et al.*, 2005; Etcheberria *et al.*, 2015). I *Lactobacilli* sono considerati un gruppo probiotico che promuove la salute intestinale, con effetti antimicrobici e capacità di competizione con altre comunità microbiche non benefiche (Faria *et al.*, 2014).

Nel complesso, questi dati mettono in luce come in un periodo di tempo relativamente breve (2 settimane) il consumo di una dieta arricchita in polifenoli possa ri-organizzare e modellare il microbiota intestinale in questo modello sperimentale murino.

Il rimodellamento della composizione del microbiota intestinale, con un incremento dei probiotici *Lactobacilli*, può spiegare almeno in parte l'attenuazione dei sintomi dell'infiammazione associati alla somministrazione di DSS nel modello IBD utilizzato. Tra i meccanismi proposti, i probiotici potrebbero agire modulando l'immunità del tratto gastrointestinale e agendo sulle vie di segnale che regolano l'infiammazione (Verna & Lucak, 2010). Infatti, alcune specie di *Lactobacillus* sono capaci di prevenire l'insorgenza e ridurre la severità della colite in topi IL-10 *knockout* (Jonker *et al.*, 2003) oppure di modulare le cellule Th17 (Li *et al.*, 2016) o le cellule dendritiche che attenuano la produzione di IFN γ da parte di cellule T (Sheil *et al.*, 2007; Hart *et al.*, 2004). La riduzione delle cellule T che producono IL17 e IFN γ osservata nei topi alimentati con dieta Bronze ed una generale attenuazione dei sintomi macroscopici (DAI, Figura 10c) e microscopici (analisi istologica, Figura 10) sono in linea con queste osservazioni.

Oltre all'impatto sul microbiota intestinale, i risultati ottenuti in questo studio mostrano anche un cambiamento nella risposta dell'ospite in presenza di diete arricchite con specifiche classi di polifenoli. I risultati presentati in Figura 9 indicano, per esempio, modificazioni dell'espressione genica dell'ospite già prima del trattamento con DSS. In particolare, la dieta arricchita con Bronze è in grado di modificare l'espressione di un set di geni, coinvolti nel processo infiammatorio (*Muc1*, *S100A8*, *SOC3*), re-direzionando la risposta dell'ospite verso uno status di tipo anti-infiammatorio, che contribuisce a fronteggiare meglio i successivi insulti infiammatori. La modulazione della risposta immunitaria e le attività anti-infiammatorie esercitate dai polifenoli sono state precedentemente riportate (Cavalcanti *et al.*, 2013; De Santis *et al.*, 2016; Galleggiante *et al.*, 2017). Dosi basse di resveratrolo hanno un effetto positivo nella riduzione dell'infiammazione intestinale in modelli di colite indotta da DSS di topo e ratto (Larrosa *et al.*, 2009; Sánchez-Fidalgo *et al.*, 2010). Anche la somministrazioni di diete a base

di mirtilli o lamponi (Piberger *et al.*, 2011; Montrose *et al.*, 2011), ricche in antocianine, hanno mostrato un potente effetto anti-infiammatorio.

La dieta Bronze risulta dunque essere efficace nel ridurre i sintomi di infiammazione intestinale per la specifica combinazione di flavonoli, antocianine e stilbeni.

Tra le diverse linee di pomodoro finora ottenute nel corso della collaborazione tra il CNR-ISPA ed il John Innes Centre, la linea “Bronze” è un ottimo esempio di co-produzione di polifenoli di natura diversa nello stesso frutto, che risulta migliorato nella capacità antiossidante e antinfiammatoria. Nella dieta proposta in questo studio (1% di pomodoro liofilizzato), il pomodoro Bronze fornisce un apporto giornaliero approssimativamente di 23 µg di antocianine, 150 µg di flavonoli e 55 µg di stilbeni per grammo completo di dieta, un apporto che si è dimostrato preventivo sullo sviluppo dell’infiammazione cronica intestinale nel modello murino adottato. Questo dato costituisce un punto di partenza nella progettazione di studi pre-clinici su altri modelli di infiammazione o studi clinici, traslando opportunamente i quantitativi alla dieta umana (Martin & Bolling, 2015). I risultati di questo studio, infatti, suggeriscono che il consumo giornaliero di 2-3 pomodori della linea “Bronze” (circa 100 g) potrebbero essere sufficienti per ottenere un apporto simile di questi bio-composti anche nell’uomo. Tali quantità sarebbero difficilmente ottenibili con altri prodotti freschi presenti nella dieta. Infatti, considerando l’uva nera, che è tra i pochi frutti in grado di fornire stilbeni, antociani e flavonoli nel contesto di frutto unico, ne sarebbe necessario il consumo di circa 5 kg per fornire lo stesso apporto di polifenoli stimato per 100 g di pomodoro della linea “Bronze”.

Sezione II.

Per quanto concerne l’utilizzo del sistema CRISPR/Cas9 nel saggio di espressione transiente, i risultati preliminari incoraggiano il proseguimento dello studio di sostituzione del promotore di *MYB12* con il promotore E8 e l’impiego di questo nuovo approccio nel settore di ricerca agroalimentare. Sebbene sia necessario un lavoro di *screening* approfondito per cercare la mutazione desiderata, il sistema offre delle buone possibilità di successo, visto anche l’elevato numero di radici aeree trasformate con Cas9. Un metodo per aumentare la frequenza di inserzione genica o *gene targeting* (GT) è mediato da vettori di tipo virale. L’utilizzo di vettori di questo tipo è stato già riportato in letteratura (Čermák *et al.*, 2015), ad esempio impiegando gemini virus (BeYDV, *bean yellow dwarf virus*) con alta frequenza di replicazione all’interno della cellula ospite. Inoltre, in letteratura è stato riportato il confronto tra la frequenza di

trasformazione ottenuta con endonucleasi TALENS e quella con Cas9 in pomodoro (Čermák *et al.*, 2015) evidenziando come le frequenze di eventi GT siano state lievemente superiori per Cas9 rispetto a TALENs. Gli autori suggeriscono che ciò potrebbe essere correlato ai tipi di taglio generati dalle due diverse endonucleasi, portando anche ad una diversa via preferenziale di riparazione endocellulare. I risultati preliminari ottenuti in questo lavoro, hanno mostrato l'esistenza di almeno un evento di inserzione di una parte del promotore E8 a monte del gene *SlMYB12*, ed ulteriori analisi molecolari sono in corso per confermare l'evento a valle del promotore naturale di *SlMYB12*. Ciò, infatti, rappresenterebbe un ulteriore passo per confermare l'inserzione totale del promotore nel punto desiderato. Sebbene in letteratura non siano riportati molti casi riguardanti l'inserzione genica in pomodoro (Čermák *et al.*, 2015), alcune informazioni utili possono essere tratte da studi su altri modelli sperimentali, come *Arabidopsis*. È stato riportato, ad esempio, il caso di inserzione mediato da CRISPR/Cas9 della sequenza della kanamicina *nptII* nel locus *ADH1* di *Arabidopsis* (Schiml *et al.*, 2014). Nello studio, gli eventi di modificazione specifica GT sono avvenuti in termini sia di inserzioni totale sia di inserzioni parziali, suggerendo quindi che i possibili eventi di inserimento sono molteplici. I risultati riportati in questo lavoro, pur rappresentando un primo passo per l'impiego di CRISPR/Cas9 in trasformazioni stabili finalizzate all'inserzione di nuovi tratti genetici, sono molto incoraggianti e necessitano di ulteriori indagini di approfondimento. In questo caso, direzionando il sistema CRISPR/Cas9 sull'inserzione di un nuovo promotore per il gene *SlMYB12*, le linee prodotte sarebbero potenziate nella sintesi di flavonoidi nel frutto, con conseguente aumentato valore nutrizionale, come già dimostrato utilizzando un approccio di ingegneria metabolica classica.

CONCLUSIONI

E' stato suggerito che il consumo di alimenti ricchi in composti polifenolici nella dieta possa essere associato alla prevenzione di malattie, come le patologie cardiovascolari e le infiammazioni intestinali. I composti fenolici, infatti, presentano una bioattività che non si limita all'azione antiossidante, ma che è estesa a numerosi altri meccanismi d'azione. Di conseguenza per l'ottenimento di informazioni dettagliate e trasferibili entro linee guida per l'alimentazione e per lo studio di prodotti ottimizzati, è necessario considerare quali siano le classi di composti che rendono conto della specifica attività. Punti determinanti sono quindi la quantità e la biodisponibilità di tali molecole nello stesso alimento. Inoltre, diversi studi clinici e preclinici hanno indicato che singoli composti naturali o di sintesi non presentano le stesse attività protettive come quelle fornite dai singoli composti all'interno di matrici alimentari (Liu, 2004).

In questo studio, i principali risultati ottenuti sono riassumibili nei seguenti punti:

- sono state sviluppate nuove linee di pomodoro ad alto contenuto di polifenoli, tra cui la linea “Bronze”, caratterizzata dall'accumulo di una combinazione di differenti classi polifenoliche (flavonoli, antociani e stilbeni) nel frutto maturo, differente rispetto alle linee parentali “Indigo” e “HighResv”, caratterizzate da flavonoli e antociani o flavonoli e stilbeni;
- estratti da frutto “Bronze” hanno mostrato una maggiore capacità antiossidante rispetto alle linee wild-type, “Indigo” e “Bronze”;
- in condizioni non patologiche, topi della linea C57Bl/6 alimentati per due settimane con dieta a base “Bronze”, “Indigo” e “HighResv”, non hanno mostrato segni di tossicità o danno intestinale con le dosi utilizzate (1% di pomodori liofilizzati aggiunti alla dieta standard);
- sono stati evidenziati dei cambiamenti nel profilo microbico intestinale di topi C57Bl/6, alimentati con le differenti diete, con un aumento del rapporto *Bacteroidetes:Firmicutes* nelle diete a base di stilbeni (“HighResv” e “Bronze”) e con un aumento dell'abbondanza relativa dei *Lactobacilli* nelle diete a base di antociani (“Indigo” e “Bronze”);
- nel modello di infiammazione cronica intestinale indotta con DSS per due settimane, è stata osservata una riduzione dei sintomi dell'infiammazione nella dieta a base “Bronze”;

- l'utilizzo del sistema CRISPR/Cas9 nel saggio di espressione transiente si è rivelato efficace per l'inserzione del promotore E8 a monte del gene *SIMYB12*, importante per la biosintesi di flavonoidi in pomodoro, evidenziando come questo sistema rappresenti uno strumento biotecnologico utile per il miglioramento nutrizionale del pomodoro.

In conclusione, nel presente studio l'ingegneria metabolica ha rappresentato un approccio valido e innovativo per lo sviluppo di nuove linee di pomodoro con incrementati livelli di polifenoli. Con questa strategia si potrebbero sviluppare nuovi alimenti funzionali specificamente disegnati per la prevenzione di patologie croniche umane. Inoltre, grazie alla disponibilità sempre crescente di modelli animali su cui testare i nuovi alimenti funzionali, è possibile validarne gli effetti, in un'ottica futura di sviluppo di strumenti nutrizionali da affiancare ai trattamenti di queste condizioni patologiche.

BIBLIOGRAFIA

- Ananthakrishnan A. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; 12: 205-217.
- Andoh A., Shioya M., Nishida A., Bamba S., Tsujikawa T., Kim-Mitsuyama S., Fujiyama Y. Expression of IL-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2009; 183(1):687-95.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V. Plant genome editing made easy: targetes mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas9 system. *Plant Methods*, 2013; 9: 39-49.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Patron NJ, Nekrasov V. Editing plant genome with CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotechnol*, 2015; 32: 76-84.
- Borevitz JO, Xia Xia Y, Blount J, Dixon RA, Lamb C. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, 2000; 12: 2383-93.
- Bortesi L, Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Advances*, 2015; 33: 41-52.
- Bovy AG, DeVos R, Kemper M, Schijlen E, Pertejo MA, Muir SR, Collins G., Robinson S., Verhoeven M., Hughes S., Santos-Buelga C., van Tunen A. High flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes Lc and C1. *Plant Cell* 2002; 14:2509–26
- Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Van Eck J. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the CRIPSR/Cas9 system. *Plant Physiol*, 2014; doi: 10.1104/pp.114.247577
- Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock HP, Matros A, Peterek S, Schijlen EG., Hall RD., Bovy AG., Luo J., Martin C. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat Biotechnol* 2008; 26:1301–8.
- a) Calabriso N., Massaro M., Scoditti E., Pellegrino M., Ingrosso I., Giovino G., Carluccio MA. Red grape skin polyphenols blunt matrix metalloproteinase-2 and -9 activity and expression in cell models of vascular inflammation: protective role in degenerative and inflammatory diseases. *Molecules*, 2016; pii: E1147. doi: 10.3390/molecules21091147.

- b) Calabriso N, Scoditti E, Massaro M, Pellegrino M, Storelli C, Ingrosso I, Giovinnazzo G, Carluccio MA. Multiple anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties of red wine polyphenolic extracts: different role of hydroxycinnamic acids, flavonols and stilbenes on endothelial inflammatory gene expression. *Eur J Nutr*, 2016; 55(2): 477-89.
- Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr Biochem* 2013; 24: 1415-22.
- Carow B., Rottenberg, ME. SOCS3, a major regulator of infection and inflammation. *Front Immunol* 2014; 5:1-13.
- Cavalcanti E, Vadrucchi E, Delvecchio FR, Addabbo F, Bettini S, Liou R, Monsurrò V, Huang AYC, Torres Pizzaro T, Santino A, Chieppa M. Administration of reconstituted polyphenol oil bodies efficiently suppresses dendritic cell inflammatory pathways and acute intestinal inflammation. *PlosOne* 2013; 9(2):e88898.
- Čermák T, Baltes NJ, Čegan R, Zhang Y, Voytas DF. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol* 2015; doi:10.1186/s13059-015-0796-9.
- Chong J, Poutaraud A, Hugueney P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci*, 2009; 177: 143-55.
- Danese S., Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006; 12(30):4807-12.
- de Pascual-Teresa S, Sanchez-Ballesta MT. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochem Rev*, 2008; 7: 281-99.
- de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 2007; 35:1156-60.
- Delvecchio FR, Vadrucchi E, Cavalcanti E, De Santis S, Vacca M, Myers J, Frederick A, Bianco G, Huang A, Monsurrò V, Santino A, Chieppa M. Polyphenol Administration Impairs T cells Proliferation by Imprinting a Distinct Dendritic Cell Maturation Profile, *Eur J Immunol* 2015; 45(9):2638-49.
- De Santis S., Cavalcanti E., Mastronardi M., Jirillo E., Chieppa M. Nutritional keys for intestinal barrier modulation. *Front Immunol* 2015; 6:1-15.
- D’Introno A, Paradiso A, Scoditti E, D’Amico L, De Paolis A, Carluccio MA, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of tomato fruit synthesizing different amount of stilbenes. *PlantBiotech J* 2009; 7:422- 9.

- Dinarello CA. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw* 1994; 5(6):517-31.
- Dolara P, Luceri C, De Filippo C, Femia AP, Giovannelli L, Caderni G, et al. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mut Res* 2005; 591: 237-46.
- Du H, Zhang L, Liu L, Tang XF, Yang WJ, Wu YM, Huang YB, Tang YX. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry*, 2009; 74(1):1-11.
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 2010; 15: 573-81.
- Duncan SH., Lopley GE., Holtrop G., Ince J., Johnstone AM., Louis P., Flint HJ. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32(11):1720-4.
- Espley RV, Butts CA, Laing WA, Martell S, Smith H, McGhie TK, Zhang J, et al. Dietary flavonoids from modified apple reduce inflammation markers and modulate gut microbiota in mice. *J Nutr*, 2014; 144: 146-54.
- Etxeberria U., Arias N., Boqué N., Macarulla MT., Portillo MP., Martínez JA., Milagro FJ. Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of *trans*-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. *J Nutr Biochem* 2015; 26:651-60.
- Fang K., Grisham MB., Kevil CG. Application of comparative transcriptional genomics to identify molecular targets for pediatric IBD. *Front Immunol* 2015; 6:165.
- Faria A, Fernandes I, Norberto S, Mateus N, Calhau C. Interplay between anthocyanins and gut microbiota. *J Agric Food Chem* 2014; 62: 6898-902.
- Fausser F, Schiml S, Puchta H. Both CRISPR/Cas9-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2014; 79: 348-59.
- Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas9 system. *Cell Res*, 2013; 23: 1229-32.
- Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang DL, Wang Z, et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas9- induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2014.
- Galleggiante V, De Santis S, Cavalcanti E, Scarano A, De Benedictis M, Serino G, Caruso ML, Mastronardi M, Pinto A, Campiglia P, Kunde D, Santino A, Chieppa M. Dendritic

- cells modulate iron homeostasis and inflammatory abilities following quercetin exposure. *Curr Pharm Design*, 2017; doi: 10.2174/1381612823666170112125355
- Gao Y, Zhao Y. Specific and heritable gene editing in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111: 4357-58.
- Giovinazzo G, D'Amico L, Paradiso A, Bollini R, Sparvoli F, De Gara L. Antioxidant metabolite profiles in tomato fruit constitutively expressing the grapevine stilbene synthase gene. *Plant Biotech J* 2005; 3:57-69.
- Giovinazzo G, Ingrosso I, Paradiso A, De Gara L, Santino A. Resveratrol Biosynthesis: Plant metabolic engineering for nutritional improvement of food. *Plant Foods Hum Nutr*, 2012; 67: 191-99.
- Giovinazzo G, Ingrosso I, Taurino M, Santino A. Metabolic engineering for functional foods: tomato fruits and stilbenes. *Nat Prod*, 2013; doi:10.1007/978-3-642-22144-6_193.
- Guinane CM., Cotter PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therap Adv Gastroenterol* 2013; 6:295-308.
- Ha CY, Katz S. Clinical putcomes and amangement of inflammatory bowel disease in the older patient. *Curr Gastroenterol Rep*, 2015; 15: 310.
- Han X, Shen T, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci* 2007; 8:950-88.
- Hart AL., Lammers K., Brigidi P., Vitali B., Rizzello F., Gionchetti P., Campieri M., Kamm MA., Knight SC., Stagg AJ. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 2004; 53(11): 1602-9.
- Heyman-Lindén L., Kotowska D., Sand E., Bjursell M., Plaza M., Turner C., Holm C., Fåk F., Berger K. Lingoberries alter the gut microbiota and prevent low-grade inflammation in high-fat diet fed mice. *Food Nutr Res* 2016; 60: 29993-30007.
- Hichri I, Barrieu F, Bogs J, Kappel C, Delrot S, Lauvergeat V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *J Exp Bot*, 2011; 1-19. Doi:10.1093/jxb/erq442.
- Hidalgo M, Oruna-Concha MJ, Kolida S, Walton GE, Kallithraka S, Spencer JPE, Gibson GR, de Pascual-Teresa S. Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *J Agr Food Chem* 2012; 60: 3882-90.

- Jaakola L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trend Plant Sci* 2013; 18:477-83.
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 2015; 21(29): 8787-803.
- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic acids Res*, 2013; 41:e188.
- Jiang W, Yang B, Weeks DP. Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations. *PlosOne*, 2014; 9(6):e99225.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012; 337: 816-21.
- Jonker D., Stockbrügger R. Probiotics and inflammatory bowel disease. *J R Soc Med* 2003; 96:167-71.
- Kabera JN, Semana E, Mussa AR, He X. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J Pharm Pharmacol* 2014; 2: 377-92.
- Kasai C., Sugimoto K., Moritani I., Tanaka J., Oya Y., Inoue H., Tameda M., Shiraki K., Ito M., Takei Y., Takase K. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol* 2015; 15:100-10.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-63.
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci*, 2005; 10: 236-42.
- Kryck Ł, Nielsen DS, Hansen AK, Hansen CHF. Gut microbial markers are associated with diabetes onset, regulatory imbalance, and IFN γ level in NOD mice. *Gut microbes* 2015; 6(2): 101-9.
- a) Larrosa M, Yanez-Gascon MJ, Selma VM, González-Sarriás A., Toti S., Cerón JJ., Tomás-Barberán F., Dolara P., Espín JC. Effect of a low dose of dietary resveratrol on

- colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 2211-2220.
- b) Larrosa M, Luceri C, Vivoli E, Pagliuca C, Lodovici M, Moneti G, et al. Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: 1044-54.
- Lenucci MS, Caccioppola A, Durante M, Serrone L, Leonardo R, Piro G, Dalessandro G. Optimisation of biological and physical parameters for lycopene supercritical CO₂ extraction from ordinary and high-pigment tomato cultivars. *J Sci Food Agric*, 2010; 90: 1709-18.
- Ley RE., Bäckhed F., Turnbaugh P., Lozupone CA., Knight RD., Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS* 2005; 102: 11070-75.
- Li A, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 2014; 6: 6020-47.
- Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 2013; 31: 688-91.
- Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics*, 2014; 42: 7473-85.
- Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr*, 2004; 134: 3479S-85S.
- López de Felipe F, de las Rivas B, Muñoz R. Bioactive compounds produced by gut microbial tannase; implications for colorectal cancer development. *Front Microbiol* 2014; 5: 684.
- Luo J, Butelli E, Hill L, Parr A, Niggeweg R, Bailey P, Weisshaar B., Martin C. AtMYB12 regulates caffeoylquinic acid and flavonol synthesis in tomato: expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol. *Plant J* 2008; 56:316–26.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004;79: 727-47.
- Marchesi JR., Adams DH., Fava F., Hermes GDA., Hirschfield GM., Hold G., Quraishi MN., Kinross J., Smidt H., Tuohy KM., Thomas LV., Zoetendal EG., Hart A. The gut microbitoa and host health: a new clinical frontier. *Gut* 2016; 65:330-339.
- Mao Y, Zhang H, Xu N, Zhang B, Gou F, Zhu JK. Application of the CRSIPR-Cas system for efficient genome editing in plants. *Mol Plant*, 2013; 6: 2008-11.

- Martin C. Transcription factors and the manipulation of plant traits. *Curr Opin Biotechnol*, 1996; 7: 130-8.
- Martin C, Zhang Y, Tonelli C, Petroni K. Plants, diet, and health. *Annu Rev Plant Biol* 2013; 64:19-46.
- Martin DA, Bolling BW. A review of the efficacy of dietary polyphenols in experimental models of inflammatory bowel diseases. *Food Funct* 2015; 6: 1773-86.
- Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol*, 2005; 138: 1083-96.
- Miao J, Guo D, Zhang J, Huang Q, Qin G, Zhang X, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res*, 2013; 23: 1233-6.
- Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M., Chernoff G., Benchimol EI, Panaccione R., Ghosh S., Barkema HW., Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterol* 2012; 142: 46-54.
- Monagas M, Khan N, Andrés-Lacueva C, Urpí-Sardá M, Vázquez-Agell M, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. Dihydroxylated phenolics acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Nutr* 2009; 102: 201-6.
- Montrose DC, Horelik NA, Madigan JP, Stoner GD., Wang LS., Bruno RS., Park HJ., Giardina C., Rosenberg DW. Anti-inflammatory effects of freeze-dried black raspberry powder in ulcerative colitis. *Carcinogenesis* 2011; 32: 343-350.
- Muir SR, Collins GJ, Robinson S, Hughes S, Bovy A, De Vos CHR, van Tunen AJ, Verhoeven ME. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nat Biotech*, 2001; 19:470-4.
- Murtagh F & Legendre P. Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithms implement Ward's criterion? *J Classif*, 2014; 31: 274-95.
- Nesi N, Jond C, Debeaujon I, Caboche M, Lepiniec L. The *Arabidopsis* *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell*, 2001; 13: 2099-114.
- Niggeweg R, Michael AJ, Martin C. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat Biotech*, 2004; 22(6):746-54.

- Ogata K, Kanei-Ishii C, Sasaki M, Hatanaka H, Nagadoi A, Enari M, Nakamura H, et al., The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. *Nat Struct Biol*, 1996; 3(2): 178-87.
- Ozda T, Sela DA, Xiao J, Boyacioglu D, Chen F, Capanoglu E. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients* 2016; 8(2): 78; doi: 10.3390/nu8020078.
- Pandey KB and Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009; 2(5): 270-8.
- Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:718617. doi: 10.1155/2012/718617.
- Piberger H., Oehme A., Hofmann C., Dreiseitel A., Sand PG., Obermeier F., Schoelmerich J., Schreier P., Krammer G., Rogler G. Bilberries and their anthocyanins ameliorate experimental colitis. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55:1724-1729.
- Quattrocchio F, Wing JF, Leppen H, Mol J, Koes R. Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *Plant Cell*, 1993; 11: 1497-1512.
- Quattrocchio F. Regulatory genes controlling flower pigmentation in *Petunia hybrida*. PhD thesis, 1994; Amsterdam: Vrije Universiteit.
- Quattrocchio F, Wing JF, van der Woude K, Souer E, de Vetten N, Mol JNM, Koes R. Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of petunia and its role in the evolution of flower color. *Plant cell*, 1999; 11: 1433-44.
- Queipo-Ortuño MI, Boto-Ordóñez M, Murri M, Gomez-Zumaquero JM, Clemente-Postigo M, Estruch R, et al. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *Am J Clin Nutr* 2012; 95: 1323-34.
- Ramsay NA, Glover B. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity, *Trends Plant Sci* 2005; 10: 63-70.
- Ranish JA, Hahn S. Transcription: basal factors and activation. *Curr Opin Genet Dev*, 1996; 2: 151-8.
- Rajilić-Stojanović M., Jonkers DM., Salonen A., Hanevik K., Raes J., Jalanka J., de Vos WM., Manichanh C., Golic N., Enck P., Philippou E., Iraqi FA., Clarke G., Spiller RC., Penders J. Intestinal microbiota and diet in IBS: causes, consequences or epiphenomena? *Am J Gastr* 2015; 110:278-287.

- Romier B, Schneider YJ, Larondelle Y, During A. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr Rev* 2009; 67:363-78.
- Ron M, Kajala K, Pauluzzi G, Wang D, Reynoso MA, Zumstein K, Garcha J, Winte S, Masson H, et al. Hairy roots transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model. *Plant Physiol*, 2014; 166: 455-69.
- Rutgeerts PS, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol* 2009; 136: 1182-97.
- Sánchez-Fidalgo S., Cárdeno A., Villegas I., Talero E., de la Lastra CA. Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* 2010; 633:78-84.
- Santino A, Scarano A, De Santis S, De Benedictis M, Giovino G, Chieppa M. Gut microbiota modulation and anti-inflammatory properties of dietary polyphenols in IBD: new and consolidated perspectives. *Curr Pharm Design*, 2017; 23: 1-8.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary Intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*, 2000; 130: 2073S-2085S.
- Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 2002; 56: 276-82.
- Schijlen EGWM, de Vos CHR, van Tunen AJ, Bovy A. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochem*, 2004; 65: 2631-48.
- Schijlen EGWM, de Vos CHR, Jonker H, van den Broeck H, Molthoff J, van Tunen AJ, Martens S, Bovy A. Pathway engineering for healthy phytochemicals leading to the production of novel flavonoids in tomato fruit. *Plant Biotechnol J*, 2006; 4: 433-44.
- Schmidlin L, Poutaraud A, Claudel P, Mestre P, Prado E, Santos-Rosa M, et al. A stress-inducible resveratrol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiol* 2008; 148: 1630-9.
- Schimpl S, Fauser F, Puchta H. The CRISPR/Cas9 system can be used as nuclease for *in planta* gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant J*, 2014; 80: 1139-50.
- Schimpl S, Puchta H. Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas. *Plant Methods*, 2016; 12:8-17.

- Schwinn K, Venail J, Shang Y, Mackay S, Alm V, Butelli E, Oyama R, Bailey P, Davies K, Martin C. A small family of *MYB*-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *Plant cell*, 2006; 18: 831-51.
- Selma M, Espín JC, Tomàs-Barberan FA. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agr Food Chem* 2009; 57: 6485-501.
- Serra D, Paixão J, Nunes C, Dinis TCP, Almeida LM. Cyanidin-3-glucoside suppresses cytokine-induced inflammatory response in human intestinal cells: comparison with 5-aminosalicylic acid. *PlosOne* 2013; 8(9): e73001-10.
- Seshadri TR. Polyphenols of *Pterocarpus* and *Dalbergia* woods. *Phytochemistry*, 1972; 11: 881-98.
- Shan Q, Wang Y, I J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013; 31: 686-8.
- Sheil B., Shanahan F., O'Mahony L. Probiotic effects on inflammatory bowel disease. *J Nutr* 2007; 137:819S-824S.
- Slimestad R, Fossen T, Verheul MJ- The flavonoid of tomatoes. *J Agric Food Chem*, 2008; 56: 2436-41.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen*, 2005; 579: 200-13.
- Spelt C, Quattrocchio F, Mol JNM, Koes R. *anthocyanin1* of *Petunia* encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell*, 2000; 12: 1619-31.
- Spelt C, Quattrocchio F, Mol J, Koes R. ANTHOCYANIN1 of *Petunia* controls pigment synthesis, vacuolar pH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms. *Plant Cell*, 2002; 14: 2121-35.
- Stracke R, Weber M, Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol*, 2001; 4: 447-56.
- Suzuki T, Hara H. Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. *J Nutr Biochem*, 2011; 22: 401-8.
- Vannozzi A, Dry IB, Fasoli M, Zenoni S, Lucchin M. Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses. *BMC Plant Biol*, 2012; 12: 130-52.

- Vendrame S, Guglielmetti S, Riso P, Arioli S, Klimis-Zacas D, Porrini M. Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. *J Agric Food Chem* 2011; 59(24): 12815-20.
- Verma S, Singh A, Mishra A. Gallic acid: molecular rival of cancer. *EnvironmToxicolPharmacol* 2013; 35: 473-85.
- Verna EC., Lucak S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Ther Adv Gastroenterol*, 2010; 3(5):307-19.
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, et al., Simultaneous editing of three homoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 2014; 32: 947-51.
- Wang D, Ho L, Faith J, Ono K, Janle EM, Lachcik PJ, et al. Role of intestinal microbiota in the generation of polyphenol derived phenolic acid mediated attenuation of Alzheimer's disease β -amiloid oligomerization. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59(6): 1025-40.
- Xue B., Xie J., Huang J., Chen L., Gao L., Ou S., Wang Y., Peng X. Plant polyphenols alter a pathway of energy metabolism by inhibiting fecal Bacteroidetes and Firmicutes *in vitro*. *Food Funct* 2016; 7,1501-7.
- Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, et al. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J*, 2014; 12: 797-807.
- Zhang Y, Butelli E, Martin C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2014; 19:81-90.
- Zhang Y, Butelli E, Alseekh S, Tohge T, Rallapalli G, Luo J, Kwar PG., Hill L., Santino A., Fernie AR., Martin C. Multi-level engineering facilitates the production of phenylpropanoid compounds in tomato. *Nat Commun* 2015; 6:8635, doi:10.1038/ncomms9635.
- Zhao L. The gut microbiota and obesity: from correlation to casuality. *Nat Rev Microb* 2013; 11: 639-47.
- Zhou Y, Zheng J, Li Y et al., Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients*, 2016; 8.pii:E515. doi:10.3390/nu8080515.

APPENDICE

FIGURA A1

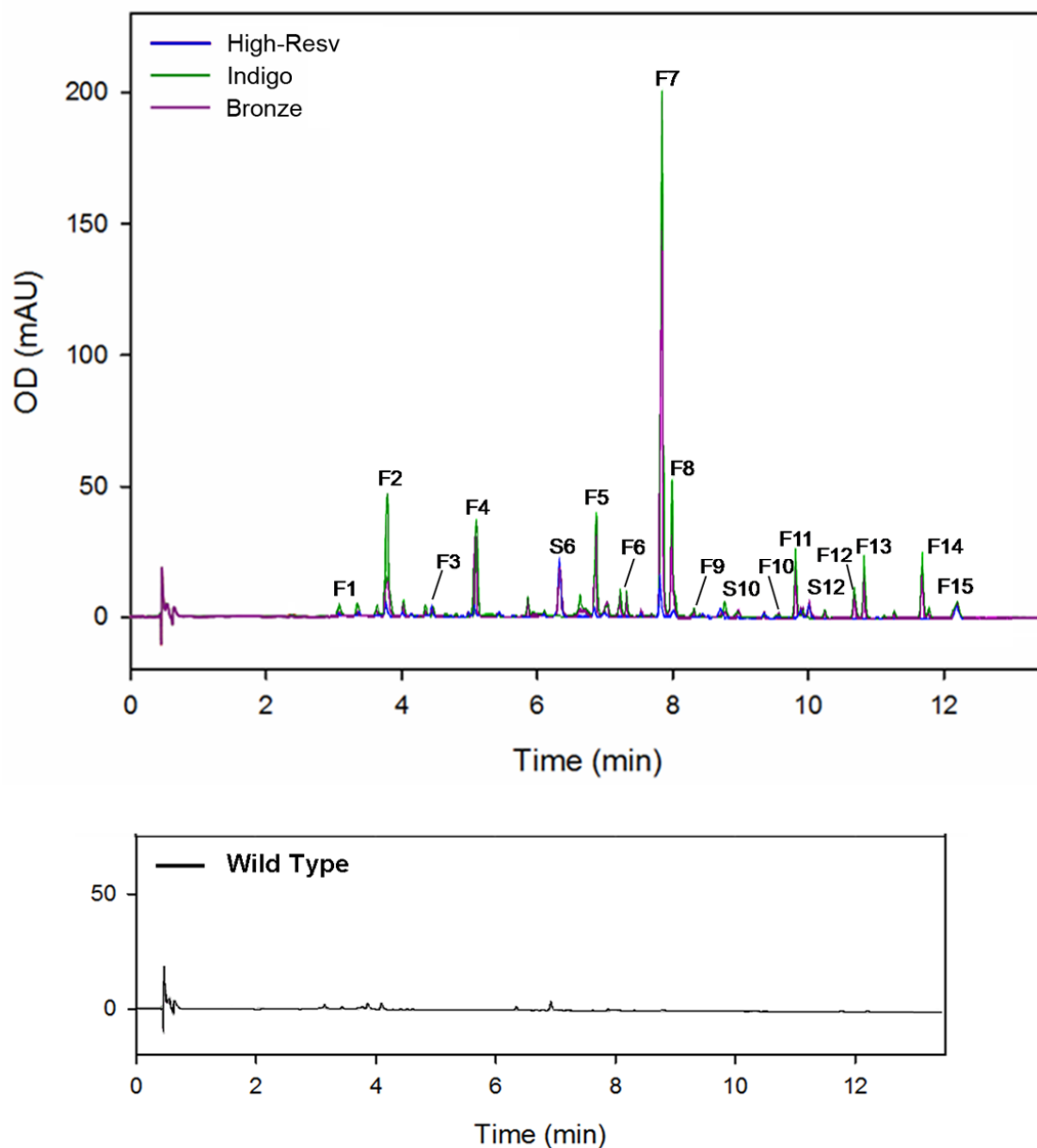


Figura A1. Identificazione di flavonoli e altri polifenoli in diversi frutti di pomodoro. Analisi LC/MS di polifenoli rilevati in estratti metanolici di frutti maturi dalle diverse linee. I dettagli sulle lunghezze d'onda e tempi di ritenzione specifici per ciascun composto sono riportati in Tabella A1.

FIGURA A2

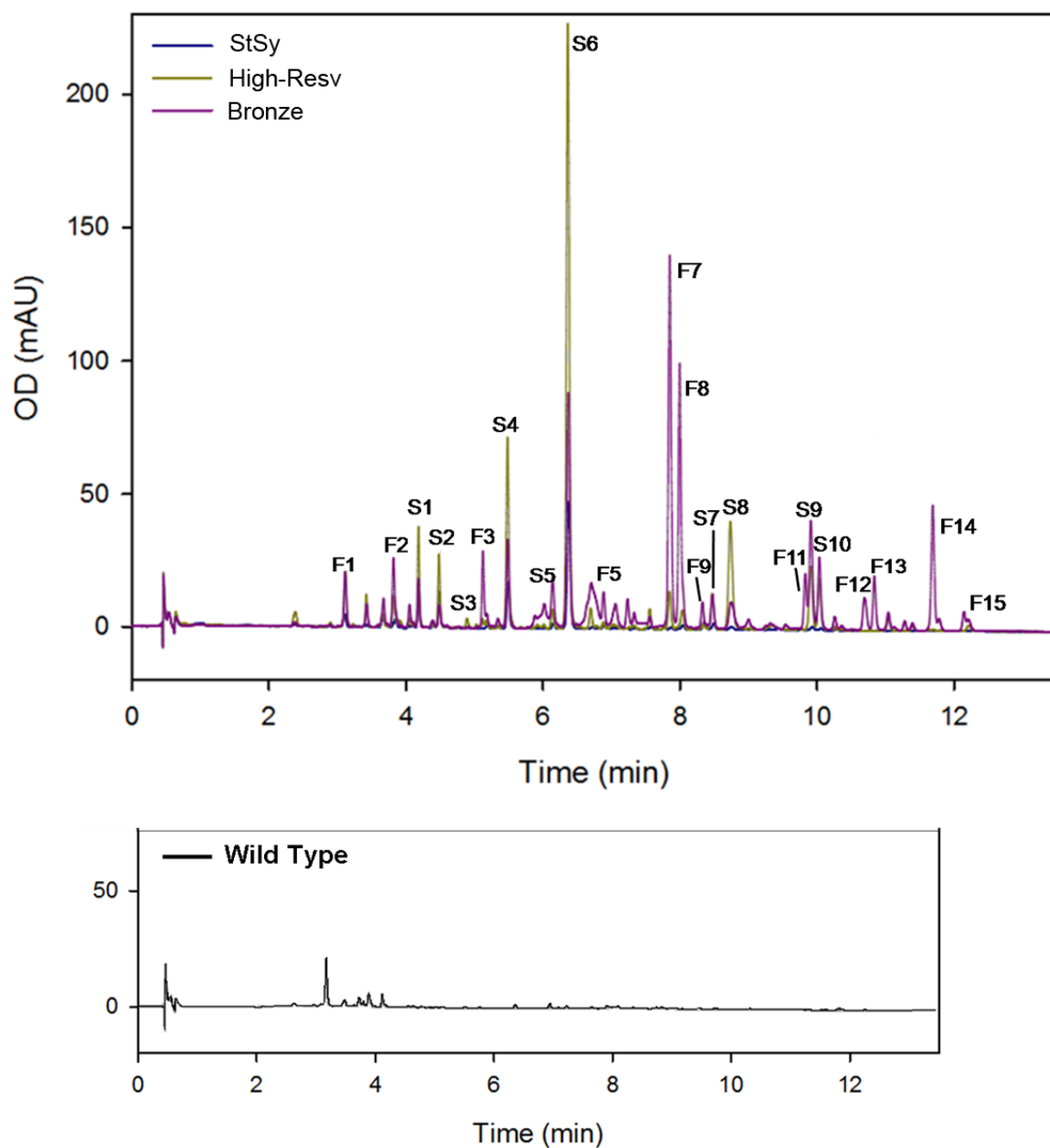


Figura A2. Identificazione di stilbeni in diversi frutti di pomodoro. Analisi LC/MS di stilbeni rilevati in estratti metanolici di frutti maturi dalle diverse linee. I dettagli sulle lunghezze d'onda e tempi di ritenzione specifici per ciascun composto sono riportati in Tabella A2.

FIGURA A3

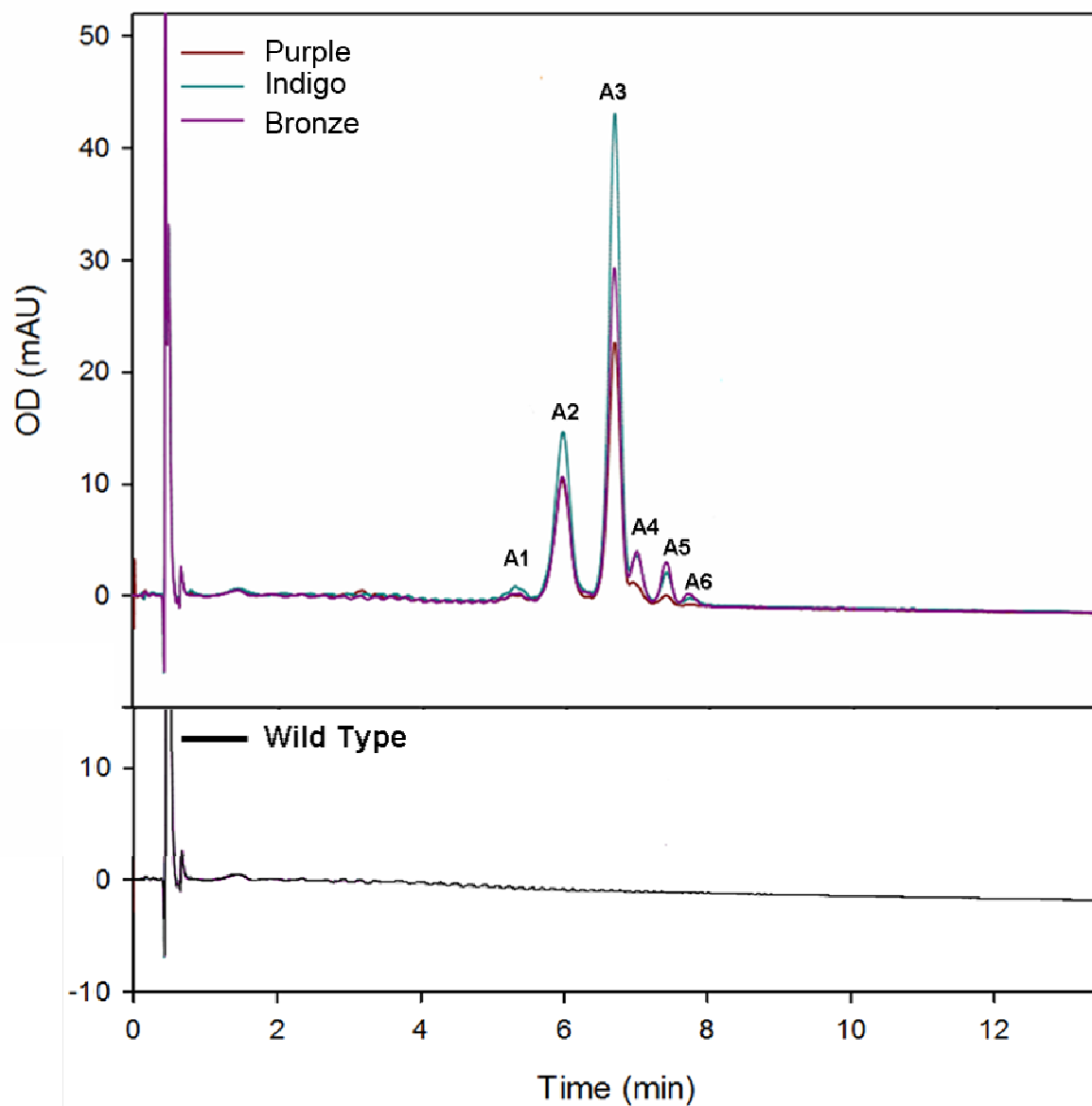


Figura A3. Identificazione di antocianine in diversi frutti di pomodoro. Analisi LC/MS di antocianine rilevate in estratti metanolici di frutti maturi dalle diverse linee. I dettagli sulle lunghezze d'onda e tempi di ritenzione specifici per ciascun composto sono riportati in Tabella A3.

Peak	Abbreviation	Compound	$\lambda_{\max}$ (nm)	Retention time (min)	$[M+H]^+/[M+Na]^+$ (m/z)	Detected fragments
F1-F2	CouGlc	Coumaroyl glucoside	350	3,1; 3,93	349,09	349,09
F2	CGA	Chlorogenic acid	325	3,82	355,10	355,1
F3	RutGlc	Rutin glucoside	350	4,50	773,1	773,1 (611,1; 303,05)
F4	KaeGlcGlc	Kaempferol diglucoside	350	5,04	611,16	611,16 (449,11; 287,05)
F4	KaeRutGlc	Kaempferol-rutinoside-glucoside	350	5,13	757,22	757,22 (449,11; 287,05)
F5	Rut	Rutin	350	6,98	611,16	611,16 (465,10; 303,05)
F6	MeMyrGlc	Methyl-myricetin-glucoside	350	10,73	809,19	809,19 (495,11; 333,06)
F7	KaeRut	Kaempferol rutinoside	350	7,87	595,17	595,17 (287)
F8-F12	KaeGlc	Kaempferol glucoside	350	8,06; 10,74	449,11	449,11 (287,05)
F9	IsorhamRut	Isorhamnetin-rutinoside	350	8,21	625,18	625,18 (479,12; 317,06)
F10	NarGlc	Naringenin glucoside	368	9,39	457,11	457,11 (273,07)
F11	MyrCouRut	Myricetin-coumaroyl-rutinoside	350	10,00	795,17	795,17 (481,09; 319,04)
F13	QueCouRut	Quercetin-coumaroyl-rutinoside	350	10,91	779,18	779,18 (465,10; 303,05)
F14	KaeCouRut	Kaempferol-coumaroyl-rutinoside	350	11,79	763,1	763 (449,1; 287,05)
F15	NarCh	Naringenin chalcone	365	12,22	273,08	273,08

Tabella A1. Identificazione dei picchi dei flavonoli e altri polifenoli mediante LC/MS.

Peak	Abbreviation	Compound	$\lambda_{\max}$ (nm)	Retention time (min)	$[M+H]^+/[M+Na]^+$ (m/z)	Detected fragments
S1	ResGlcGlc1	Resveratrol-glucoside isoform 1	306	4,19	575,17	575,17 (413,12; 229,08)
S2	ResGlcGlc2	Resveratrol-glucoside isoform 2	306	4,49	575,17	575,17 (413,12)
S3	ResGlcGlc3	Resveratrol-glucoside isoform 3	306	4,90	575,17	575,17 (413,12)
S4	ResGlcGlc4	Resveratrol-glucoside isoform 4	306	5,49	437	437
S5	ResGlcGlc5	Resveratrol-glucoside isoform 5	306	6,14	575,17	575,17 (413,12)
S6	Piceid	Piceid	306	6,38	391,14	391,14 (229,08)
S7	MeResGlcGlc	Methyl-resveratrol-diglucoside	306	8,48	589,19	589,19 (405,15; 243,09)
S8	Res	Resveratrol	306	8,75	229,08	229,08
S9	MeResGlc	Methyl-resveratrol-glucoside	306	9,92	427,14	427,14 (243,09)
S10	ResGlcCaf	Resveratrol-glucoside-cafeate	306	10,04	553,17	553,17 (391; 228,25)

Tabella A2. Identificazione dei picchi degli stilbeni mediante LC/MS.

Peak	Abbreviation	Compound	$\lambda_{\max}$ (nm)	Retention time (min)	$[M+H]^+/[M+Na]^+$ (m/z)	Detected fragments
A1	DelGlcCafRut	Delphinidin-glucoside-caffeoyl-rutinoside	525	5,3	935,25	935,24 (787,23; 469,13; 303,05)
A2	DelGlcCouRut	Delphinidin-glucoside-coumaroyl-rutinoside	525	6	919,25	919,25 (757,19; 465,10; 303,05)
A3	PetGlcCafRut	Petunidin-glucoside-caffeoyl-rutinoside	525	6	949,26	949,26 (787,21; 479,12; 317,06)
A3	PetGlcCouRut	Petunidin-glucoside-coumaroyl-rutinoside	525	6,72	933,27	933,26 (771,21; 479,12; 317,06)
A4	PetGlcFerRut	Petunidin-glucoside-feruloyl-rutinoside	525	7	963,27	963,27 (801,22; 479,12; 317,06)
A5	MalGlcCouRut	Malvidin-glucoside-coumaroyl-rutinoside	525	7,4	947,28	947,28 (785,23; 493,13; 331,08)
A6	MalGlcFerRut	Malvidin-glucoside-feruloyl-rutinoside	525	7,45	977,29	977,29 (815,24; 493,13; 331,08)

Tabella A3. Identificazione dei picchi delle antocianine mediante LC/MS.

PUBBLICAZIONI

Pubblicazioni inerenti alla tematica oggetto di tesi:

Galleggiante V., De Santis S., Cavalcanti E., **Scarano A.**, Russo S., Caruso ML., Mastronardi M., Pinto A., Campiglia P., Kunde D., Santino A., Chieppa M. (2017) Dendritic Cells Modulate Iron Homeostasis and Inflammatory Abilities Following Quercetin Exposure. *Current Pharmaceutical Design*. Doi: 10.2174/1381612823666170112125355.

Santino A., **Scarano A.**, De Santis S., De Benedictis M., Giovinazzo G., Chieppa M. (2017) Gut microbiota and anti-inflammatory properties of dietary polyphenols in IBD: new and consolidated perspectives. *Current Pharmaceutical Design*. Doi: 10.2174/1381612823666170207145420.

Scarano A., Butelli E., Hill L., De Santis S., Cavalcanti E., De Angelis M., Giovinazzo G., Martin C., Chieppa M., Santino A. (2017) Bronze, a metabolically engineered tomato enriched in polyphenols, ameliorates symptoms of Inflammatory Bowel Disease”, pronto per la sottomissione.

Pubblicazioni su altre tematiche di ricerca:

Pagliara P., **Scarano A.**, Barca A., Zuppone S., Verri T., Caroppo C. (2015) *Ostreopsis cf. ovata* induces cytoskeletal disorganization, apoptosis and gene expression dysregulation on HeLa cells. *Journal of Applied Phycology*. Doi: 10.1007/s10811-014-0515-z.

Partecipazione a congressi nazionali e internazionali:

Scarano A., Butelli E., Cavalcanti E., Hill L., De Santis S., De Angelis M., Giovinazzo G., Martin C., Chieppa M., Santino A. “Bronze, a metabolically engineered tomato enriched in polyphenols, ameliorates symptoms of Inflammatory Bowel Disease”. Proceeding of the *Joint Congress Food Bioactives and Health*, 1° Conference, September 13th-15th 2016, Norwich, UK. Book of abstracts, p. 234. Poster presentation.

Giovinazzo G., **Scarano A.**, Butelli E., Santino A. Antioxidants, novel healthy phenolic compounds and nutritional quality of different tomato lines with modified flavonoids pathway. Proceedings of the *Joint Congress SIBV-SIGA*, September 8th-11th, 2015, Milano, Italy. ISBN 978-88-904570-5-0.

Scarano A., Butelli E., Santino A., Giovinazzo G. Flavonoids pathway engineering for the induction of novel sets of healthy phytochemicals in tomato fruit. PlantEngine COST Action FA 1006, Final Conference “*Challenges and Prospects in PNP metabolic engineering and Production*”, April 15th - 17th, 2015, Sorrento, Italy. Book of abstracts, p. 74.

Riconoscimenti:

Premio DiSBA 2016 per il cofinanziamento di ricerche di eccellenza nel settore agro-alimentare, con la proposta di ricerca: “A CRISPR/Cas9-mediated gene editing to enhance the expression of the *Solanum lycopersicum* MYB12 gene and the nutritional value of tomato”. Conferenza del Dipartimento di Scienze Bio-Agroalimentari (DiSBA) – CNR- “*Clima, agricoltura e sicurezza alimentare: uno sguardo al futuro*”, 25-26 Ottobre 2016, Firenze, IT.