



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA

VITERBO

Dipartimento di Scienze Ambientali

DOTTORATO DI RICERCA IN

“GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE”- XXIII CICLO

STUDIO DEL PROFILO METABOLICO DEI SISTEMI

BIOLOGICI

VALUTATO MEDIANTE LA TECNICA SPETTROSCOPICA:

RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE

Bio/11

Docente Guida: Prof. Lello Zolla

Coordinatore: Prof. Giorgio Prantera

Dottoranda: Dr.ssa Fabiana Piccioni

INDICE 1

Capitolo 1

Introduzione	3
1.1 Organismi geneticamente modificati (OGM)	3
1.2 Ruolo dei microrganismi in agricoltura: vettori ed ingegneria genetica	7
1.3 Microrganismi impiegati in agricoltura	9
1.4 L'infezione di <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
1.5 Ingegnerizzazione del plasmide Ti	13
1.6 Tomato bushy stunt virus e virus del mosaico del cavolfiore	14
1.7 <i>Bacillus thuringensis</i>	15
1.8 Applicazioni pratiche	17
1.9 Organizzazione Mondiale della Sanità e gli OGM	19
1.10 Principi di valutazione di sicurezza di alimenti GM	21
1.11 OGM e Allergenicità	22
1.12 OGM e Problematiche biologiche	24
1.13 Impatto delle piante GM: accumulo di tossine nel suolo	25

Capitolo 2

Metabolomica	26
2.1 Metaboloma e metabolomica	26

Capitolo 3

Principi del metodo NMR	33
3.1 Spettroscopia NMR	33
3.2 Gli esperimenti NMR monodimensionali	35
3.3 Analisi quantitativa dei segnali dell' ^1H -NMR	36
3.4 Esperimenti NMR bidimensionali	39
3.5 Esperimento 2D-COSY	41
3.6 Il concetto di "spin lock" negli esperimenti NMR ad alta risoluzione	42
3.7 Esperimento 2D-TOCSY	44

Capitolo 4

4.1 Scopo della tesi	46
----------------------	----

Parte Sperimentale	47
 Capitolo 5	
Materiali e Metodi	48
5.1 Raccolta del seme e crescita della pianta	48
5.2 Procedura di estrazione	48
5.3 Analisi ^1H NMR	49
5.4 Misure NMR ad alta risoluzione	49
5.5 Soppressione del segnale del solvente	50
5.6 Presaturazione	51
5.7 Analisi statistica	52
 Capitolo 6	
Risultati e Discussione	
6.1 Assegnazione degli spettri ^1H NMR della fase idroalcolica	53
6.2 Discriminazione del campione GM dal campione non-GM	65
 Capitolo 7	
Conclusioni	73
 Capitolo 8	
Bibliografia	74

CAPITOLO 1

Introduzione

1.1 Organismi Geneticamente Modificati (OGM)

Un organismo geneticamente modificato (un virus, un batterio, un fungo, una pianta o un animale), viene definito, secondo la terminologia ufficiale, come un “organismo il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto si verifica in natura mediante incrocio o ricombinazione” [EC, 2001].

Lo sviluppo dell'agricoltura intensiva è stato reso possibile dall'applicazione di enormi quantità di fertilizzanti chimici e di pesticidi quali erbicidi ed insetticidi, che hanno progressivamente determinato livelli inaccettabili di inquinamento ambientale con gravi ripercussioni sugli equilibri degli ecosistemi e sulla salute dell'uomo [Galli, 1999.; Shah, et al. 1995].

Si sono, quindi, migliorati i raccolti cercando di limitare l'uso di fitofarmaci sia attraverso la selezione di piante più resistenti e produttive, sia attraverso l'utilizzo di piante transgeniche ottenute a partire da ibridi risultanti da incroci vantaggiosi [Gilli, et al. 2000].

Dai tempi di Pasteur e degli studi sulla fermentazione l'impiego vantaggioso delle conoscenze biologiche acquisite sui microrganismi, soprattutto procarioti, è andato crescendo in maniera esponenziale [Brock, et al. 1997].

Tuttavia è negli ultimi decenni, che la diffusione delle conoscenze ed il raffinarsi delle tecniche della biologia e della genetica molecolare hanno condotto alla possibilità di manipolare attivamente il fenotipo di cellule procariotiche ed eucariotiche.

Si è arrivati così a tecniche quali le biotecnologie definite dalla Convenzione sulla Diversità Biologica come “qualsiasi applicazione che utilizza sistemi biologici, organismi viventi o prodotti derivati, per fare o modificare prodotti o processi per uso specifico [FAO and biosafety, 2000].

Queste, infatti, quando adeguatamente integrate ad altre tecnologie per la produzione di alimenti, prodotti agricoli e servizi, offrono un significativo potenziale per adatte soluzioni ai bisogni di una popolazione in continua crescita ed espansione in questo millennio e, quindi rappresentano un mezzo importante per facilitare lo sviluppo dell'agricoltura, della pesca e delle foreste così come dell'industria alimentare [Casadei, 2000].

La definizione data di “biotecnologie” comprende, in generale, molti degli strumenti e delle tecniche che vengono comunemente impiegate in agricoltura e nella produzione di alimenti, più in particolare, considerando le nuove tecniche sul DNA, la biologia molecolare e le applicazioni tecnologiche sulla produzione, racchiude un campo di molteplici metodiche quali la manipolazione genetica ed il trasferimento di geni, la caratterizzazione e la clonazione di piante e animali [Casadei, 2000].

Il termine più corretto per definire le operazioni di modificazione artificiale dei genomi è “l’ingegneria genetica”, sviluppata nei primi anni ’70 del Novecento, epoca in cui furono messe a punto le prime tecniche di isolamento dei frammenti specifici di DNA e di ricombinazione di questi con altri di specie diverse. Solo nel 1977 fu scoperto un potenziale vettore, plasmide in cui con un metodo di “taglia e cucì” era capace di trasferire sequenze di DNA in cellule vegetali.

Fu Mary Dell Chilton, negli Stati Uniti, a chiarire il meccanismo con cui il batterio *Agrobacterium tumefaciens* introduce naturalmente una parte del suo corredo ereditario nelle piante [Chilton, et al. 1977].

Il primo trasferimento di geni eterologhi in organismi vegetali è avvenuto nel 1984 su piante di tabacco, e solo nel 1996 più di 120 specie vegetali diverse sono state trasformate con successo e commercializzate [Trovato, 1999].

Attualmente, si è arrivati ad applicare le biotecnologie perfino alla diagnosi di laboratorio per rilevare la natura transgenica degli alimenti e l’interesse dell’opinione pubblica mondiale è in continuo aumento soprattutto per le implicazioni legate all’impiego degli organismi geneticamente modificati (OGM) in campo alimentare.

I prodotti agricoli transgenici esistono già da diversi anni, coltivati soprattutto negli USA, nel Sud America e in Canada, ma commercializzati in tutto il mondo, Italia compresa. Infatti, indagini accurate hanno rilevato la presenza di materie prime OGM in moltissimi prodotti alimentari (addirittura il 60% secondo il Ministero dell’Ambiente, 1999) soprattutto sotto forma di lecitine di soia, amidi di mais e altri derivati simili. Nel 1990 i raccolti geneticamente modificati praticamente non esistevano; a distanza di qualche decennio circa 134 milioni di ettari sono coltivati con queste tecniche in tutto il mondo.

L'incremento di queste coltivazioni è stato addirittura esponenziale negli ultimi anni (si è passati da 2,8 milioni di ettari nel 1996 ai 134 milioni di ettari nel 2009)

Figura 1.1-1.2.

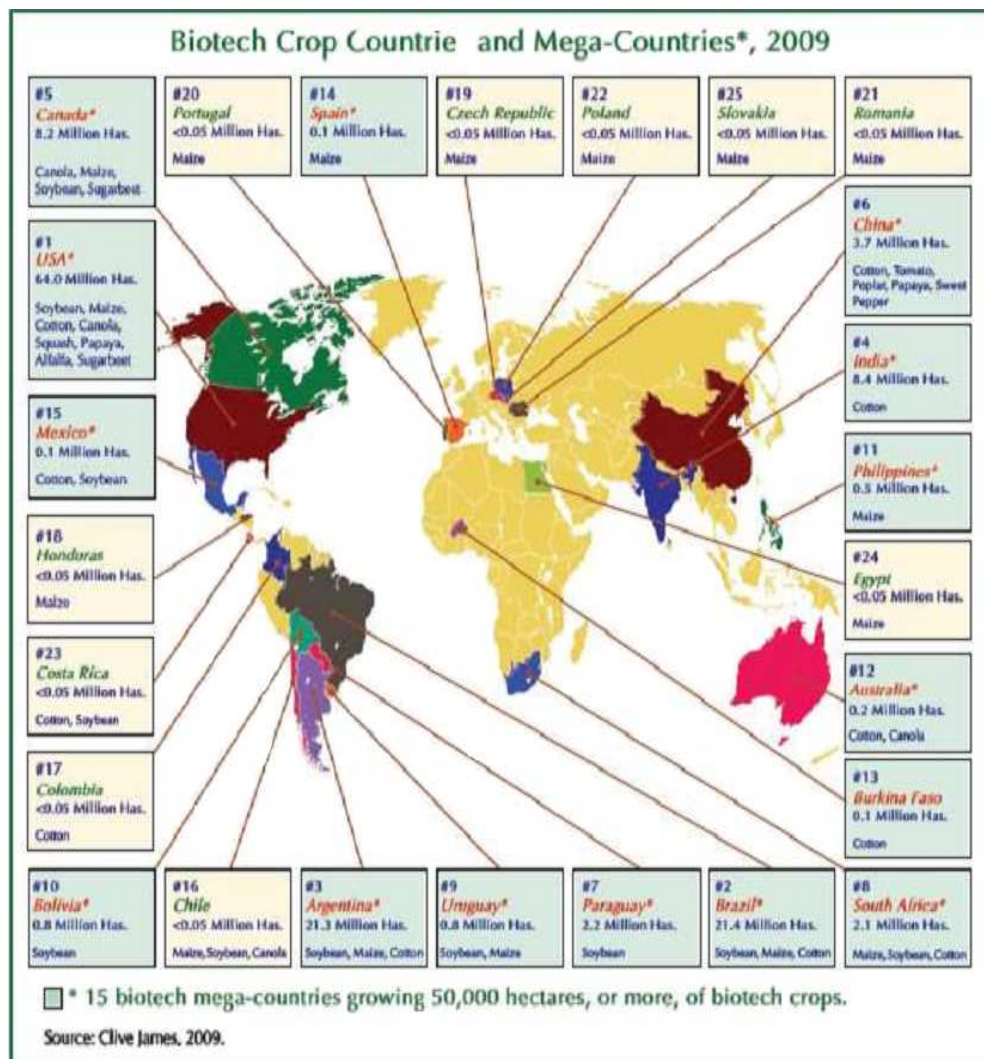


Figura 1.1 Diffusione delle coltivazioni transgeniche nel mondo [ISAAA, 2009]

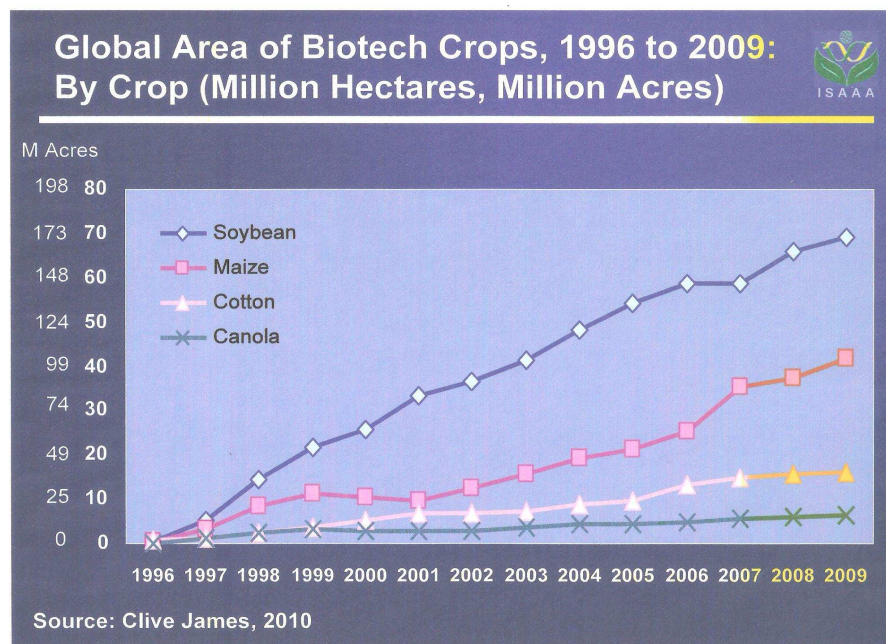


Figura 1.2 Superficie mondiale coltivata con le maggiori varietà biotech ogm (milioni di ettari) [ISAAA, 2009]

Risulta prevedibile che tale trend condurrà presto al diffuso impiego di metodiche che sono oggi prerogativa di laboratori specializzati sia nel campo della produzione sia della certificazione [Gilli, et al. 2000; ISAAA, 2009].

Differenti approcci complementari possono essere utilizzati per indagare su sistemi transgenici. In particolare, la genomica, la proteomica e la metabolomica sono usati come strumenti complementari per la valutazione della sicurezza delle colture geneticamente modificate [Chassy, et al. 2004], ogni tecnica viene utilizzata per dare un contributo specifico alla comprensione globale del sistema [Barros, et al. 2010]. La combinazione di queste tecnologie “*omiche*” è, quindi, in grado di dare una visione completa dell’intero sistema preso in esame.

1.2 Ruolo dei microrganismi in agricoltura: vettori ed ingegneria genetica

Il trasferimento genico offre la possibilità teorica di introdurre in cellule vegetali geni di qualsiasi origine: la successiva replicazione *in vitro* degli elementi cellulari ricombinanti genera piante transgeniche che contengono ed esprimono la nuova informazione genetica [Matzke, et al. 1981]. Il ruolo chiave svolto dai microrganismi in questo processo è molteplice: da una parte hanno rappresentato per anni e, tutt'oggi rappresentano, utili strumenti con costi relativamente bassi per l'isolamento, l'amplificazione ed il clonaggio e la manipolazione del materiale genetico di qualsiasi origine preso come oggetto di studio [Pereira, 2000]; dall'altra i microrganismi batterici e i virus delle piante, opportunamente modificati, vengono utilmente impiegati come vettori per il trasferimento del materiale genetico prescelto [Ding, et al. 1995].

Infine, i microrganismi possono fornire essi stessi geni ed interi operoni plasmidici permettendo alle cellule vegetali ricombinanti di acquisire nuove potenzialità [Peng, et al. 1990].

La maggior parte delle piante transgeniche [Trovato, 1999; Tzfira, et al. 2000; Uchimiya, et al. 1989; Ziemienowicz, 2010] viene generata usando due metodi principali [Kohli, et al. 1998]:

- la trasformazione mediata da *Agrobacterium* [Hiei, et al. 1994; Trovato, 1999].
- la trasformazione diretta con DNA “cannoncino biolistico” [Fakhfakh, et al. 1996; Gan, 1989].

Il metodo mediato da *Agrobacterium* è il metodo di trasformazione che consente al DNA, trasferito con il sistema *Agrobacterium*, di integrarsi per lo più casualmente nel genoma della cellula vegetale, conferendo, la potenzialità di inserirsi all'interno di un gene e di mutagenizzarlo [Hiei, et al. 1997].

Il metodo biolistico “particle bombardment” è il metodo di trasformazione più usato, poiché permette di trattare anche piante appartenenti a specie resistenti ad *Agrobacterium* e trasformare qualsiasi parte della pianta evitando il passaggio, necessario nel caso della trasformazione con *Agrobacterium tumefaciens*, da una fase di coltura *in vitro* prima della rigenerazione di piante transgeniche, provocando, quindi, un aumento notevole di mutazioni indesiderate.

Questo metodo utilizza del DNA “attaccato” a microscopiche “palline” metalliche (oro o tungsteno) che vengono poi “sparate” con appositi “fucili”, all’interno delle cellule da trasformare provocando effetti negativi sul genoma della pianta come: possibili modificazioni nell’espressione di geni esistenti o attivazione di geni silenti [Somers, et al. 2004; FAO/WHO, 2000] Figura 1.3-1.4.

Tale metodo è stato utilizzato, ad esempio, per la produzione del più comune cereale OGM, il mais *Mon810* [Zolla, et al. 2008; Christou, 1997].

Le tecniche biolistiche sono spesso utilizzate per piante monocotiledoni, mentre *Agrobacterium tumefaciens* ed altri agrobatteri sono utilizzati per modificare dicotiledoni, anche se recentemente sono stati messi a punto ceppi di questo batterio in grado di trasformare anche le monocotiledoni [Kumar, et al. 2005].

Entrambe le tecniche di trasformazione avvengono secondo un processo random e portano alla distruzione fisica del genoma (come una mutazione d’inserzione), o ad una regolazione genica “effetto pleiotropico” e ad una possibile inattivazione di geni endogeni [Somers, et al. 2004]. I prodotti trascrizionali dei geni introdotti e possibilmente le vie biochimiche modificate, basati su di essi, possono interagire con la regolazione di altri geni o di vie biochimiche.

Una delle principali preoccupazioni è il possibile verificarsi di effetti indesiderati causati, per esempio, dal sito di integrazione del transgene (come interruzioni di importanti “open reading frames” o sequenze regolatrici), che potrebbe risultare in un metabolismo modificato [Cellini, et al. 2004; Chassy, et al. 2004].



Figura 1.3 Sparo del gene “gene gun” [www.nepadbiosafety.net]

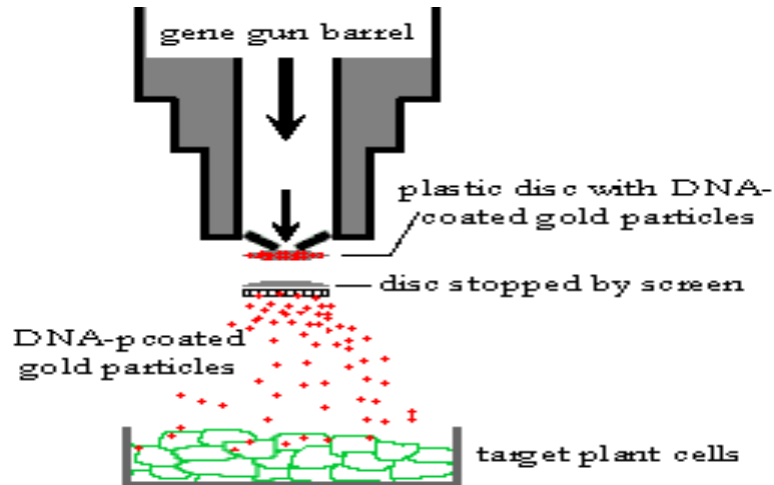


Figura 1.4 Trasferimento genico utilizzando il metodo biolistico “particle bombardment”
[www.nepadbiosafety.net]

1.3 Microrganismi impiegati in agricoltura

Agrobacterium tumefaciens

Alcuni ceppi virulenti del genere *Agrobacterium*, comprendenti le specie *tumefaciens* e *rhizogenes*, sono in grado di infettare lesioni in un ampio spettro di gimnosperme e di angiosperme dicotiledoni. Esse inducono, in corrispondenza della lesione, caratteristiche alterazioni morfologiche e differenziative come la galla del colletto dovuta all'*Agrobacterium tumefaciens*, o la sindrome hairy roots, da *Agrobacterium rhizogenes* [Chen, et al. 2000]. La virulenza di questi ceppi è associata alla presenza di grossi plasmidi, chiamati Ti (tumor inducing) nell'*Agrobacterium tumefaciens* e Ri (root-inducing) nell'*Agrobacterium rhizogenes* [Trovato, 1999; Hooykaas and Schilperoort, 1992; Zupan and Zambryski, 1995].

A differenza di tutte le infezioni ad eziologia batterica note, le patologie indotte dagli Agrobatteri non dipendono dalla presenza continua dell'agente eziologico, ma dalla capacità di trasferire nelle cellule vegetali una porzione del loro DNA, chiamato T-DNA, la cui stabile integrazione ed espressione induce nelle piante infettate le caratteristiche modificazioni morfologiche e differenziative [Bevan, et al. 1984]. Tale plasmide viene incorporato nel DNA nucleare di cellule vegetali e rappresenta la porzione genica che viene trasferita alla pianta in singola copia o più copie generalmente non arrangiata in “tandem” [Chilton, et al. 1983].

La patogenicità *Agrobacterium tumefaciens*, per la sua complessità, non è stata collegata a singoli fattori di virulenza, ma ad un sistema costituito da 3 componenti essenziali [Trovato, 1999; Hooykaas and Schilperoort, 1992; Zupan and Zambryski, 1995; Jeon, et al. 1998]:

- i border repeats, estremità ripetute terminali, che delimitano e definiscono il T-DNA;
- la regione Vir, che comprende la maggior parte dei geni coinvolti nel trasferimento del materiale genetico del T-DNA;
- loci cromosomali di *Agrobacterium* come *att* o *chv* associati alla virulenza del microrganismo [Trovato, 1999; Cangelosi, et al. 1989; Matthysse, 1987].

In particolare, i geni *vir* [Covacci, 1999; Trovato, 1999] sono fondamentali per il trasferimento del T-DNA; *vir-A* codifica per una chinasi che catalizza la fosforilazione del prodotto del gene *vir-G*, che è a sua volta una chinasi nei confronti di altri prodotti di geni *vir*. Il prodotto del gene *vir-D* è una duplice endonucleasi che taglia l'elica del DNA del plasmide in una regione adiacente al T-DNA. Il gene *vir-E* codifica per una proteina legante il DNA a singola elica del plasmide e lo trasporta nella cellula vegetale. Il prodotto di *vir-B* localizzato sulla membrana batterica media il trasferimento della singola elica di DNA dal batterio alla pianta [Trovato, 1999; Hooykaas and Schilperoort, 1992]. Questo sistema di trasferimento del materiale genetico rende peculiare il modello batterico *Agrobacterium tumefaciens* e ha permesso di superare le problematiche relative alla resistenza offerta dalla cellula vegetale alla trasformazione diretta [Trovato, 1999].

Si conoscono in generale due sistemi secretori batterici: quello di tipo III [Lee, 1997] e quello di tipo IV [Christie, et al. 2000], costituiti da complessi proteici che convogliano i fattori di virulenza sintetizzati nel citoplasma batterico in strutture di superficie simili a siringhe a tenuta stagna attraverso le quali gli stessi fattori vengono iniettati nelle cellule procariotiche od eucariotiche [Winans, et al. 1996]. Nel caso dell' *Agrobacterium* [Lipp, et al. 1999], il sistema di trasferimento del T-DNA è stato definito di IV tipo o coniugazione adattata.

Esso presenta delle analogie con quello del retrovirus e il materiale genetico viene trasferito non in un altro microrganismo procariotico come avviene nel trasferimento orizzontale di DNA della coniugazione batterica, ma direttamente

nella cellula eucariote vegetale, fin nel nucleo dove si integra e dirige la sintesi delle auxine [Winans, et al. 1996].

1.4 L'infezione di *Agrobacterium tumefaciens*

Come in tutte le interazioni ospite-patogeno note, la prima fase dell'infezione di *Agrobacterium tumefaciens* è costituita da un contatto cellulare mediato dalla interazione di proteine batteriche di adesione superficiale con specifici recettori della cellula vegetale. Le proteine di *Agrobacterium* implicate nell'ancoraggio alla cellula vegetale sono i prodotti genici dell'insieme di geni complessivamente chiamati *chv*, mentre i recettori vegetali sembrano proteine che mostrano delle similarità con la vitronectina [Trovato, 1999]. Dopo aver stabilito un contatto con la cellula vegetale, *Agrobacterium* è in grado di rilevare la presenza di sostanze rilasciate dai tessuti vegetali lesionati e di rispondere inducendo l'espressione dei geni *vir*.

Alcuni di questi geni “tagliano” T dal plasmidio mentre le proteine sintetizzate a partire dai geni *vir* facilitano l'ingresso di T nelle cellule vegetali, tale ingresso è favorito anche da prodotti genici della pianta come le importine.

I geni presenti in T forniscono l'informazione per produrre proteine che, interferendo con il bilancio ormonale della pianta, provocano proliferazione tumorale e permettono la sintesi da parte delle cellule vegetali di opine, utilizzate specificatamente come fonte di carbonio, un componente fondamentale per il metabolismo del batterio [Hooykaas and Schilperoort, 1992] Figura 1.5.

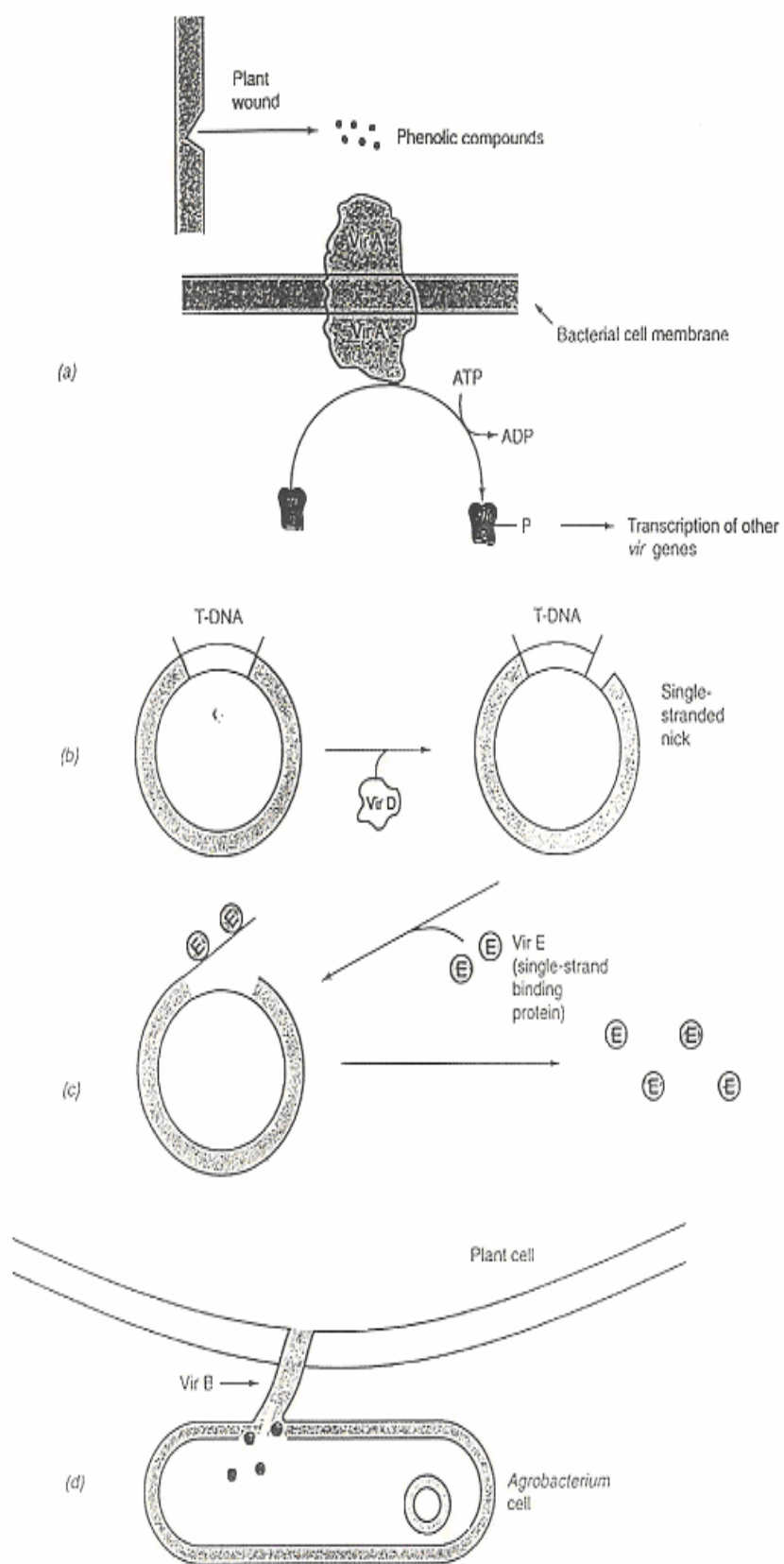


Figura 1.5 Meccanismo di trasferimento del T-DNA da *Agrobacterium tumefaciens* alla cellula della pianta. [Brock, 1997].

1.5 Ingegnerizzazione del plasmide Ti

Per ingegnerizzare le piante si utilizza il plasmide Ti “disarmato” ovvero privo di geni che portano alla formazione del tumore e al loro posto viene inserita la sequenza che si vuole trasferire alla pianta [De Fromond, et al. 1983]. Questa non conterrà solo il gene prescelto che poi dovrà esprimersi nella pianta, ma anche altri frammenti di DNA con funzioni diverse. Innanzitutto deve contenere un “promotore” che regolerà l’espressione del gene. In molti casi, in particolare nelle piante transgeniche che sono ora in commercio, il promotore è “costitutivo” e cioè fa esprimere sempre il gene inserito in tutti i tessuti della pianta e ad alto livello [Kiyokawa, et al. 2009] Figura 1.6.

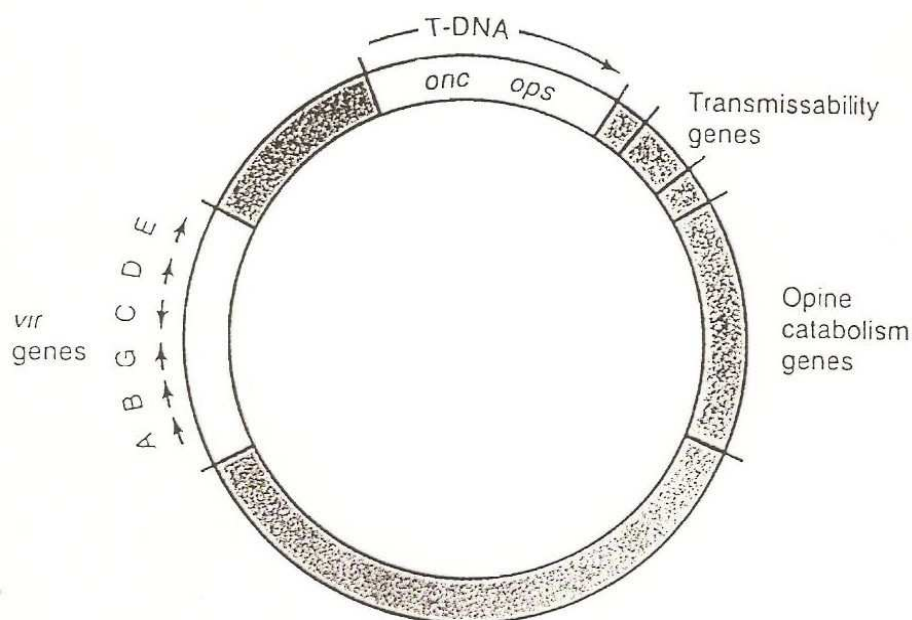


Figura 1.6 Struttura del plasmide Ti di *Agrobacterium tumefaciens*. La regione che viene trasferita è quella del T-DNA; *Vir*, geni per la virulenza; *onc*, oncogeni; *ops*, geni per la sintesi delle opine. [Trovato, 1999]

Le piante transgeniche ottenute devono essere sottoposte ad una serie di controlli; infatti, i rigeneranti primari possono ancora essere contaminati da Agrobatteri e gli stress della rigenerazione e della coltura in vitro possono alterare significativamente i fenotipi. Il primo obiettivo risulta quello di trasferire la pianta in serra ed ottenere una generazione F1 da seme.

Un eventuale carattere transgenico, inoltre, se presente in una sola linea potrebbe essere dovuto ad uno specifico effetto mutageno dell'inserzione del T-DNA o ad un effetto posizione. L'ottenimento di linee transgeniche, indipendenti almeno di seconda generazione, che conservino uno stesso carattere fenotipico che segreghi secondo rapporti mendeliani classici, è una forte evidenza a sostegno di una trasformazione efficace. La verifica finale dell'avvenuta trasformazione viene affidata in genere all'esecuzione di un Southern blot per la presenza del T-DNA inserito [Trovato, 1999] oppure di una PCR-real time.

1.6 *Tomato bushy stunt virus e virus del mosaico del cavolfiore*

Uno dei primi virus [Hehn, et al. 1998], impiegati per la trasformazione delle cellule vegetali, è il virus a RNA *Tomato Bushy Stunt Virus* (TBSV).

Questo assieme al *virus del mosaico del cavolfiore* (CaMV) [Assaad, et al. 1990; Dagless, et al. 1997; Gardner, et al. 1981; Weber, et al. 1992] viene usato per introdurre DNA estraneo nelle cellule vegetali passando attraverso un intermedio costituito da cDNA. In particolare, molto usato è un costrutto che deriva dal TBSV cDNA con a monte il promotore 35S del CaMV ed a valle la nopalina sintetasi polyA come terminatore. Il motivo del loro vasto utilizzo risiede nella velocità di replicazione di questi virus [Ronald, 1999], nell'efficienza di espressione genica, nonché nel loro ampio spettro d'ospite, che li hanno resi adattabili alle più svariate specie vegetali [Scholthof, et al. 1992] Figura 1.7.

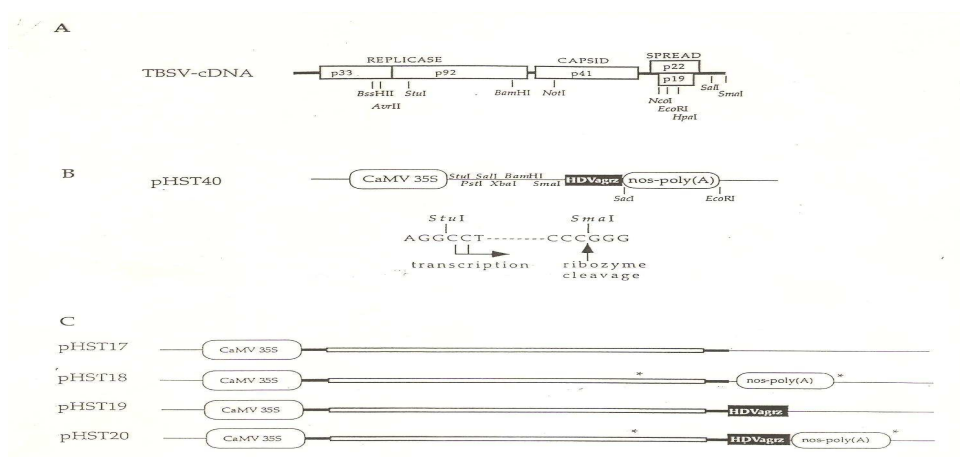


Figura 1.7 Plasmidi e sequenze di regolazione. [Scholthof, 1999]

1.7 *Bacillus thuringiensis*

Altro batterio, coinvolto nella biotecnologia vegetale, è il *Bacillus thuringiensis*, microrganismo sporigeno Gram positivo del suolo, dotato del gene *cry* che produce una proteina con azione insetticida [Rauschen, et al. 2010].

L'utilità di questo batterio non deriva dalla presenza di plasmidi e di sistemi secretori particolari, infatti non viene utilizzato come vettore di materiale genetico, bensì deriva dalla particolare informazione genetica che esso possiede: la capacità di concentrare all'interno della propria cellula dei cristalli di natura proteica che vengono convertiti in peptidi tossici attraverso proteasi presenti esclusivamente nell'intestino degli insetti, in modo tale da conferire una particolare attività insetticida [Van Rie, et al. 1990; Perlak, et al. 1990].

Questo prodotto di natura proteica viene depositato all'esterno della spora durante il processo della sporulazione, sotto forma di un cristallo: corpo parasporale o tossina *bt* [Jaquet, et al. 1987]. Queste spore sono normalmente utilizzate nell'agricoltura biologica e sono distribuite direttamente sulle piante, proteggendo così i raccolti dalle larve di numerosi insetti (Figura 1.8).

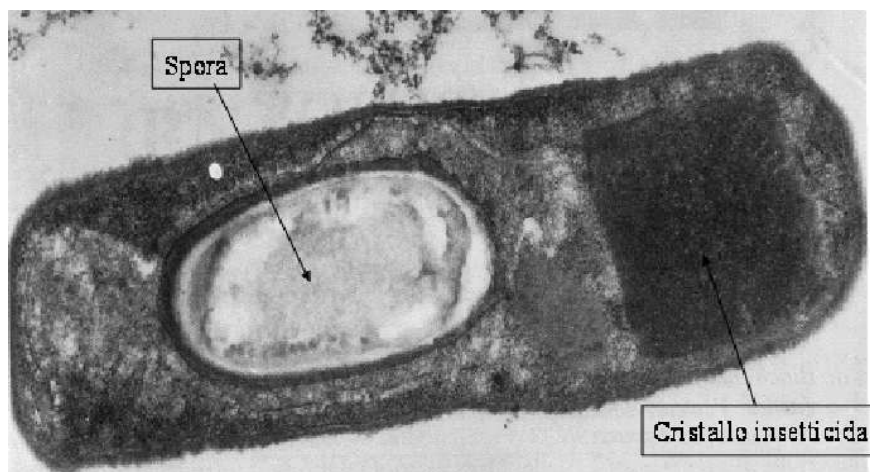


Figura 1.8 *Bacillus thuringiensis* [De Maagd, et al. 2001]

Il gene batterico *cryIA(b)*, che codifica per la tossina *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), è stato utilizzato per produrre piante transgeniche come *Zea Mays* che esprimono la tossina *Bt*; tale gene del *Bacillus thuringiensis* del ceppo HD-1 [Geiser, et al. 1986] è insetticida di solo insetti lepidotteri *Ostrinia nubilalis* (European Corn Borer, ECB), principale pericolo per le coltivazioni di mais in U.S.A., Canada ed Europa [Betz, et al. 2000]. Il mais ingegnerizzato resiste all'ECB attraverso la produzione di un proprio insetticida. Questa linea è stata sviluppata introducendo il gene *cryIA(b)*, isolato dal *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), in una linea di mais attraverso trasformazione biolistica "particle bombardment". Le proteine *cry* (da Crystal, cristallo), di cui *cryIA(b)* è soltanto un esempio, agiscono attraverso un legame selettivo a siti specifici, localizzati nell'intestino delle specie di insetti suscettibili. In seguito al legame si formano dei pori che causano la perdita del contenuto cellulare e lisi, provocando la morte della larva per l'impossibilità di nutrirsi. [Knowles and Dow, 1993].

La proteina *cryIA(b)* è letale soltanto quando viene ingerita dalle larve di lepidotteri e la sua specificità d'azione è attribuibile alla presenza di specifici siti di legame nell'insetto bersaglio.

Non esistendo siti di legame per le delta-endotossine *Bt* sulla superficie delle cellule intestinali di mammifero, gli animali e l'uomo non sono suscettibili a queste proteine [Lee, et al. 1995].

1.8 Applicazioni pratiche

La nascita dell'ingegneria genetica insieme alle più moderne biotecnologie hanno portato ad un miglioramento delle piante, in quanto è stato possibile modificare e trasformare il loro DNA. Attualmente, l'ingegneria genetica è un campo di ricerca molto attivo, poiché ha permesso di selezionare i geni che corrispondono a determinati tratti e di spostarli da una pianta all'altra con un procedimento che risulta più preciso e selettivo di quello tradizionale oltre che molto più rapido [Meyer, 1995]. Grazie a queste manipolazioni di DNA, le piante transgeniche presentano una migliore resistenza agli erbicidi (principalmente glifosate o glufosinato, cosiddetti erbicidi ad ampio spettro), insetti, virus, e forniscono migliori proprietà nutrizionali [Koziel, et al. 1993; Gao, et al. 2000].

Le piante transgeniche, che la comunità scientifica tende a considerare come sistema modello per le varie discipline (come la genetica, la biologia molecolare, la biochimica e la farmacologia), sono *Arabidopsis*, poiché il suo genoma è stato sequenziato [The Arabidopsis Initiative, 2000], mais e riso per il ruolo preminente che occupano nell'agricoltura del globo, seguiti da altri cereali e leguminose.

Il riso rimane il capostipite delle piante di coltivazione più comune rese vantaggiosamente transgeniche, ora affiancato da molti altri vegetali come mais, soia, pomodori, patate, tabacco, lattuga, cotone, fragole, cicoria, pioppo, noce e melo [Goto, et al. 1999] Tabella 1.1.

Rank	Country	Area (million hectares)	Biotech Crops
1*	USA*	64.0	Soybean, maize, cotton, canola, squash, papaya, alfalfa, sugarbeet
2*	Brazil*	21.4	Soybean, maize, cotton
3*	Argentina*	21.3	Soybean, maize, cotton
4*	India*	8.4	Cotton
5*	Canada*	8.2	Canola, maize, soybean, sugarbeet
6*	China*	3.7	Cotton, tomato, poplar, papaya, sweet pepper
7*	Paraguay*	2.2	Soybean
8*	South Africa*	2.1	Maize, soybean, cotton
9*	Uruguay*	0.8	Soybean, maize
10*	Bolivia*	0.8	Soybean
11*	Philippines*	0.5	Maize
12*	Australia*	0.2	Cotton, canola
13*	Burkina Faso*	0.1	Cotton
14*	Spain*	0.1	Maize
15*	Mexico*	0.1	Cotton, soybean
16	Chile	<0.1	Maize, soybean, canola
17	Colombia	<0.1	Cotton
18	Honduras	<0.1	Maize
19	Czech Republic	<0.1	Maize
20	Portugal	<0.1	Maize
21	Romania	<0.1	Maize
22	Poland	<0.1	Maize
23	Costa Rica	<0.1	Cotton, soybean
24	Egypt	<0.1	Maize
25	Slovakia	<0.1	Maize

* 15 biotech mega-countries growing 50,000 hectares, or more, of biotech crops
Source: Clive James, 2009.

Tabella 1.1 Superficie mondiale occupata dalle varietà biotech ogm (milioni di ettari) [ISAAA, 2009].

MAIS

Il granturco è una pianta erbacea della famiglia delle graminacee (*Zea Mays*), originaria dell'America e coltivata diffusamente nelle regioni temperate con grosse cariossidi gialle, rosse o viola a seconda delle varietà ampiamente impiegate nell'allevamento e nell'industria alimentare.

La forma modificata geneticamente [Shen, et al. 1999; Stam, et al. 1997] per l'acquisizione di proprietà insetticide ha ricevuto l'autorizzazione alla commercializzazione in USA ed in Canada e l'avvallo della Commissione Europea 97/98/EC [EC, 1997] (direttive inerenti sostanze chimiche, rischi industriali e biotecnologie).

Si tratta di piante che consistono in linee pure ed ibridi derivanti dalla linea di granturco *Zea Mays L.* trasformata mediante plasmidi contenenti:

- tolleranza all'erbicida glufosinato ammonio conferita da una copia del gene “bar” di *Streptomyces Hygroscopicus*, regolato dal promotore e terminatore 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV);
- due copie del gene CryA(b) per la proteina di controllo degli insetti (parte attiva della tossina *bt* del *Bacillus thuringensis subsp. Kurstaki*, ceppo HD1) contenente l'introne 9 del gene fosfoenolpiruvato carbossilasi del granturco: una delle copie è regolata dal promotore dello stesso gene, mentre l'altra da un promotore di una proteinchinasi calcio-dipendente del granturco, in entrambe il terminatore 35S del CaMV;
- un gene procariotico non espresso, *Bla*, che codifica per una beta lattamasi che conferisce resistenza all'ampicillina [Assaad, et al. 1990].

La Commissione delle Comunità Europee mediante una *Direttiva 96/281/EC* [EC, 1996] sostiene: “...non c'è motivo di ritenere che l'inserimento dei geni codificati per la tolleranza al glifosate nel granturco, come pure nella soia, comporti effetti negativi per la salute umana o per l'ambiente”.

1.9 Organizzazione Mondiale della Sanità e gli OGM

Da decenni quasi tutti i paesi impongono una valutazione quantitativa del rischio legato all'utilizzo di additivi alimentari, come pure alla presenza di residui trattamenti fitosanitari e veterinari e di altri contaminanti "risk assessment" [FAO/WHO, 1996; FAO/WHO, 2000; EFSA, 2006a].

Per contro, nessuna formale valutazione del rischio è mai stata imposta ai fabbricanti di nuovi prodotti alimentari o di versioni nuove di vecchi alimenti.

In particolare, nessun ceppo microbico o altro organismo vegetale (eccetto alcuni noti per essere produttori di tossine), che sia stato sviluppato mediante classiche tecniche di selezione ed ibridizzazione, ha mai dovuto essere sottoposto ad una formale valutazione della sua sicurezza.

Alcuni settori delle biotecnologie alimentari affermano che non esistono differenze qualitative tra metodi di coltivazione, allevamento e trasformazione tradizionali e quelli attuati con le metodologie genetiche. Selezione dei raccolti, selezione di specie e razze da zootecnia, come pure l'impiego di sostanze per modificare gli alimenti sono sempre stati utilizzati a fini di miglioramento e conservazione dei cibi [Jermini, 2000]. Questa tesi della continuità come pure quella della "sostanziale equivalenza", che può essere determinata sia a livello di organismo che a livello di componente alimentare, come vedremo più avanti, sono state sposate anche dall'organizzazione Mondiale della Sanità. Con esse si persegue soltanto la soluzione dei quesiti legati alla salubrità degli alimenti e non si mira a cancellare le preoccupazioni etiche sulle biotecnologie [Matsuki, et al. 1989]. Per l'OMS la procedura da adottare per valutare gli OGM è identica a quella valida per forme naturali di alterazioni genomiche.

Le considerazioni di base sono legate alle conseguenze dirette dal punto di vista nutrizionale, tossicologico, allergologico di sostanze la cui sintesi è stata introdotta con il trasferimento genico. Si valutano, inoltre, i possibili effetti alterati di una sostanza, sia diretti sia indiretti. Infine, vengono considerate le conseguenze funzionali delle modifiche genomiche introdotte, come l'interruzione di sequenze di codifica e/o controllo particolari con produzione indiretta di nuove componenti o di alterati livelli di componenti esistenti [Jermini, 2000].

Il “principio dell’equivalenza sostanziale” è un processo comparativo tra il nuovo alimento e quello convenzionale [Kok and Kuiper, 2003].

Prodotti per i quali viene dimostrata l’equivalenza sostanziale sono da ritenersi altrettanto sicuri che non gli alimenti di riferimento senza ulteriori analisi supplementari. Prodotti sostanzialmente equivalenti con definite differenze saranno sottoposti ad un completamento di analisi specifico e focalizzato sulle differenze identificate. La verifica della sicurezza in questi casi si concentra sul prodotto del gene estraneo introdotto sia in modo diretto sia indiretto [Jermini, 2000]. Importante prerogativa per la sicurezza e l’equivalenza sostanziale dei prodotti OGM è un approccio basato sulla valutazione “case by case” ovvero caso per caso. Una delle principali preoccupazioni è il possibile verificarsi di effetti indesiderati in un metabolismo modificato [Cellini, et al. 2004; Chassy, et al. 2004] che ha portato alla realizzazione di diverse normative tra le varie nazioni, per quanto riguarda lo sviluppo, la crescita o la commercializzazione dei prodotti geneticamente modificati [EC, 2003a; EC, 2003b].

E’ alta priorità per le autorità competenti verificare la sicurezza dei prodotti (OGM), quindi vi è la necessità di tecniche “omiche” capaci di individuare qualsiasi effetto indesiderato a seguito di una modificazione genetica [Le Gall, et al. 2003]. Un approccio analitico per determinare la composizione chimica dei prodotti OGM è la tecnica NMR, utilizzata per l’identificazione e la quantificazione dei metaboliti intracellulari ed extracellulari, poichè dà un “fingerprint” metabolico del sistema in esame [Fan, 1996].

La Risonanza Magnetica Nucleare permette la rilevazione simultanea di molti composti in quantità paragonabili a quelli rilevati utilizzando saggi biochimici standard e non richiede procedure di estrazioni specifiche per ogni classe di composti. Utilizzando l’NMR, *in vivo* e *in vitro*, le alterazioni metaboliche sono state scoperte in sistemi biologici che sono di primaria importanza [Krishnan, et al. 2005; Govindaraju, et al. 2000], e questi includono alimenti transgenici come il pomodoro transgenico [Le Gall, et al. 2003; Mattoo, et al. 2006], la lattuga transgenica [Sobolev, et al. 2007] ed il mais transgenico [Manetti, et al. 2006; Piccioni, et al. 2009].

1.10 Principi di valutazione di sicurezza di alimenti GM

I principi generali per l'analisi del rischio di alimenti GM sono raccolti nel *Codex Alimentarius* [Codex Alimentarius, 2003]. I principi di sicurezza sanciti dal *Codex* per gli alimenti GM, richiedono la ricerca e la valutazione di:

- Effetti diretti sulla salute (tossicità)
- Tendenza a provocare reazioni allergiche (allergenicità)
- Componenti specifiche delle proprietà nutrizionali o tossiche
- Stabilità del gene inserito
- Effetti nutrizionali associati con la modifica genetica specifica
- Qualsiasi altro effetto inatteso in grado di derivare dall'inserzione del gene, come la formazione di nuovi metaboliti o la loro alterazione a livello quantitativo negli alimenti, a causa dell'attivazione di alterate vie metaboliche.

1.11 OGM e Allergenicità

Le allergie alimentari sono reazioni avverse ai cibi sani o componenti alimentari e manifestano un'anormale risposta del sistema immunitario a proteine specifiche presenti in alimenti, note come "allergeni" [Sampson and Burks, 1996]. Questi ultimi si ottengono in seguito all'inserzione del transgene che comporta variazioni nella composizione proteica di molti alimenti OGM. Le modifiche genetiche possono generare inattese intolleranze e/o sensibilizzazioni in popolazioni sensibili, disorientando il consumatore rispetto alla specifica compatibilità con l'alimento. Questo si può verificare a diversi livelli della catena alimentare. Tuttavia, l'alimentazione animale, mangimi prodotti con piante GM potrebbero alterare la composizione chimica dei prodotti di origine animale; ad esempio, i metaboliti che conferiscono alla pianta resistenza a parassiti o a funghi potrebbero essere assunti e metabolizzati dagli animali formando nuovi composti chimici. Questi prodotti si potrebbero depositare nei tessuti degli animali ed essere rilasciati nel latte o nelle uova provocando dei rischi allergologici sulla salute umana.

Le allergie alimentari possono provocare diversi tipi di risposta immunologica, le più comuni allergie alimentari sono mediate da specifici allergeni con produzione di immunoglobuline "IgE". Le reazioni mediate dalle IgE sono immediate reazioni all'ipersensibilità, poichè i sintomi si manifestano in pochi minuti o poche ore dall'ingestione del cibo.

La potenziale allergenicità è una preoccupazione dovuta all'introduzione di proteine derivate dai cibi transgenici nella dieta umana; per testare l'allergenicità di alimenti GM viene usata la digestione *in vitro*, che potrebbe essere differente dalla digestione gastrica della proteina ricombinante presente negli stessi, in quanto si potrebbero produrre piccoli peptidi di lunghezza diversa, esponendo epitopi differenti con potenziale allergenico diverso. Utilizzando il modello animale è possibile valutare la risposta immunitaria ad un alimento GM in seguito alla reale digestione della proteina ricombinante [FAO/WHO, 2001; Finamore, et al. 2008].

La digestione avviene nei siti della mucosa intestinale, dove viene deciso se impedire o innescare reazioni immunitarie avverse, dirette verso gli antigeni intro-

dotti con gli alimenti, determinando lo sviluppo o meno di processi infiammatori. Il sistema immunitario intestinale è quindi fondamentale per rispondere agli antigeni alimentari, incluse le proteine di alimenti GM.

Un dato certo è che i fenomeni allergici di natura alimentare sono in forte aumento nel mondo e la causa non può essere attribuita unicamente alla comparsa sul mercato di alimenti di origine transgenica. Un esempio emblematico a questo riguardo è quello della soia geneticamente manipolata, nel tentativo di aumentarne il contenuto di metionina e cisteina, con l'aggiunta di un gene che deriva dalla noce brasiliana, nota per le sue potenzialità allergeniche [Metcalf, et al. 1996]. L'ingegnerizzazione ha condotto al trasferimento anche dei geni per l'albumina 2S, il principale allergene della noce.

Il problema fondamentale è quello di garantire che gli OGM stessi non vengano rilasciati nell'ambiente attraverso le acque di scarico, rifiuti solidi contaminati, ricambio di aria, filtri di cappe e condizionatori, insetti, incidenti in casi di stoccaggio, trasporto e manipolazione, visto che essi, in alcuni casi, potrebbero essere potenzialmente tossici.

1.12 OGM e Problematiche biologiche

Nell'ambito della valutazione del rischio ambientale, che la coltivazione di questi organismi geneticamente modificati può comportare sulla stabilità e sull'equilibrio degli ecosistemi, il problema principale è quello relativo al cosiddetto "inquinamento genetico" [Nordlee, et al. 1996]. I pollini di questi ibridi possono diffondere nell'ambiente anche per alcuni chilometri dalla coltura di partenza, andare ad incrociarsi con varietà naturali, a causare la diffusione incontrollata dei geni artificialmente immessi nell'OGM. Gli scambi genetici solitamente avvengono nel suolo in zone, dove la comunità microbica è presente maggiormente. Tali zone vengono indicate come "zone calde" e sono caratterizzate da un buon contenuto in sostanza organica, necessario nutrimento per la comunità microbica, e da vantaggiose caratteristiche chimico-fisiche del suolo come un buon contenuto idrico, una buona aerazione e valori ottimali di pH [Widmer, et al. 1997]. Il suolo esercita numerose funzioni essenziali per l'ecosistema terrestre fungendo, da supporto per la vita vegetale ed animale, per i cicli nutritivi, per la degradazione di qualsiasi sostanza che ad esso giunge e per la depurazione delle acque. Un ruolo di vitale importanza per lo svolgimento di queste funzioni è svolto dai microrganismi; essi intervengono in diverse attività: nella mineralizzazione della sostanza organica, nella sintesi dell'azoto, nella formazione dell'humus e agiscono sulla mobilitazione degli elementi minerali ed instaurano rapporti di interazione con le piante, determinando la qualità e la fertilità del suolo. Nel suolo vengono rilasciate delle tossine transgeniche, sia insetticide sia fungicide, da parte delle radici delle piante GM che potrebbero provocare effetti negativi sulla biodiversità [Widmer, et al. 1996].

La persistenza del DNA nel suolo sembra dipendere da fattori biotici ed abiotici, in particolare influisce la diversa composizione minerale del suolo; infatti i minerali argillosi sono molto reattivi nell'adsorbire il DNA [Bertolla, et al. 1999]. In particolari condizioni ambientali, il DNA rilasciato dalle piante transgeniche può permanere per lunghi periodi nel suolo. Per monitorare gli effetti delle piante GM sul suolo possono essere utilizzati come indicatori, per la funzionalità dell'ecosistema suolo, batteri e funghi, mentre per i processi del suolo i microrganismi, poiché essi sono sensibili alle pressioni selettive dell'ambiente ovvero cambiano struttura e composizione molto rapidamente.

1.13 Impatto delle piante GM: accumulo di tossine nel suolo

Le comunità microbiche del suolo e della rizosfera possono essere alterate dalla presenza di piante geneticamente modificate (PGM). Tali alterazioni possono avvenire mediante due vie:

- diretta quando la proteina transgenica, prodotta da una PGM, specifica contro un determinato parassita, può essere direttamente tossica verso organismi innocui o benefici presenti nel suolo;
- indiretta quando si verificano delle modifiche non intenzionali nell'apparato radicale delle piante, da un punto di vista fisiologico, o nella composizione chimica degli essudati radicali e di altri composti rilasciati dalla radice [Dunfield and Germida, 2004; Pietramellara, et al. 2002].

E' noto il rilascio della tossina *Bt* dalle radici di mais transgenico (*Bt*) nella rizosfera, dove mantiene la sua attività insetticida per almeno 234 giorni, poiché in grado di legarsi alle particelle di argilla del suolo, dove è protetta dalla degradazione microbica [Saxena and Stotzki, 2000]. Da alcuni studi è emerso un effetto negativo del terreno contenente i residui di mais della varietà *Bt* 11 sulla infettività dei funghi MA (micorrizici arbuscolari) ed una riduzione della respirazione del suolo [Castaldini, et al. 2005]. Dai dati sperimentali ottenuti è stato possibile confermare che i funghi MA possono essere dei validi indicatori capaci di valutare i potenziali rischi, legati al rilascio nell'ambiente di piante GM. Ancora oggi si effettuano numerosi studi circa la degradazione della proteina *Bt* nel suolo, ma per verificare la degradabilità dei residui vegetali di piante GM *Bt* in suoli ed ambienti climatici diversi è necessario un approccio basato sul caso per caso [Hopkins and Gregorich, 2004].

CAPITOLO 2

LA METABOLOMICA

2.1 Metaboloma e metabolomica

I sistemi biologici comprendono un approccio olistico allo studio della biologia e l'obiettivo è di monitorare simultaneamente tutti i processi biologici operanti in un sistema integrato. Attraverso lo studio dei sistemi, è possibile visualizzare come i singoli pathways o le reti metaboliche sono interconnesse.

Questo approccio è basato su solide strutture teoriche e sull'uso di modelli informatici per spiegare osservazioni sperimentali; tali studi sono comunemente riferiti a trascrittomica, proteomica e metabolomica [Summer, et al. 2003].

Con il termine metaboloma, coniato da *Oliver* [Oliver, et al. 1998], ci si riferisce al *set* completo dei metaboliti a basso peso molecolare presenti in un sistema biologico: cellule, tessuti, organi, fluidi biologici, o un intero organismo.

Il metaboloma è costituito dall'endometaboloma, insieme dei metaboliti intracellulari, e dall'esometaboloma, insieme dei metaboliti che vengono secreti nel terreno di crescita o nel fluido extracellulare [Nielsen, et al. 2005].

Pertanto, esso rappresenta, l'insieme dei prodotti finali della funzione genica.

Il termine metabolomica (o metabonomica) è stato introdotto per indicare le tecniche in grado di identificare e quantificare il metaboloma e consiste nell'analisi globale di tutti i metaboliti presenti in un campione e dipendenti dallo stato fisiopatologico e dallo sviluppo della cellula [Wecknerth, et al. 2005; Nicholson, et al. 1999].

La nascita delle discipline omiche (genomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica) ha determinato la transizione da un'analisi riduzionistica della complessità biologica, in cui la rappresentazione di un sistema biologico è basata su una visione gerarchica, dai geni, ai trascritti, alle proteine, ai metaboliti, e su un approccio globale o integrato in cui il controllo sul funzionamento di un sistema biologico non è esercitato attraverso una struttura gerarchica, ma attraverso una struttura organizzata, ricca di interconnessioni fra patrimonio genetico, proteico e metabolico, come illustrato in Figura 2.1.

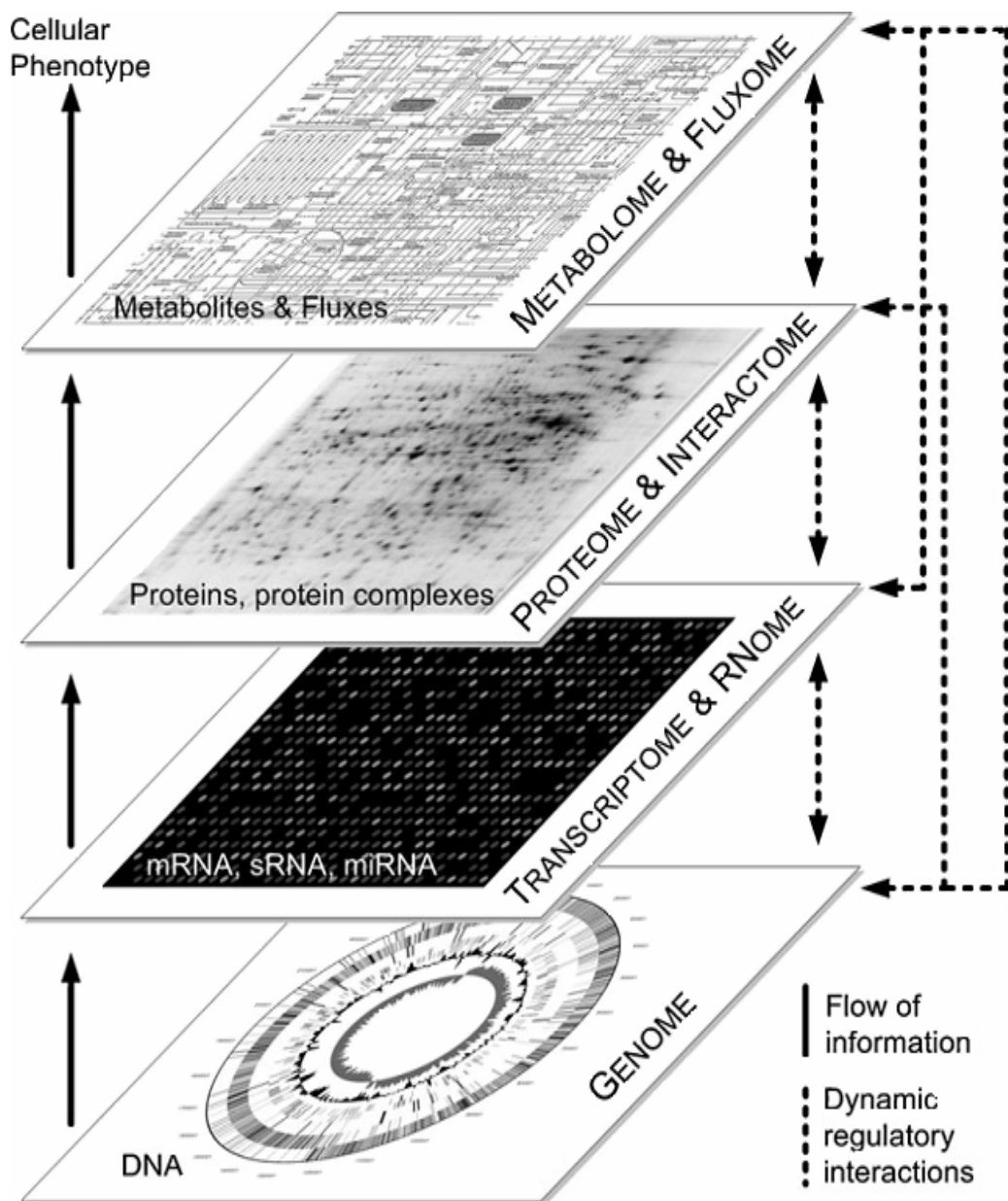


Figura 2.1 Flusso delle informazioni biologiche [Kohlstedt, et al. 2010]

Il trascrittoma, il proteoma e il metaboloma, riflettono funzioni complesse delle diverse componenti cellulari. La trascrizione di un certo gene è una funzione della concentrazione di fattori di trascrizione e dell'attività di chinasi e recettori che agiscono a monte. Similmente, la concentrazione di una certa proteina è determinata dalla concentrazione del corrispondente mRNA e dall'attività dell'apparato per la traduzione delle proteine chinasi, di fosfatasi e proteasi.

Per quanto riguarda la concentrazione dei metaboliti, essa ha una funzione molto più complessa, poiché dipende dall'attivazione genica, dall'attività dei trascritti e dai flussi nei diversi *pathways* metabolici; nella Figura 2.2 sono illustrate le interazioni sopra citate:

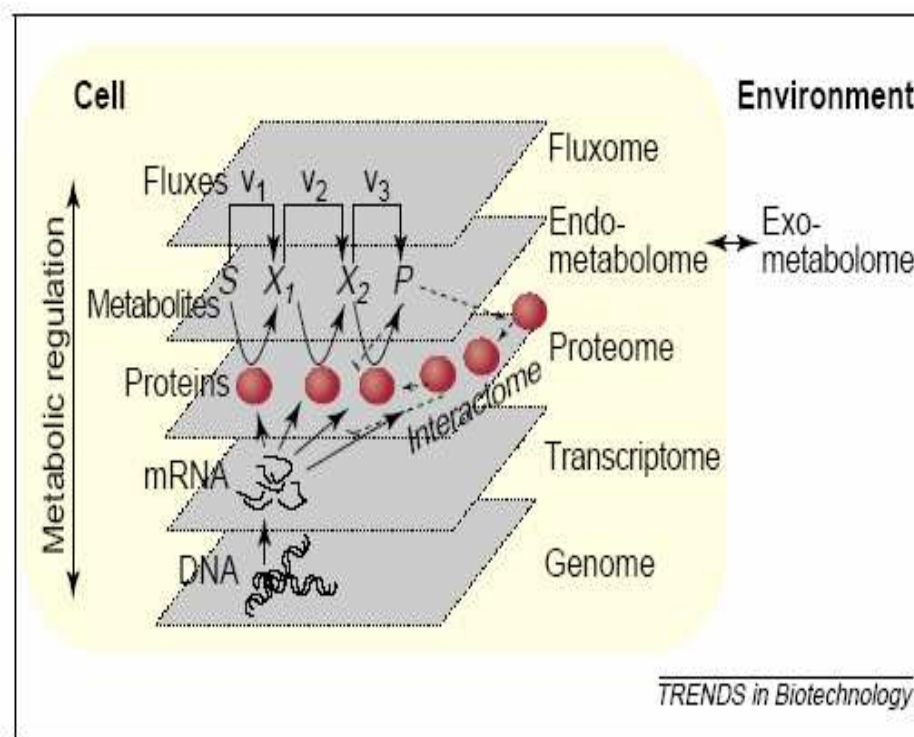


Figura 2.2 Interazione fra le componenti dei diversi livelli di organizzazione cellulare. [Nielsen, et al. 2005]

L'interazione diventa sempre più complessa partendo dal basso verso l'alto, quindi metaboloma e flussoma rappresentano delle funzioni integrative di tutti gli altri livelli di organizzazione ed è in questo che risiede l'importanza della loro analisi.

E' stato dimostrato che l'analisi del metaboloma e dei flussi, nei percorsi metabolici interconnessi, dà una visione reale e sensibile del sistema biologico, in relazione ai cambiamenti dipendenti dall'ambiente esterno.

In biologia sono numerose le applicazioni dell'analisi del metaboloma che consentono di:

- risalire alla funzione di un gene esaminando gli effetti di una perturbazione sulla concentrazione dei metaboliti;

-
- scoprire nuovi *pathways* nei sistemi studiati e costruire modelli predittivi metabolici;
 - confrontare negli organismi, geneticamente modificati la variazione adattativa del sistema alla modifica apportata;
 - misurare i flussi metabolici delle cellule attraverso l'analisi isotopomerica e l'impiego di modelli idonei come, ad esempio, la *Metabolic Flux Analysis* [Wiechert, 2001];
 - valutare i fattori di controllo metabolici mediante anche l'utilizzazione di opportuni modelli come la *Metabolic Control Analysis* [Comin Anduix, et al. 2001].

L'analisi del metaboloma può essere condotta seguendo diversi approcci (Figura 2.3).

Per semplicità di descrizione si riportano le definizioni dei quattro principali approcci che si riscontrano nella letteratura scientifica internazionale [Nielsen, et al. 2005]:

1) *METABOLITE TARGET ANALYSIS*

Riguarda la misura degli effetti di un processo di perturbazione di un gene o un gruppo di geni sui livelli di uno specifico metabolita.

È perciò un'analisi ristretta a quel particolare sistema enzimatico interessato direttamente dalla perturbazione.

2) *METABOLITE/METABOLIC PROFILING*

È l'analisi di una certa classe di composti (carboidrati, amminoacidi, osmoliti, alcoli, nucleotidi e fenoli) con lo scopo di poter quantificare tutti i metaboliti di un *pathway* specifico o un set di metaboliti comuni nei diversi *pathways*.

3) *METABOLOMICA*

È l'analisi del maggior numero possibile di metaboliti presenti in uno specifico campione biologico; lo scopo è la conoscenza del funzionamento del sistema attraverso la quantificazione dei livelli di tutti i metaboliti possibili.

4) *METABOLIC FINGERPRINTING*

Non dà un'informazione quantitativa sulle concentrazioni dei metaboliti, ma dà una “istantanea” dello stato metabolico del sistema biologico attraverso gli spettri ricavati dalla Spettrometria di Massa o dalla Spettroscopia NMR; esso è usato per classificare mutanti o modificazioni transgeniche.

Un'estensione di questo approccio è il cosiddetto “*metabolic footprinting*” le cellule si fanno crescere in un *medium* ricco e definito per poi effettuare l'analisi dell'esometaboloma in tempi diversi così da valutare l'*uptake* e la secrezione dei metaboliti.

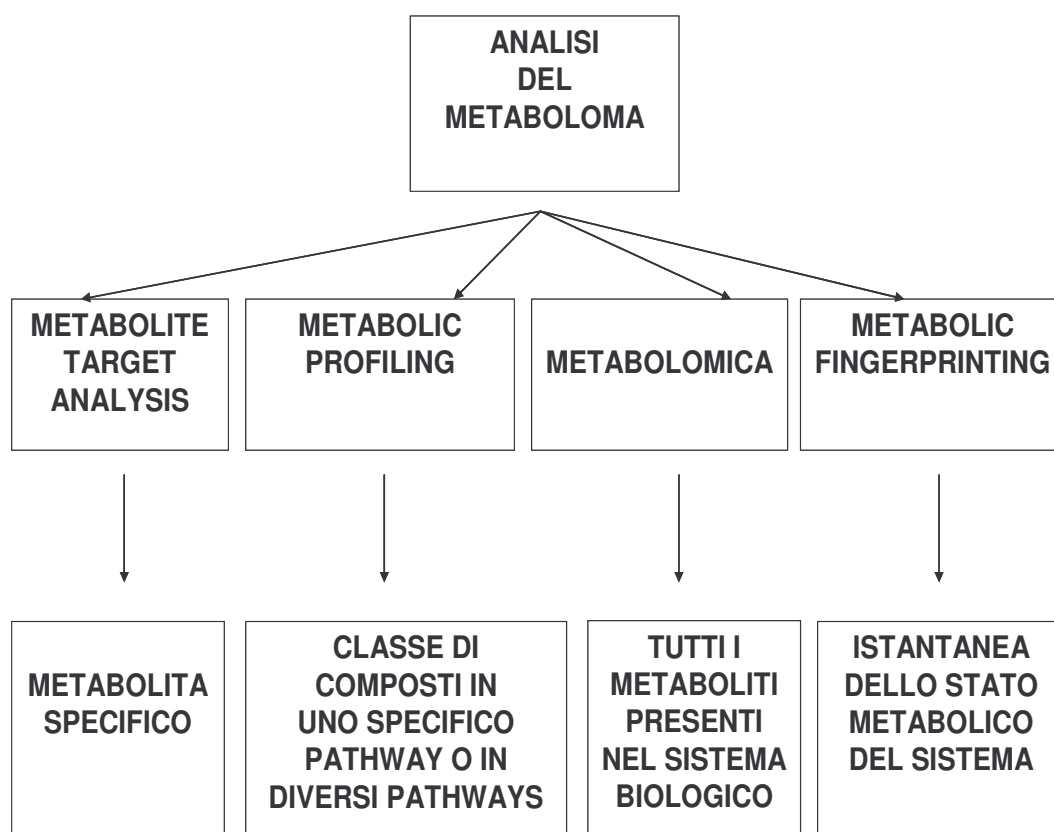


Figura 2.3 Schema riepilogativo degli approcci relativi alla metabolomica

Data la diversità chimica e fisica delle piccole molecole biologiche, è sorta la necessità di sviluppare protocolli applicabili all'intero metaboloma.

Per l'analisi del metaboloma vengono utilizzate le seguenti tecniche: Risonanza Magnetica Nucleare, Spettrometria di Massa, Spettrometria Infrarosso in trasformata di *Fourier* e tecniche cromatografiche associate alla spettrometria di massa.

In Tabella 2.1 viene riportato il seguente schema:

TECNICA	DESCRIZIONE	VANTAGGI	SVANTAGGI
GC – MS	Utilizza prima la gascromatografia per separare una miscela di metaboliti, poi la spettroscopia di massa per identificare i diversi metaboliti.	Metodo relativamente economico e riproducibile, alto grado di sensibilità.	La preparazione del campione può essere un fattore limitante: richiede molto tempo. Non tutti i composti sono adatti per la GC.
LC – MS	Approccio simile alla GC – MS eccetto che la separazione avviene durante la cromatografia liquida.	Questo metodo viene utilizzato al posto della GC – MS, la preparazione del campione non richiede tempo eccessivo, sensibilità simile alla GC – MS.	Molto costoso rispetto alla GC – MS. La riproducibilità è difficile da controllare rispetto alla gascromatografia.
RMN	Questo approccio è ampiamente utilizzato dalla industria farmaceutica e permette lo screening di campioni di urine, plasma e sangue.	Tecnica non invasiva, utile nell'analisi metabolomica anche dei tessuti umani, alto grado di riproducibilità, relativamente semplice per l'identificazione dei metaboliti nel campione in spettri 1 D.	Bassa sensibilità rispetto alla spettroscopia di massa, i metaboliti co-risonanti possono essere quantificati con difficoltà. Un numero di metaboliti inferiore rispetto alla massa può essere quantificato.
FT – IR	Usa le frequenze vibrazionali dei metaboliti e produce "l'impronta" del metabolismo.	A buon mercato e adatto per un primo screening.	Non potente nel discriminare i metaboliti fra una classe simile di composti.

Tabella 2.1 Schema delle tecniche usate per l'analisi del metaboloma.

La procedura metodologica dipende dalla tipologia del campione da analizzare. Ad esempio, campioni di tessuti e cellule di animali, piante o microrganismi, necessitano di un pre-trattamento prima dell'analisi NMR mentre i biofluidi (urine e sangue) sono campioni che si ottengono facilmente, poiché possono essere direttamente analizzati.

Le analisi che si effettuano mediante tecniche di NMR e MS richiedono opportune procedure di estrazione che permettono di estrarre metaboliti polari (idrosolubili) e non polari (liposolubili).

Nella metabolomica, gran parte degli approcci metodologici descritti si basano sulla ricostruzione delle reti metaboliche che costituiscono il metaboloma cellulare, partendo dalle variazioni delle concentrazioni dei metaboliti intracellulari ed extracellulari e dalla presenza di coerenza e correlazioni tra di esse mediante l'applicazione di modelli statistici (Figura 2.4).

Questi approcci metodologici hanno fornito importanti informazioni, poichè hanno permesso di discriminare le variazioni indotte nel metaboloma di microrganismi e di piante in relazione a modifiche geniche indotte [Manetti, et al. 2004; Manetti, et al. 2006; Piccioni, et al. 2009] o variazioni indotte nel genoma da cambiamenti del microambiente [Wecknerth, et al. 2005; Nicholson, et al. 1999].

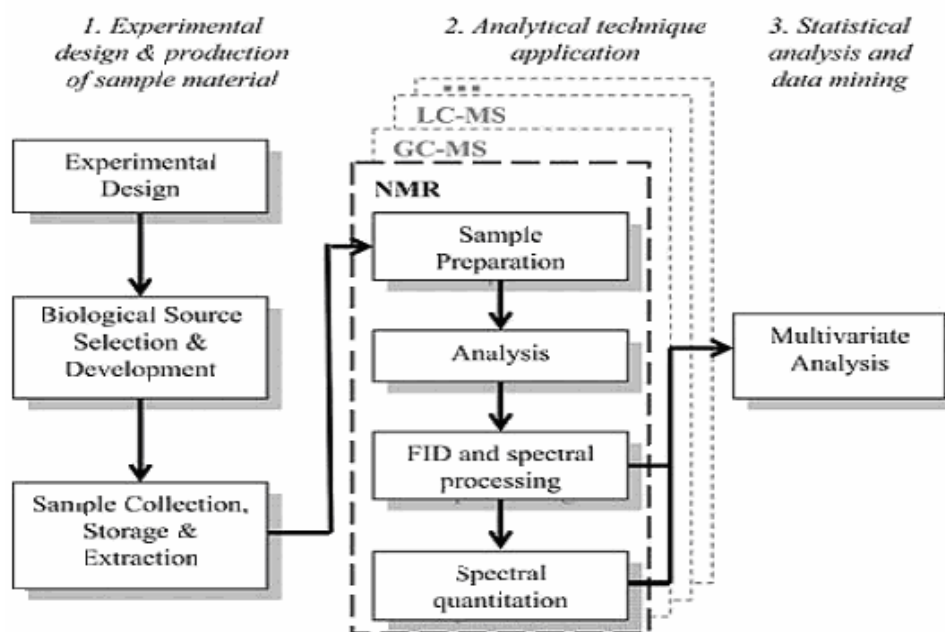


Figura 2.4 Piano di lavoro per esperimenti metabolomici [Rubtsov, et al. 2007]

CAPITOLO 3

3.1 Principi del metodo NMR

La Risonanza Magnetica Nucleare, (NMR) in particolare del protone, è divenuta in questi ultimi anni un insostituibile metodo di indagine nel campo della Biologia e Medicina.

La tecnica NMR presenta, infatti, la peculiarità di essere multinucleare e non distruttiva, consentendo quindi, lo studio sullo stesso campione di più nuclei quali ad esempio protoni, carboni e fosfori. Il campione successivamente può essere recuperato ed usato per altre analisi.

Questa spettroscopia può essere usata sia *in vitro* che *in vivo* ed in questo ultimo caso presenta anche la caratteristica della non invasività.

Negli ultimi anni, gli straordinari avanzamenti tecnologici degli strumenti commerciali hanno portato tale tecnica a superare le caratteristiche di bassa sensibilità intrinseca mediante l'uso del metodo ad impulsi, della trasformata di Fourier e di altissimi campi magnetici (fino a 14 Tesla di routine).

Negli estratti di campioni biologici quali fluidi, cellule, tessuti, organi o di un intero organismo, la spettroscopia NMR del protone è in grado di rilevare numerosi metaboliti.

Inoltre, l'analisi quantitativa di metaboliti osservabili mediante NMR sulla base delle misure delle aree o delle intensità dei segnali, consente di ottenere importanti informazioni biochimiche, chiarendo la complessità del ruolo di differenti metaboliti in condizioni normali e geneticamente modificati o patologiche.

Negli ultimi decenni, sono aumentate anche le applicazioni *in vivo*, pur se permangono difficoltà collegate con l'identificazione e l'analisi quantitativa del contributo dei singoli metaboliti negli spettri. Infatti, *in vivo*, la maggior parte dei segnali si presenta come multipletti non risolti, che esibiscono forme delle bande molto complesse a volte variabili in funzione del pH locale e delle condizioni di forza ionica.

A ciò deve essere aggiunto che la sovrapposizione dei segnali è particolarmente intensa ai bassi campi magnetici statici, che sono consentiti per studi su uomo.

Ulteriori difficoltà possono essere presenti *in vivo*: per variazioni dovute alla suscettività del mezzo esaminato, per la presenza di specie macromolecolari che

danno luogo a larghe risonanze, per la presenza di lipidi e di acqua e per intrinseci bassi rapporti segnale rumore.

L'analisi di tali sistemi viene facilitata ove possibile, da preliminari studi di estratti di cellule [Mountford and Mackinnon, 1994; Miccheli, et al. 1988a; Miccheli, et al. 1991; Piccioni, et al. 2007], tessuti, organi [Miccheli, et al. 1988b; Miccheli, et al. 1988c] o di fluidi biologici quali, ad esempio, urine [Davies, et al. 1991; Lundina, et al. 1993; Mendz and Hazell, 1995; Pontoni, et al. 2000], plasma [Wevers, et al. 1994] ed un intero organismo [Krishnan, et al. 2005] nei quali le bande sono più strette e risolte. Le informazioni sono ottenute esaminando il solo chemical shift, per risonanza, costituite da singoletti o dall'analisi della complessità del fattore spettrale per gruppi che si presentano come multipletti e che quindi, sono in interazione scalare (ovvero attraverso i legami) con i gruppi adiacenti.

In questo caso, l'entità delle costanti di accoppiamento fornisce ulteriori informazioni, riguardo la natura del gruppo e dei suoi immediati vicini.

Su campioni provenienti da estratti, è così possibile determinare contemporaneamente i metaboliti presenti, limitando il più possibile le procedure di manipolazione, ed ottenendo la valutazione dei valori quantitativi simultaneamente per tutti i componenti.

3.2 SPETTROSCOPIA NMR

Gli esperimenti NMR monodimensionali

Gli esperimenti 1D-NMR consistono nell'applicazione sul campione in esame di un impulso B_1 (onda quadra di intensità B_1), con frequenza pari a quella di Larmor; la durata dell'impulso Pw , espressa normalmente in microsecondi, determina l'angolo di rotazione θ° del vettore magnetizzazione intorno all'asse di applicazione dell'impulso stesso, secondo la relazione $\theta^\circ = \gamma B_1 Pw$.

La registrazione del FID (Free Induction decay) avviene durante il tempo di acquisizione t_1 (Figura 3.1).

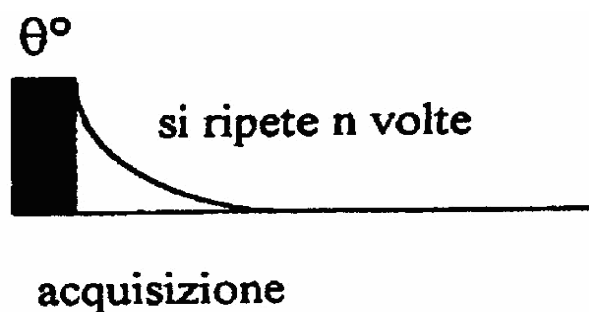


Figura 3.1 Schema di un esperimento 1D-NMR.

Attraverso il processo matematico della trasformata di Fourier, si converte il FID dal dominio dei tempi a quello delle frequenze, ottenendo così lo spettro.

Quando il basso rapporto segnale/rumore o altre considerazioni suggeriscono di acquisire più FIDs per ottenere lo spettro, è necessario inserire tra gli impulsi un tempo di attesa sufficientemente lungo da permettere alla magnetizzazione di recuperare le condizioni iniziali.

Il valore più opportuno è di solito cinque volte il tempo di rilassamento T_1 presumibile.

3.3 Analisi quantitativa dei segnali dell' ^1H -NMR

Anche se la spettroscopia NMR è ampiamente utilizzata per l'analisi delle strutture, essa ha molte applicazioni anche come strumento analitico quantitativo.

La caratteristica più interessante di questo tipo di spettroscopia è che sotto appropriate condizioni di acquisizione dei segnali, il responso molare è lo stesso per tutti i nuclei magneticamente equivalenti in una data soluzione. Ciò permette di condurre analisi quantitative senza usare uno standard per ogni analita presente, ma usando solo un semplice standard primario ben caratterizzato, che cada in zone spettrali libere da altri segnali. Una determinazione quantitativa assoluta con l'NMR è normalmente ricavata dai rapporti tra gli integrali dei segnali di tutti gli analiti, presenti nella miscela, e gli integrali dello standard primario (come per esempio il trimetilsililpropionato) oppure considerando le intensità dei segnali rispetto all'intensità dello standard.

Con le ultime generazioni di strumenti NMR, la precisione delle misure quantitative è paragonabile a quella delle tecniche cromatografiche.

Spesso, le condizioni sperimentali e l'ottimizzazione delle procedure non sono riportate nei lavori NMR quantitativi; questo porta a ritenere che questi esperimenti siano molto semplici, in realtà al buon risultato concorre un insieme di fattori che rendono difficile la precisa integrazione dei segnali. E' bene precisare che la riproducibilità, l'accuratezza, la ripetibilità e la precisione richiesta, sono ben valutabili solo se si è ben operato in condizioni ottimali. Solo in questo caso, la loro oscillazione statistica può essere contenuta in un intervallo tra il 99 e il 101%.

Il range ottimale di integrazione dovrebbe essere in realtà 636 volte l'ampiezza del segnale, per ottenere un'accuratezza del 99,90%, ma ottimizzando le condizioni è possibile ottenere buoni risultati anche in range più ristretti; inoltre, calcolando il rapporto degli integrali, l'errore introdotto dalla vicinanza di altri picchi può essere eliminato con quello degli altri.

Nel caso del C-13 la sensibilità è molto minore (abbondanza naturale del C-13 è pari all'1%), inoltre le bande satelliti possono notevolmente influenzare l'accuratezza delle misure e il loro effetto dovrebbe essere attentamente valutato.

A tal fine sono essenziali l'abilità e l'esperienza degli operatori; infatti un gran numero di fattori rende difficile ottenere precisi valori degli integrali o delle intensità dei segnali NMR.

Alcune operazioni di processamento degli spettri NMR (linea di base e correzione di fase) dipendono dalla soggettività dell'operatore riguardo la forma dei segnali. La formazione e l'abilità degli operatori sono, quindi, condizioni determinanti per l'ottenimento di ottimi risultati quantitativi riguardo la precisione, accuratezza e riproducibilità delle misure [Andersen, et al. 2003].

L'analisi quantitativa NMR è possibile eseguirla considerando la valutazione delle altezze dei segnali o le misure delle aree dei segnali i cui valori danno un'ottima stima quantitativa delle aree, anche nel caso di splitting del segnale ed inoltre, sono molto meno influenzate dalle caratteristiche dell'impulso.

Lo studio delle NMR protoniche è la tecnica quantitativa più utile per quanto riguarda la sensibilità ed il rilassamento.

La prima fonte di incertezza da considerare è il lento decadimento delle curve di Lorentz-Chauchy del segnale NMR, che provoca l'allargamento dei picchi a causa dei bassi valori del tempo di rilassamento trasversale T_2 , che è, infatti, inversamente proporzionale all'ampiezza a mezza altezza del picco.

Per quanto riguarda il tempo di rilassamento longitudinale T_1 , bisogna ricordare che, se non si lascia un adeguato tempo di attesa tra un impulso e il successivo, si può andare incontro al fenomeno della saturazione, con conseguente perdita parziale o totale dell'intensità del segnale e con gravi risvolti sui risultati quantitativi.

L'analisi quantitativa relativa verrà effettuata, come accennato in precedenza, mediante i rapporti dei valori degli integrali o delle intensità dei segnali, mentre quella quantitativa assoluta verrà effettuata mediante uno standard a concentrazione nota [Fardella, et al. 1995].

Si deve ricordare che l'intensità dei segnali NMR è direttamente proporzionale al numero di nuclei, presenti con un determinato intorno chimico, così come l'integrale e la proporzionalità vengono usate ampiamente in letteratura per la determinazione quantitativa dei metaboliti, presenti negli estratti biologici di ogni genere.

A questo fine, è però determinante dare un tempo di ritardo fra gli impulsi, necessario per evitare la saturazione dei segnali, situazione questa, che potrebbe introdurre notevoli errori di valutazione, per cui una corretta operatività richiede un ritardo di almeno 5 volte il valore del tempo T_1 di rilassamento longitudinale, più lungo al fine di evitare la parziale o totale saturazione dei segnali. L'ottimizzazione di tutti i parametri di acquisizione strumentale è parte integrante del lavoro sperimentale e deve essere dichiarata con la stessa perizia delle procedure di laboratorio [Bauer, et al. 1998].

3.4 Esperimenti NMR bidimensionali

Tali esperimenti rappresentano un'importante alternativa agli esperimenti monodimensionali, relativamente all'interpretazione di spettri complessi, in cui i segnali sono troppo involuppati per poter ottenere direttamente l'assegnazione dei chemical shifts e la valutazione degli accoppiamenti.

Risultano, dunque, di particolare interesse nel campo biologico in quanto permettono di ottenere informazioni sulla struttura secondaria e terziaria delle macromolecole e riguardo la composizione di miscele complesse.

Secondo lo schema generale l'esperimento si divide in quattro periodi :

Preparazione, evoluzione, mescolamento ed acquisizione Figura 3.2.

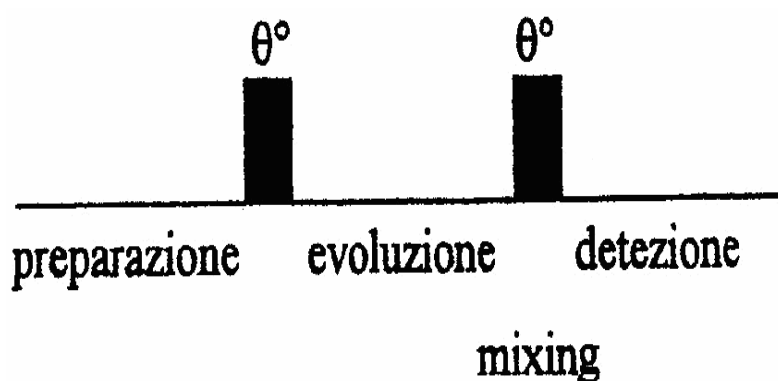


Figura 3.2 Schema generale di un esperimento 2D-NMR.

Il tempo di evoluzione t_1 ed il tempo di acquisizione t_2 rappresentano due variabili indipendenti, in funzione delle quali si può misurare l'ampiezza del segnale, $S(t_1, t_2)$. L'idea base delle spettroscopie NMR bidimensionali é quella secondo la quale la fase e l'ampiezza del segnale in funzione del t_2 , dipendono dalla storia precedente della magnetizzazione, ovvero dalla sua evoluzione nel tempo t_1 .

Incrementando il t_1 in un certo intervallo di valori ed operando una seconda trasformata di Fourier del segnale in funzione del t_1 , è possibile campionare il comportamento della magnetizzazione nucleare, sia durante il periodo di evoluzione, sia durante quello di rilevazione.

Il risultato è la generazione di uno spettro in due dimensioni di frequenza, $S(F_1, F_2)$.

Il periodo di preparazione consiste di un opportuno ritardo, durante il quale vengono stabilite le condizioni del sistema di spin prima della perturbazione.

Nella seconda fase, che può presentare impulsi addizionali a seconda del risultato desiderato, si ha l'evoluzione della magnetizzazione nel tempo t_1 . In tale periodo devono essere attive le interazioni tra gli spin per poterle analizzare nello spettro bidimensionale. Durante il periodo di mescolamento, che può richiedere l'uso di impulsi e/o intervalli di tempo, le magnetizzazioni vengono ridistribuite tra gli spin, a seconda del meccanismo attraverso cui avviene la comunicazione tra gli spin (ad esempio, accoppiamento scalare o dipolare) si determina il modo di interpretare le interazioni tra i nuclei.

Nel periodo di acquisizione si registra l'evoluzione della magnetizzazione trasversale del nucleo osservato, in seguito ad un secondo impulso [Hesse, et al. 2000].

Le sequenze usate nella presente tesi sono composte da due fasi: nella prima viene soppresso il segnale del solvente, nella seconda si realizza l'esperimento bidimensionale.

3.5 Esperimento 2D-COSY

Tra i vari esperimenti 2D-NMR, l'esperimento COSY (Correlated Spectroscopy) è uno dei più semplici; è in grado di fornire informazioni sulle correlazioni di tipo scalare tra nuclei appartenenti ad uno stesso sistema di spin.

Nella sua applicazione omonucleare, è costituito da due impulsi a r.f. non selettivi, separati da un periodo di tempo variabile t_1 . I dati vengono acquisiti dopo il secondo impulso, nel tempo t_2 .

Consideriamo il caso di due protoni, A e X; durante il t_1 sono attive le interazioni di tipo scalare, quindi l'evoluzione dei vettori magnetizzazione sarà funzione, oltre che del loro chemical shift (c.s.), della loro costante di accoppiamento J, ossia le componenti dei due vettori precederanno con frequenze pari a $\omega_A \pm 1/2 J$ e $\omega_X \pm 1/2 J$. L'effetto del secondo impulso dipende dalla posizione della magnetizzazione nel piano xy, la quale è determinata dai valori dei c.s. e della J, perciò tali parametri modulano l'intensità del segnale in funzione del t_1 .

Dall'applicazione della doppia trasformata di Fourier si ottiene un plot bidimensionale lungo la cui diagonale compare lo spettro protonico con le relative molteplicità; inoltre sono presenti dei picchi di interazione in grado di correlare le frequenze dei nuclei accoppiati scalarmente.

La presenza delle bande di correlazione è il risultato di un processo di tipo quantomeccanico, noto come trasferimento di coerenza, in base al quale, dopo il secondo impulso, una parte della magnetizzazione associata ad un determinato spin nucleare viene trasferita ad un altro nucleo, accoppiato scalarmente al primo [Braun, et al. 1998].

3.6 Il concetto di "spin lock" negli esperimenti NMR ad alta risoluzione

Lo spin locking viene ottenuto preparando il sistema di spin con un impulso a 90° e quindi, applicando immediatamente un campo a radiofrequenza intenso e continuo (detto campo dello spin locking) lungo un asse trasversale, perpendicolare a quello dell'impulso a 90° .

Ad esempio, un impulso a 90° lungo l'asse x sarà seguito da un campo di spin locking orientato lungo l'asse y o -y. Vista nel sistema di coordinate rotanti la magnetizzazione di equilibrio M è prima ruotata in un piano trasversale dall'impulso, e quindi "bloccata" dallo spin locking applicato parallelamente al nuovo asse lungo il quale giace M.

A prima vista potrebbe sembrare che un campo applicato colinearmente alla magnetizzazione M, ad esempio B_1 , non abbia effetto su di essa, ma non è così.

Il suo ruolo è quello di sopprimere la precessione relativa delle varie componenti della magnetizzazione che danno luogo allo spettro NMR, una volta che queste si trovano in un piano trasversale.

In assenza del campo B_1 ogni segnale precederebbe alla propria frequenza di Larmor durante l'evoluzione del FID. Visto nel sistema di coordinate rotanti, ogni vettore sembrerebbe precedere ad una frequenza determinata dal suo chemical shift meglio dal suo offset di risonanza ($\nu - \nu_0$).

Quando imponiamo B_1 , le risonanze precedono attorno al campo effettivo la cui intensità è data da:

$$B_{\text{eff}} = 4\pi^2 (\nu - \nu_0)^2 / \gamma^2 + |B_1|$$

IL campo effettivo forma un angolo con l'asse x il cui valore è dato dalla:

$$\tan \theta = 2\pi(\nu - \nu_0) / \gamma |B_1|$$

Se il campo B_1 , è sufficientemente intenso da rendere trascurabili gli effetti di off resonance (cioè quando $B_1 / 2\pi \gg \nu - \nu_0$ e $\theta = 0$) allora non solo B_1 ma anche B_{eff} sarà colineare con il vettore magnetizzazione M. Entrambi i campi sembreranno stazionari nel sistema di riferimento ruotante, poiché questo ruota ad una frequenza ν_0 che è la frequenza del campo B_1 .

Questo implica che la precessione di M attorno a B_{eff} consiste solo nella precessione attorno al proprio asse. La magnetizzazione si comporta come se l'asse dello spin lock fosse un nuovo asse longitudinale.

Allora l'ampiezza del vettore M diminuisce, a causa del rilassamento, verso un nuovo valore di equilibrio determinato dall'intensità del campo B_1 .

Poichè B_1 è circa 10^5 volte più debole di B_0 , non essendoci virtualmente differenza tra le popolazioni all'equilibrio dei nuovi livelli di energie, si azzerano i chemical shifts. Infine, questo rilassamento porta M a diminuire fino a zero.

Il tempo di rilassamento per questo processo è comunemente detto $T1\rho$.

In pratica è impossibile applicare un B_1 così intenso da rendere trascurabili gli effetti di off resonance, perché implicherebbe la continua applicazione di centinaia di Watt di potenza RF.

Per campi più deboli di $\gamma B_1/2\pi = 1-10$ KHz, comunemente accessibili per gli spettrometri ad alta risoluzione, ogni spin sperimenta un campo effettivo che è inclinato rispetto all'asse di un angolo θ che dipende dall'offset della sua risonanza.

Solo le componenti della magnetizzazione lungo questo asse inclinato, sono “spin locked”, le altre perpendicolari all'asse, ruotano attorno a B_{eff} e possono essere trascurate, poiché si sfasano rapidamente.

3.7 Esperimento 2D-TOCSY

La TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) è una tecnica bidimensionale, in grado di fornire la rete di accoppiamento totale tra nuclei, direttamente connessi o non, facenti parte di uno stesso sistema di spin. Si basa sul concetto di trasferimento di coerenza nel “rotating frame”, ossia in un sistema di riferimento rotante alla frequenza di un campo r.f. oscillante perpendicolarmente all'asse del campo magnetico statico B_0 .

Si realizza generando le condizioni di Hartmann-Hahn tramite un impulso di spin lock. Nel caso di un esperimento 2D di correlazione omonucleare la sequenza base è illustrata nel seguente schema come in Figura 3.3:

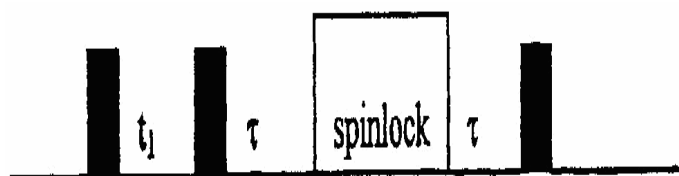


Figura 3.3 Schema generale dell'esperimento 2D-TOCSY.

Durante l'evoluzione e l'acquisizione il sistema si trova in regime di accoppiamento debole, mentre durante lo spin lock si ha accoppiamento forte. Dopo un impulso a 90° lungo l'asse x , la magnetizzazione all'equilibrio viene portata sul piano xy : applicando un campo r.f. lungo l'asse y , detto di spin lock, la magnetizzazione rimane polarizzata lungo la direzione del campo. Ciò si verifica se il campo applicato indicato con B_1 , è sufficientemente intenso da rendere trascurabili gli effetti di off resonance, ovvero quando $\gamma B_1 \gg 2\pi(\nu - \nu_0)$, in questo modo la magnetizzazione risulta ancorata lungo y , il nuovo asse longitudinale, attorno al quale precessa con una frequenza dipendente dal campo applicato.

Durante il tempo di mescolamento i chemical shifts dei protoni del campione saranno gli stessi in ppm, ma se espressi rispetto al campo applicato, ossia come differenza espressa in Hz, saranno dello stesso ordine di grandezza delle loro costanti di accoppiamento.

Infatti, tutti gli spin accoppiati avranno circa la stessa frequenza di precessione, cosicché risulteranno fortemente accoppiati e le loro transizioni saranno mescolate.

Durante l'acquisizione, la magnetizzazione ritornerà al proprio chemical shift ma risulterà contrassegnata dalle frequenze di precessione di tutti gli altri spin facenti parte del suo sistema.

Nello spettro bidimensionale generato dalla sequenza di impulsi mostrata, si otterranno dei picchi di correlazione tra tutti gli individui di uno stesso sistema di spin.

Il trasferimento di coerenza avviene in fase sotto l'influenza di un campo di spin lock e provoca un trasferimento netto di magnetizzazione diversamente dalla situazione che si realizza nei normali esperimenti di correlazione omonucleari di natura scalare che presentano un trasferimento in antifase, in cui l'integrale della magnetizzazione ottenuta dai picchi di correlazione è nulla.

Gli spettri TOCSY presentano, quindi una maggiore sensibilità rispetto quelli realizzati con la spettroscopia COSY, soprattutto nel caso in cui la molteplicità dovuta agli accoppiamenti scalari sia poco risolta e/o lo spettro presenti forti sovrapposizioni di segnali.

La possibilità di valutare tutte le connessioni tra individui appartenenti alla stessa molecola o allo stesso residuo giustifica la notazione TOCSY.

La realizzazione dello spin lock mediante un singolo impulso della durata dell'ordine di decine di millisecondi può comportare fluttuazioni di temperatura nel campione o danni all'apparato (amplificatore); per evitare ciò, è necessario usare potenze ridotte per il campo applicato, che per il protone sono dell'ordine di 5-8 KHz [Braun, et al. 1998].

In queste condizioni esistono tecniche che utilizzando opportune sequenze di impulsi sono in grado di superare tale problema.

CAPITOLO 4

4.1 Scopo della tesi

Le scienze “omiche” genomica, proteomica e metabolomica sono approcci complementari utilizzati per dare una completa visione dell'intero sistema biologico. In questo lavoro di tesi è stato affrontato l'approccio metabolomico, ovvero lo studio dei profili metabolici di semi derivati dalla varietà di mais transgenico PR33P67 e della corrispondente varietà tradizionale PR33P66 usando tecniche NMR mono-bidimensionali, in modo tale da fornire informazioni sullo stato attuale del sistema definendo il reale fenotipo. Studiare il profilo metabolico dei semi GM PR33P67 è di particolare interesse, poiché i prodotti del mais sono un'importante fonte per i nutrienti ed anche una parte essenziale della dieta umana.

La varietà transgenica contiene un gene funzionale *CryIA(b)*, che conferisce alla pianta l'abilità di produrre la tossina insetticida *Bt*.

Negli estratti del seme di mais sono stati identificati circa quaranta metaboliti idrosolubili per dare una più completa assegnazione dell' ^1H e del ^{13}C rispetto all'assegnazione riportata in letteratura. Per la prima volta sono stati identificati nello spettro ^1H NMR di estratti di semi di mais i seguenti metaboliti: etanolo, acido lattico, acido citrico, lisina, arginina, glicin-betaina, raffinosa, trealosio, α -galattosio e l'adenina. Gli spettri protonici di campioni di semi di mais transgenici e non-transgenici risultano essere conservativi, poiché mostrano gli stessi segnali e di conseguenza gli stessi metaboliti. Tuttavia, è stato osservato che negli estratti transgenici rispetto ai non-transgenici vi è una più elevata concentrazione di etanolo, acido citrico, glicin-betaina, trealosio cosiccome in altri composti non ancora identificati. Di conseguenza, è stato possibile discriminare i profili metabolici tra la varietà transgenica e non-transgenica attraverso l'uso di una appropriata analisi statistica. Lo scopo principale di questo lavoro sperimentale è stato di studiare nei dettagli i profili metabolici degli estratti di semi di mais delle due varietà e di investigare sulle relative variazioni metaboliche.

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 5

Materiali e Metodi

5.1 Raccolta del seme e crescita della pianta.

I campioni del seme di mais sono derivati dalla linea PR33P67 ibrida Bt del transgenico commerciale (MON810 da Pioneer Hi-Bred International, Inc., Johnston, IA) e dalla rispettiva linea di controllo PR33P66.

I semi di mais sono cresciuti uno accanto all'altro, in camere di crescita a temperatura controllata, adiacenti, ma separati per prevenire qualsiasi impollinazione e per ottenere le linee di controllo e transgeniche nelle stesse condizioni ambientali. Le piante sono cresciute a 25 °C con 70% dell'umidità relativa e 14 ore di luce con un regime di luce di circa 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Le piante transgeniche e di controllo erano fenotipicamente identiche.

Le pannocchie sono state raccolte dopo la maturità fisiologica, essiccate alla temperatura di 30 °C e conservate in sacchetti di plastica sigillati alla temperatura di 4 °C. I semi usati per l'analisi sono derivati dalla porzione centrale di una singola pannocchia. La stabilità del genoma è garantita dalla compagnia produttrice per mezzo di generazioni multiple di incrocio. I semi di mais sono geneticamente modificati usando la tecnica biolistica del "particle bombardment", che coinvolge il bombardamento casuale delle cellule mediante l'inserimento di particelle metalliche che portano il transgene; tale processo può portare ad un forte riarrangiamento del genoma [Somers, et al 2004].

5.2 Procedura di estrazione

Ogni seme di mais pesava circa 200 mg e successivamente è stato congelato in un mortaio di acciaio sterilizzato usando azoto liquido e polverizzato finemente con un pestello anch'esso precedentemente passato in azoto liquido. I campioni sono stati estratti secondo la procedura Bligh-Dyer [Bligh, et al. 1959] e modificata per evitare l'insorgere degli artefatti come la demolizione delle strutture macromolecolari [Miccheli, et al. 1988a]. I pellets sono stati mescolati con una miscela fredda di metanolo e cloroformio con aggiunta di 1mL di acqua e successivamente centrifugata a 10000g per 20 minuti alla temperatura di 4 °C, ottenendo due fasi separate: l'idroalcolica nella fase sovrastante e la fase organica

nella fase sottostante. La procedura di estrazione è stata eseguita due volte sul pellet per ottenere un'estrazione quantitativa. Dopo la seconda estrazione, le due fasi idroalcoliche sono state unite ed essiccate sotto flusso di azoto e conservate alla temperatura di -80 °C. La stessa procedura è stata eseguita per ottenere 10 estratti di campioni della linea transgenica e 10 della linea di controllo.

5.3 Analisi ^1H NMR

I campioni essiccati sono stati disciolti in acqua deuterata e tampone fosfato ad un pH di 7.2 contenente uno standard interno noto come trimetilsililpropionato (TSP) ad una concentrazione nota di 1 mM. Gli spettri ^1H NMR di estratti di semi di mais sono stati eseguiti alla temperatura di 300 K su uno spettrometro Bruker Avance ASQ 600 operante ad una frequenza protonica di 600.13 MHz ($B_0 = 14.3$ T).

5.4 Misure NMR ad alta risoluzione

Sono stati eseguiti i seguenti esperimenti:

- spettri monodimensionali ^1H NMR
- spettri di ^1H con acqua soppressa irradiando ad ogni scansione il picco dell'acqua con una potenza pari a 70 dB
- spettri bidimensionali COSY, TOCSY, HSQC, HMBC e DOSY

La stabilizzazione del campo magnetico è stata eseguita mediante un circuito di lock su specie deuterate presenti nel campione come solvente (D_2O).

I FIDs sono stati manipolati con una correzione della linea di base mediante una funzione polinomiale a 5 parametri.

Allo scopo di migliorare il rapporto segnale/rumore tutti i FIDs sono stati moltiplicati per una funzione esponenziale $e^{(-LB)}$ in cui LB è pari alla risoluzione spettrale. Per rilevare i segnali di risonanza di tutte le componenti dei campioni, diverse dall'acqua, con la massima sensibilità, gli spettri sono stati eseguiti mediante la sequenza di presaturazione del campione.

Lo spettrometro monta un probe duale pari a 5 mm.

I dati ottenuti dallo spettrometro sono stati processati usando il software TOPSPIN (Bruker). La quantificazione dei composti negli estratti di mais è stata ottenuta

misurando l'intensità dei segnali, selezionati rispetto all'intensità del segnale trimetilsililpropionato (TSP), situato ad un valore di chemical shift pari a 0.00 ppm; successivamente tali valori sono stati normalizzati a 100.

Condizioni sperimentali dello spettrometro Bruker Avance ASQ 600.

Parametri di acquisizione per ^1H NMR

- frequenza operativa = 600.13 MHz
- larghezza spettrale = 6000 Hz
- numero punti memoria = 64 K
- tempo di rilassamento = 4 s
- tempo di acquisizione = 4.5 s
- numero di scansioni = 256
- ampiezza dell'angolo = 90°

Inoltre sono stati eseguiti esperimenti bidimensionali ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC e DOSY [Braun, et al. 1998] usando le stesse condizioni sperimentali riportate [Mannina, et al. 2004], ma con un ritardo per l'evoluzione degli accoppiamenti long-range nell'esperimento ^1H - ^{13}C HMBC pari a 80 ms ed un mixing time per l'esperimento ^1H - ^1H TOCSY pari a 80 ms.

Gli esperimenti (PGSE) spin eco con gradiente a campo pulsato sono stati eseguiti con un'unità di gradiente del campo pulsato che produce un gradiente del campo magnetico nella direzione z con una potenza di 55.4 G cm^{-1} . La sequenza d'impulso spin eco stimolata viene usata utilizzando gradienti bipolari con un ritardo di corrente indotta longitudinale. La potenza dell'impulso del gradiente nella funzione seno ha una durata di 1.4 ms che viene incrementata logaritmicamente in 32 fasi passando da una potenza di gradiente massima compresa tra il 2% e il 95%, con un tempo di diffusione di 130 ms ed un ritardo di corrente indotta longitudinale di 5 ms.

5.5 Soppressione del segnale del solvente

La possibilità di registrare spettri in H_2O é essenziale per l'osservazione dei protoni soggetti a scambio chimico che non possono essere osservati in D_2O . Particolarmente interessante è, ad esempio, lo studio dei protoni dei gruppi NH

degli amminoacidi dei peptidi e delle proteine. La possibilità di studiare materiali biologici in acqua, inoltre elimina il problema di trasferirli in D₂O. In ogni caso l'uso della D₂O come solvente, spesso non garantisce la soluzione del problema per la presenza delle risonanze residue di HDO o H₂O che non sono eliminabili.

Le molte tecniche sperimentali conosciute possono essere divise essenzialmente in tre categorie: quelle che tendono a rendere minima la magnetizzazione del solvente quando viene applicato l'impulso (presaturazione), quelle il cui scopo è di non eccitare il segnale del solvente (eccitazioni selettive) e quelle che sfruttano la diversità dei tempi di rilassamento tra solvente e sostanze da analizzare (rilassamento selettivo).

Nel nostro caso si è scelto, di operare con il metodo della presaturazione.

5.6 Presaturazione

Il metodo consiste nel saturare il segnale del solvente, ossia nell'eliminare la differenza di popolazione della sua transizione, mediante una forte irradiazione. L'irradiazione viene sospesa immediatamente prima dell'applicazione della sequenza di impulsi e dell'acquisizione dello spettro allo scopo di evitare shifts di Bloch-Siegert (*) per i picchi vicini a quello interessato dalla soppressione.

E' possibile ottenere, mediante irradiazione selettiva, una diminuzione dell'intensità del segnale fino a mille volte.

Per ottimizzare l'esperimento è necessario determinare gli opportuni valori dell'intensità dell'irradiazione e della sua durata. L'intensità del campo deve essere tale da rendere il fattore di saturazione $B_1 T_1 T_2$ abbastanza grande (>100), mentre l'irradiazione deve durare alcune volte T_2 . Se il segnale che è necessario sopprimere è quello dovuto alla HDO, i valori di T_1 e T_2 sono dell'ordine di 1 e 0.5 secondi, cosicchè è sufficiente applicare il campo di irraggiamento, per 1.5-2.0 s.

Nella pratica questi valori sono determinati semplicemente per via empirica e a seconda dello strumento che si utilizza.

Nello strumento da noi usato (Bruker Avance ASQ 600) il canale del disaccoppiatore fornisce la potenza per la soppressione del solvente secondo il seguente schema (Figura 5.1):

NOTA. (*) Shift di Bloch-Siegert. Si tratta di piccoli movimenti degli shifts delle risonanze causati dal disaccoppiatore, come conseguenza delle variazioni del campo effettivo B_{eff} dovuta al disaccoppiamento. L'entità di questi shifts dipende dalla differenza di frequenza tra disaccoppiatore e la risonanza interessata nonché dal valore del campo applicato.

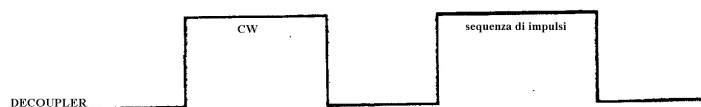


Figura 5.1 Schema per la soppressione del solvente

La potenza erogata va opportunamente regolata secondo il tipo di esperimento eseguito e il tipo di campione esaminato, al fine di evitare notevoli distorsioni della linea di base intorno alla zona irradiata, fenomeno che potrebbe determinare notevoli problemi di integrazione dei segnali con gravi conseguenze per le analisi quantitative.

5.7 Analisi statistica

L'elaborazione statistica dei dati NMR viene eseguita usando l'applicativo software STATISTICA per Windows (versione 6.0; 1997). L'intensità delle variabili viene centrata sulla media e standardizzata, per esempio separata dalla deviazione standard prima di eseguire l'analisi della varianza (ANOVA) e l'analisi in componenti principali (PCA). L'ANOVA permette alle variabili con il più alto potere discriminante di essere selezionate secondo i valori di F e di p -level.

Il p -level rappresenta un indice decrescente dell'affidabilità di un risultato e dà la probabilità di errore, per cui un risultato può essere accettato come valido.

Il p -level < 0.05 (5% della probabilità di errore) viene considerato come il livello limite di errore per essere accettato. In particolare, il valore F è definito come il rapporto della "variabilità tra i gruppi" e la "variabilità all'interno del gruppo".

Più grande è il rapporto maggiore è il potere discriminante della variabile corrispondente. La PCA viene eseguita sulle variabili selezionate dall'ANOVA.

I risultati PCA sono mostrati riportando gli scores delle componenti principali ed un grafico, che riporta i loadings delle variabili. Inoltre, viene riportata la percentuale della varianza per ogni specifico componente principale.

CAPITOLO 6

Risultati e Discussione

6.1 Assegnazione degli spettri ^1H NMR della fase idroalcolica

In Figura 6.1A è riportato lo spettro ^1H NMR di un estratto di seme di mais GM in acqua deuterata e tampone fosfato. L'assegnazione dello spettro protonico è stata effettuata usando i dati di letteratura NMR ed esperimenti bidimensionali.

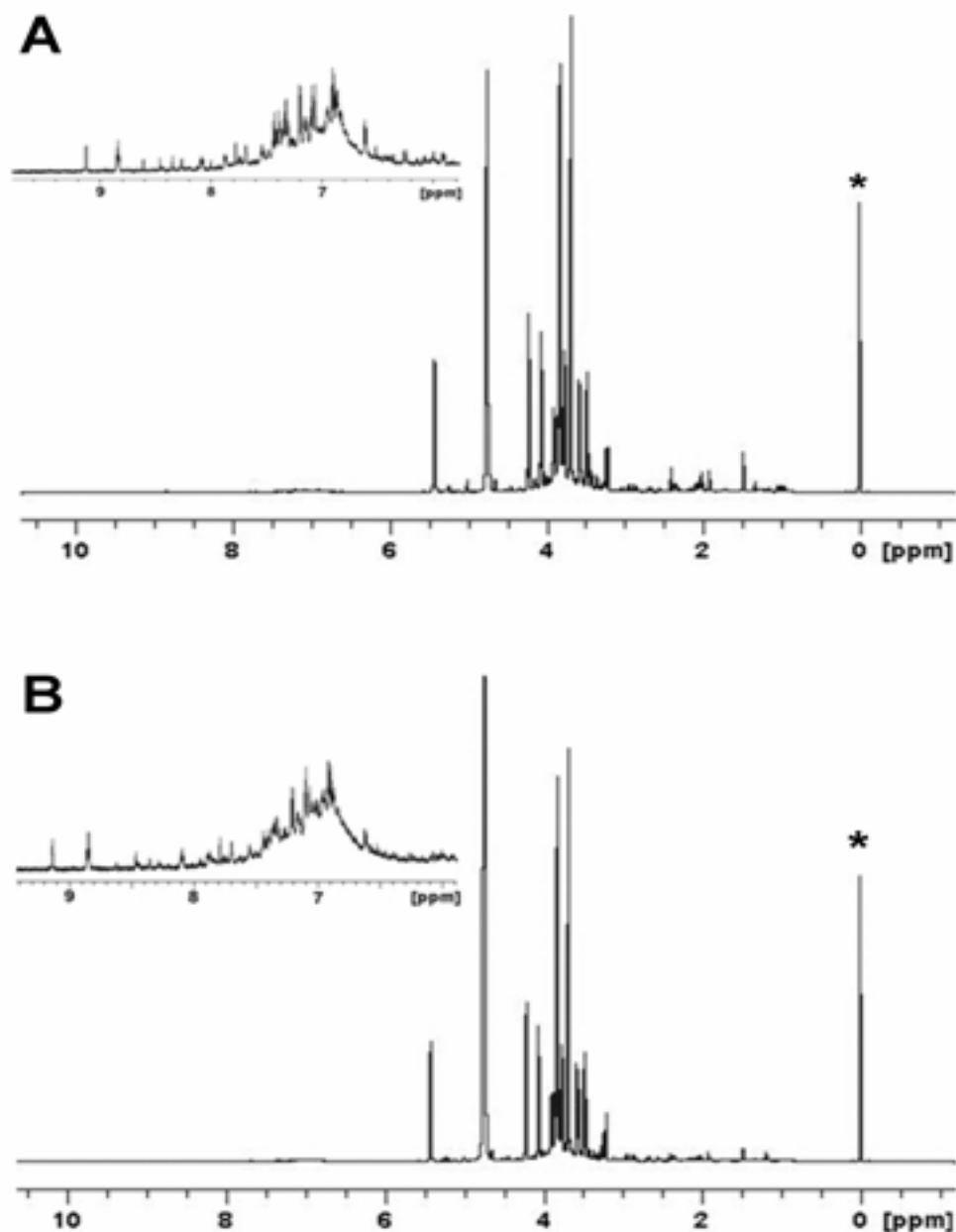


Figura 6.1 Spettro ^1H NMR (600.13 MHz) a 300 K di un estratto acquoso di mais GM (A) e di un estratto acquoso di mais non-GM (B). In alto è riportata l'espansione della regione spettrale compresa tra 5.90 - 9.60 ppm. (*) TSP segnale usato come standard interno. [Piccioni, et al. 2009]

I dati, ottenuti precedentemente dalla strumentazione CE-TOF-MS sulla stessa linea transgenica [Levandi, et al. 2008], sono stati anche usati per confermare alcune assegnazioni (Tabella 6.1).

Composti	Assegnazione	^1H (ppm)	Molteplicità	^{13}C (ppm)
Carboidrati				
Saccarosio (Suc)	CH-1 (Glc)	5.42	d	93.20
	CH-2	3.57	dd	72.10
	CH-3	3.77	t	73.60
	CH-4	3.48	t	69.95
	CH-5	3.85		
	CH ₂ -6	3.83		
	CH ₂ -1' (Fru)	3.68	s	62.03
	CH-2'			104.6
	CH-3'	4.22	d	77.59
	CH-4'	4.06		75.00
β -Glucosio (β -Glc)	CH-5	3.89	m	82.30
	CH ₂ -6	3.83		62.99
	CH-1	4.64	d	96.37
	CH-2	3.24	t	75.20
	CH-3	3.51	t	76.86
	CH-4	3.40	dd	70.65
α -Glucosio (α -Glc)	CH-5	3.48	dd	77.05
	CH ₂ -6,6	3.72, 3.90	dd	61.35
	CH-1	5.24	d	93.10
	CH-2	3.54	dd	72.50
	CH-3	3.73	dd	73.80
	CH-4	3.42	t	70.10
Raffinosio	CH-5	3.84		72.50
	CH ₂ -6,6	3.77, 3.84		61.70
	Gal1H	5.00	d	99.30
	Gal2H	3.83		
	Gal3H	3.90		
	Gal4H	4.00		
	Gal5H	3.97		
	Gal6H	3.76		
	G1H (Glc)	5.44		93.20
	G2H	3.57		
	G3H	3.77		73.60
	G4H	3.53		
	G5H	4.06		
	G6H	4.01		
	F1H (Fru)	3.66		
	F2H			
D-Trealosio	F3H	4.23		77.20
	F4H	4.06		75.00
	F5H	3.90		82.30
	F6H	3.77		
	C1H	5.20	d	94.30
	C2H	3.65		
	C3H	3.86		

Tabella 6.1 Metaboliti identificati nello spettro ^1H NMR (600.13 MHz) di un estratto acquoso di mais PR33P67 a pH 7.2 (Tampone Fosfato). [Piccioni, et al. 2009]

Composti	Assegnazione	¹ H (ppm)	Molteplicità	¹³ C (ppm)
D-Trealosio	C4H	3.44		
	C5H, C6H	3.78		
α -Galattosio (Gal)	C1H	5.27	d	93.13
	C2H	3.77		
β -Galattosio (Gal)	C1H	4.60	d	97.44
	C2H	3.50		
Acidi Organici				
Acido Isobutirrico (IA)	CH ₃	1.14	d	18.00
Acido Acetico (AA)	α -CH ₃	1.91	s	24.10
Acido Lattico (LA)	β -CH ₃	1.33	d	20.60
	α -CH	4.13	q	69.10
Acido Malico (MA)	α -CH	4.32	dd	
	β -CH	2.68	dd	
	β,β' -CH ₂	2.38	dd	
Acido Citrico (CA)	$\alpha\gamma$ -CH	2.54	d	45.80
	$\alpha'\gamma'$ -CH	2.68	d	45.80
Acido Piruvico (PA)	β -CH ₃	2.37	s	
Acido Succinico (SA)	$\alpha\beta$ -CH ₂	2.40	s	34.90
Acido Fumarico (FA)	α,β -CH=CH	6.53	s	
Acido Formico	HCOOH	8.46	s	
Aminoacidi				
Valina (Val)	α -CH	3.61	d	
	β -CH	2.27	m	
	γ -CH ₃	0.99	d	
	γ' -CH ₃	1.04	d	18.60
Isoleucina (Ile)	α -CH	3.65	m	
	β -CH	1.96	m	
	γ -CH ₃	1.02	d	
	γ -CH	1.25	m	
	γ' -CH	1.45	m	
	δ -CH ₃	0.93	t	
Leucina (Leu)	α -CH	3.69	t	
	γ -CH	1.69	m	
	δ -CH ₃	0.96	d	22.70
	δ' -CH ₃	0.94	d	21.50
Lisina (Lys)	α -CH	3.74	t	
	β -CH ₂	1.89	m	
	γ -CH ₂	1.45	m	
	δ -CH ₂	1.69	m	24.80
	ϵ -CH ₂	3.01	t	40.10
Alanina (Ala)	α -CH	3.77	q	51.10
	β -CH ₃	1.48	d	16.75
Treonina (Thr)	α -CH	3.58	d	
	β -CH	4.25	m	
	γ -CH ₃	1.32	d	20.00

Tabella 6.1 (continua)

Composti	Assegnazione	^1H (ppm)	Molteplicità	^{13}C (ppm)
Arginina (Arg)	$\beta\text{-CH}_2$	1.65; 1.72	m	26.60
	$\gamma\text{-CH}_2$	1.92	m	30.20
	$\delta\text{-CH}_2$	3.23	t	
Asparagina (Asn)	$\alpha\text{-CH}$	4.00	dd	
	$\beta\text{-CH}$	2.86	dd	35.10
	$\beta'\text{-CH}$	2.95	dd	35.10
Aspartato (Asp)	$\alpha\text{-CH}$	3.89	dd	
	$\beta\text{-CH}$	2.68	dd	37.20
	$\beta'\text{-CH}$	2.79	dd	
γ -amminobutirrato (GABA)	$\alpha\text{-CH}_2$	2.28	t	35.00
	$\beta\text{-CH}_2$	1.88	quintet	
	$\gamma\text{-CH}_2$	3.01	t	40.10
Glutammato (Glu)	$\alpha\text{-CH}$	3.75	t	55.20
	$\beta\text{-CH}$	2.09	dt	27.69
	$\beta'\text{-CH}$			
	$\gamma\text{-CH}_2$	2.34	t	34.10
Glutammina (Gln)	$\alpha\text{-CH}$	3.77	t	
	$\beta\text{-CH}_2$	2.15	m	27.13
	$\gamma\text{-CH}_2$	2.45	m	31.40
Prolina (Pro)	$\alpha\text{-CH}$	4.14	t	
	$\beta\text{-CH}$	2.36	m	29.61
	$\beta'\text{-CH}$	2.08	m	24.30
	$\gamma\text{-CH}_2$	2.01	m	
	$\delta\text{-CH}$	3.40	t	
	$\delta'\text{-CH}$	3.33	t	
Tirosina (Tyr)	$\alpha\text{-CH}$	3.93	dd	
	$\beta\text{-CH}$	3.17	dd	
	$\beta'\text{-CH}$	3.05	dd	
	C2,6H ring	7.18	d	
	C3,5H ring	6.88	d	116.05
Istidina (His)	C2H ring	7.05	s	116.53
	C4H ring	7.78	s	
Fenilalanina (Phe)	CH-2,6	7.31	m	
	CH-3,5	7.44	m	
Tryptofano (Trp)	C5H ring	7.20	t	
	C6H ring	7.28	t	
	C7H ring	7.54	d	
Dimetilammia (DMA)	CH_3	2.73	s	35.97
Trimetilammia	CH_3	2.91	s	37.86
Osmoliti				
Trigonellina	N- CH_3	4.05	s	
	HB, HC	8.06		127.92

Tabella 6.1 (Continua)

Composti	Assegnazione	^1H (ppm)	Molteplicità	^{13}C (ppm)
Trigonellina	HB, HC	8.84	d	71.10
	HA	9.13	s	
Glicina-betaina (GB)	N-CH ₃	3.27	s	54.00
	α -CH ₂	3.91	s	66.50
V23 (U)	N-CH ₃	3.23	s	54.96
Zuccheri alcolici				
V21 (U)	N-CH ₃	3.11	s	47.00
Colina	N(CH ₃) ₃ ⁺	3.21	s	54.70
	α -CH ₂			68.30
V24 (U)	N-CH ₃	3.23	s	54.75
				74.87
V25 (U)	N-CH ₃	3.25	s	41.20
Alcoli				
Etanolo (EtOH)	CH ₃	1.18	t	17.57
	CH	3.66	q	66.70
Fenoli				
V39 (U)		7.16	d	
	1H, H-2	7.10	d	
	1H, H-8	6.24	d	
V46 (U)		7.26	d	
		7.10	d	
		7.34		
AA'XX'		6.88	d	116.52
		7.00		
		7.31		
V42 (U)		6.92	d	115.98
		7.54		
		7.60		
		6.42	d	
		6.60	d	116.00
Nucleotidi				
UDP-Glucosio	C1H (Glc)	5.56	d	93.50
	C2H	3.56		
	C3H	3.76		
UMP	C1'H ribose	5.99	d	127.90
	C6 ring	8.11	d	
V38 (U)		6.00	d	
V51 Adenina		8.27	s	122.70
V54 Adenina		8.61	s	
V52 (U)		8.34	s	

Tabella 6.1 (Continua). I chemical shifts ^1H e ^{13}C sono riferiti al segnale di riferimento TSP alla concentrazione di 1 mM. Sono riportate le abbreviazioni dei composti. I chemical shifts sono riferiti al segnale TSP ($\delta = 0.00$ ppm) e rispettivamente all'anomerico ^{13}C segnale dell'alanina a 16.75 ppm; s, singoletto; d, doppietto; dd, doppio doppietto; t, tripletto; q, quartetto; m, multipletto; AA'XX' corrispondente ai sistemi di spin non identificati; U, sconosciuto.

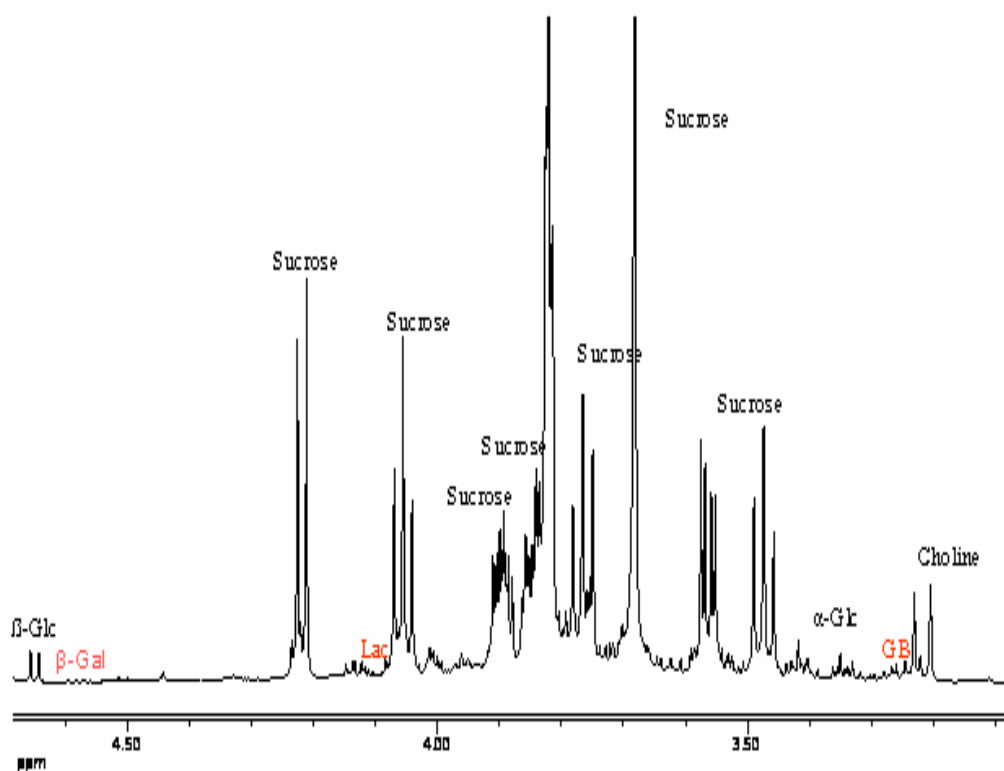


Figura 6.2 (B) Espansione della regione spettrale compresa tra 3.10 – 4.60 ppm di uno spettro ¹H NMR (600.13 MHz) a 300 K di un estratto acquoso di mais della varietà non-GM.

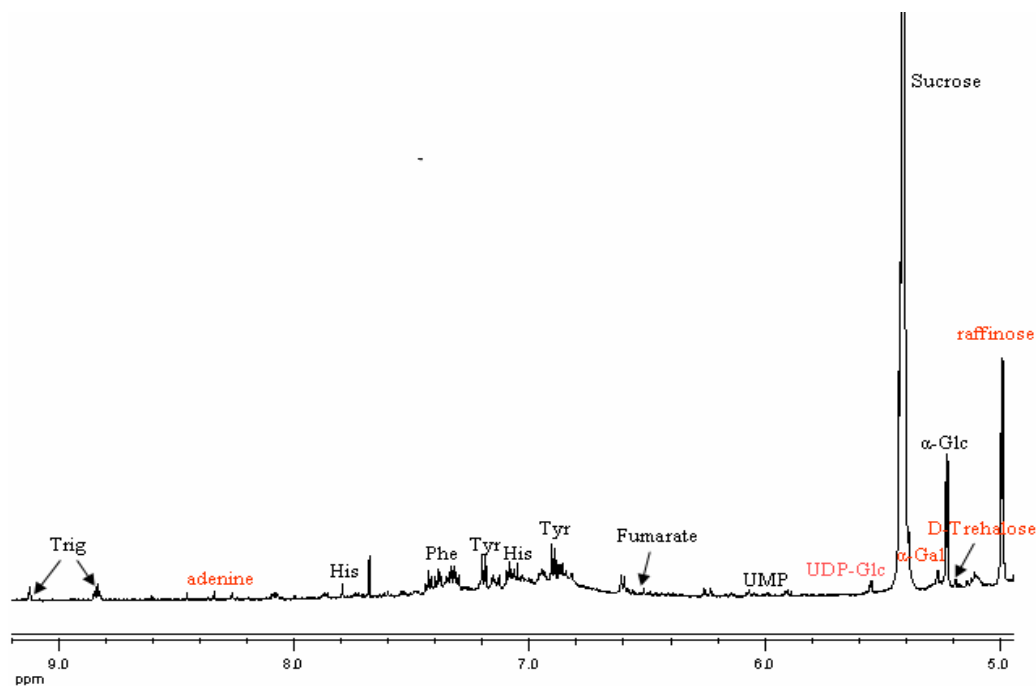


Figura 6.2 (C) Espansione della regione spettrale compresa tra 5.00 – 9.20 ppm di uno spettro ¹H NMR (600.13 MHz) a 300 K di un estratto acquoso di mais della varietà non-GM.

L'etanolo è stato identificato, mediante il tripletto diagnostico a 1.18 ppm, che correla con un segnale a 3.66 ppm nella mappa COSY. I corrispondenti chemical shifts del carbonio a 17.57 ppm e a 66.70 ppm hanno confermato l'assegnazione. L'acido lattico viene identificato dal doppietto a 1.33 ppm, che correla con un quartetto a 4.13 ppm nella mappa del COSY, e dai corrispondenti carboni a 20.60 ppm e 69.10 ppm.

Nella mappa TOCSY, la lisina viene identificata dal suo caratteristico sistema di spin, consistente di un tripletto a 3.01 ppm, tre multipletti a 1.69, 1.45 e 1.89 ppm ed un tripletto a 3.74 ppm, come dai corrispondenti carboni Figura 6.3.

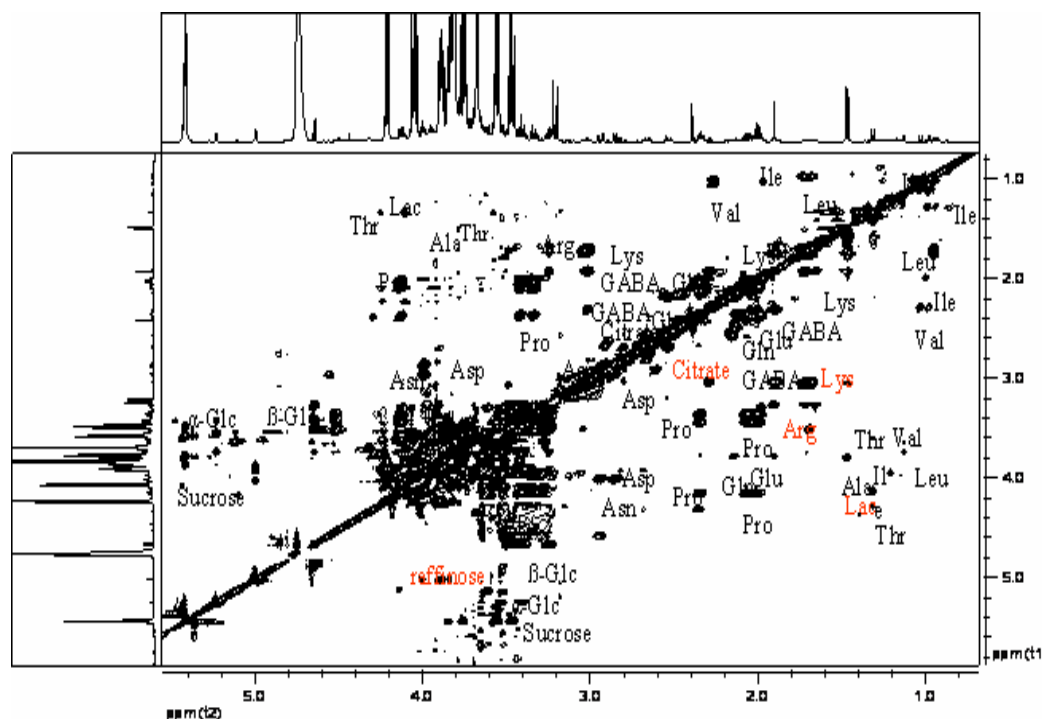


Figura 6.3 Mappa 2D-TOCSY di un estratto acquoso di seme di mais della varietà non-GM in D₂O e tampone fosfato a 300 K. Espansione della regione spettrale compresa tra 0.5-5.60 ppm

L'arginina mostra un sistema di spin consistente di tre multipletti a 1.65, 1.72, 1.92 ppm ed un tripletto a 3.23 nella mappa TOCSY. I corrispondenti carboni nella mappa ¹H-¹³C hanno confermato la struttura. L'acido citrico è stato identificato dal doppietto a 2.54 ppm, che correla con un doppietto a 2.68 ppm e dal corrispondente carbonio (vedere Tabella 6.1). La glicin-betaina, è un importan-

te osmolita, che mostra risonanze a 3.27 e 3.91 ppm e carboni corrispondenti, rispettivamente a 54.00 e 66.50 ppm Figura 6.4.

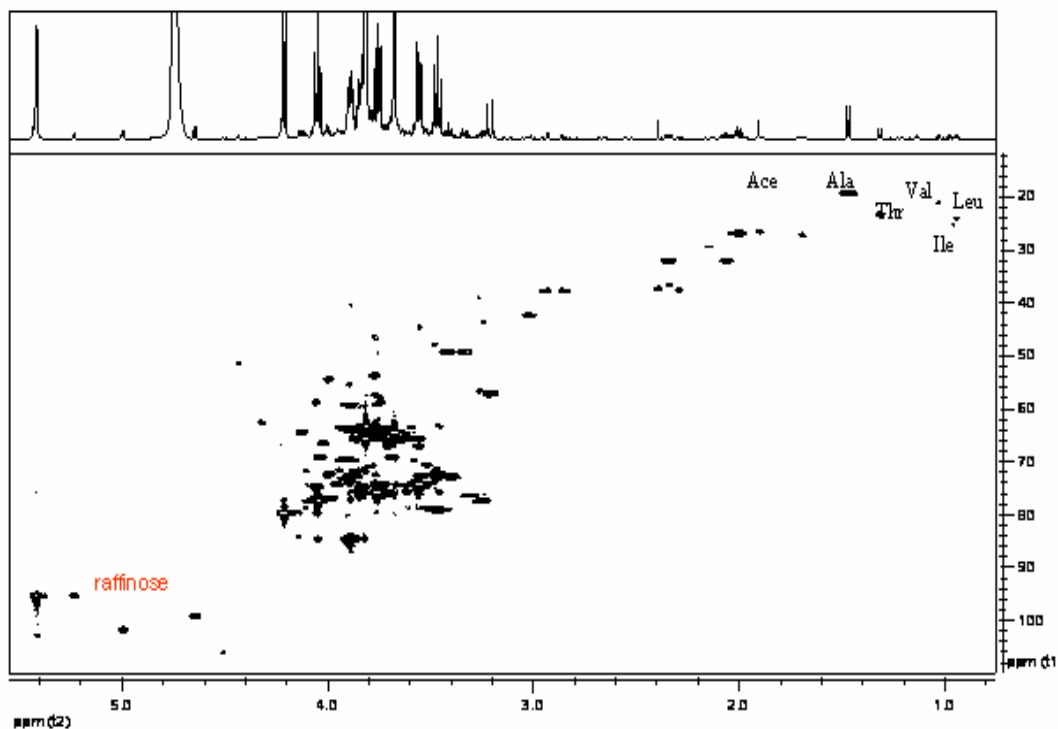


Figura 6.4 Mappa 2D-HSQC di un estratto acquoso di seme di mais della varietà non-GM in D₂O e tampone fosfato a 300 K. Espansione della regione spettrale compresa tra 0.5-5.60 ppm

Lo spettro protonico mostra anche la presenza del raffinoso, un trisaccaride costituito dalle unità di: galattosio, glucosio e fruttosio. A 5.00 ppm lo spettro ¹H rivela un tipico doppietto diagnostico del protone α -anomerico del galattosio legato alla posizione 6 di un'altra unità.

Per stabilire la natura dell'unità di legame è stato eseguito un esperimento DOSY [Morris, et al. 1992]. Tale esperimento è particolarmente conveniente per mostrare l'informazione della stessa diffusione molecolare in una mappa bidimensionale, in cui in una dimensione troviamo lo spettro NMR e nell'altra il coefficiente di diffusione. L'esperimento DOSY è stato usato con successo per l'analisi di miscele [Morris, et al. 1994] e per lo studio di interazioni intermolecolari [Kapur, et al. 2000; Viel, et al. 2002].

In Figura 6.5A-B è riportata la mappa del DOSY dell'estratto idroalcolico del seme di mais transgenico PR33P67.

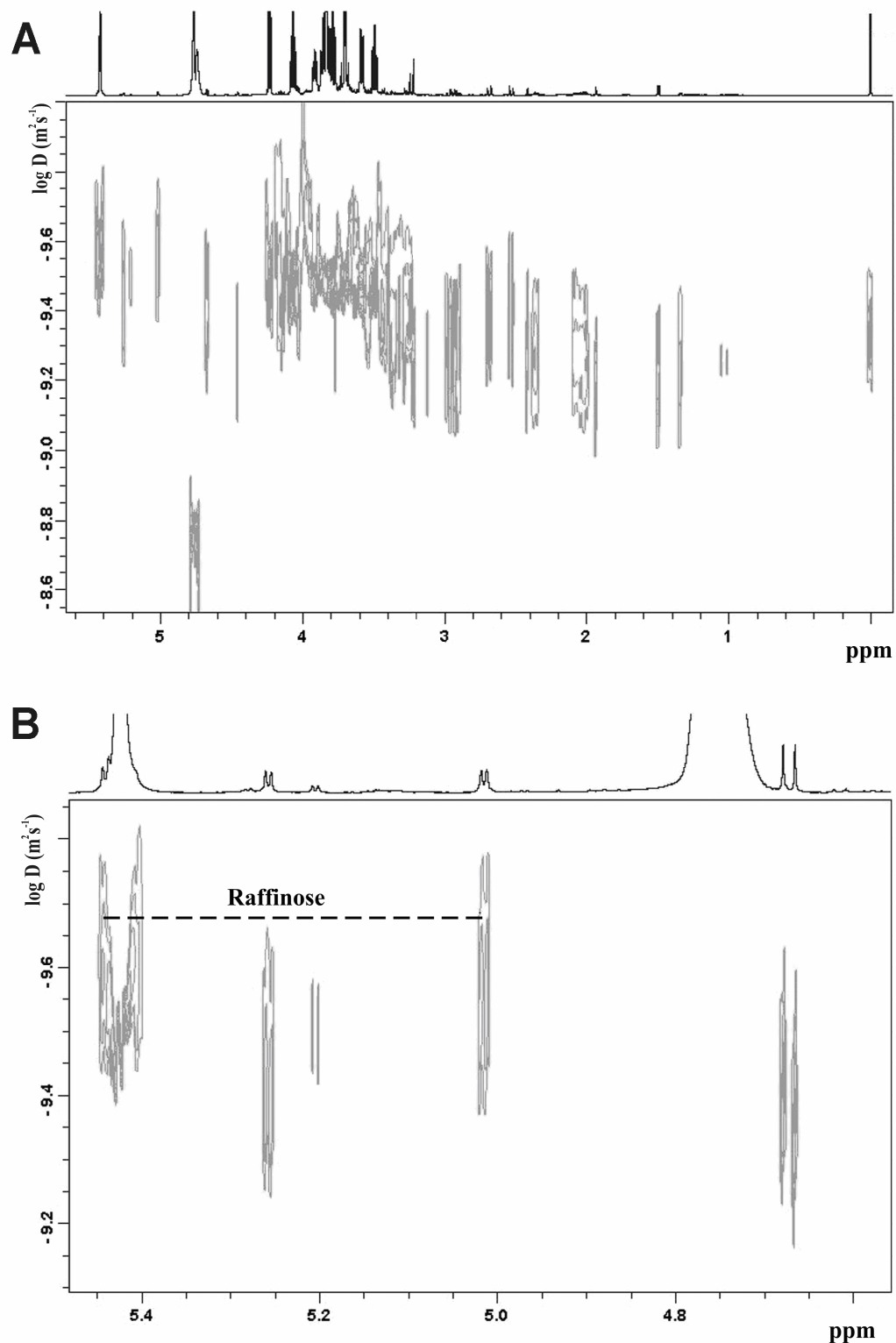


Figura 6.5 (A) Mappa 2D-DOSY di estratto acquoso di seme di mais PR33P67 in D₂O e tampone fosfato a 300 K. Lo spettro ^1H dell'estratto acquoso è riportato anche come proiezione orizzontale. (B) Espansione della regione spettrale compresa tra 4.60- 5.45 ppm per evidenziare il segnale del raffinose. [Piccioni, et al. 2009]

Con tale tecnica possono essere osservati i segnali con differenti coefficienti di diffusione, dovuti a differenti metaboliti, e il segnale con lo stesso coefficiente di diffusione. Usando l'informazione DOSY ed esperimenti 2D, è stato possibile identificare le risonanze del raffiniosio, vedere Tabella 6.1. La mappa DOSY mostra che il protone anomero del galattosio ha lo stesso coefficiente del segnale di diffusione a 5.44 ppm, parzialmente sovrapposto al doppietto del saccarosio. Il segnale a 5.44 ppm può essere attribuito all' α -glucosio legato sia al galattosio sia al fruttosio [Fan, 1996]. Come previsto, il coefficiente di diffusione del raffiniosio, un trisaccaride, è più basso del coefficiente di diffusione del glucosio, un monosaccaride, e del saccarosio, un disaccaride. La presenza di raffiniosio, non precedentemente identificata negli estratti di semi di mais, è anche confermata dall'aggiunta del composto standard nel campione. Il raffiniosio appartiene alla famiglia degli oligosaccaridi ed ha ruoli differenti nelle piante, poiché è usato per il trasporto e l'immagazzinamento del carbonio e come sostanza usata per proteggere la pianta da stress abiotici [Bachmann, et al. 1994; Haritatos, et al. 1996; Taji, et al. 2002].

Il raffiniosio è molto diffuso nei semi ed è stato ipotizzato per costruire un importante risorsa energetica durante la germinazione. In estratti di semi, ottenuti da un'altra varietà di mais, La73-*Bt* [Manetti, et al. 2006], il segnale a 5.00 ppm è stato attribuito a melibiosio, un disaccaride, costituito dalle unità di galattosio e glucosio. Inoltre, un segnale riportato come V21 non è stato ancora completamente assegnato a causa della sua concentrazione estremamente bassa.

Il singoletto V21 a 3.11 ppm con il corrispondente carbonio a 47.00 ppm, mostrato nella mappa HSQC, è dovuto al segnale metile del gruppo N-CH₃ di un composto simile alla colina. Lo spettro protonico mostra anche la presenza di trealosio, uno zucchero disaccaride non riducente, composto da due unità di glucosio unite da un legame α , 1- α . Esso è stato assegnato mediante il segnale doppietto a 5.20 ppm con una costante di accoppiamento di 3.9 Hz, dal corrispondente carbonio a 94.30 ppm e dal sistema di spin, identificato nell'esperimento TOCSY, vedere Tabella 6.1. Nella Figura 6.1A è riportata anche la regione a basso campo da 5.90 a 9.60 ppm; in tale regione sono mostrati molti segnali. Alcuni composti aromatici sono stati identificati come la tirosina, fenilalanina, triptofano, adenina, pirimidina nucleoside, acidi fenolici, acido formico e trigonellina (un prodotto proveniente

dal metabolismo della vitamina B₃). La presenza di adenina, non precedentemente identificata nello spettro ¹H, ma osservata negli elettroferogrammi di massa [Levandi, et al. 2008], è stata suggerita dai diagnostici singoletti a 8.27 ppm con il corrispondente carbonio a 122.7 ppm e dal segnale a 8.61 ppm.

Diversi composti presenti in concentrazioni estremamente basse non sono stati completamente assegnati, ma è possibile dare delle informazioni strutturali.

Per esempio, nella mappa TOCSY, è stata individuata una struttura chimica simile al sistema caffeoyl, suggerita dalla presenza di un sistema di spin, costituito da un doppietto a 7.16 ppm, un doppietto a 7.10 ppm ed un doppietto a 6.24 ppm [Tolonen, et al. 2002] con una costante di accoppiamento di 15.75 Hz.

Due sistemi AA'XX' con segnali a 6.88, 7.00 e 7.31 ppm e 6.92, 7.69, 7.54 ppm rispettivamente si accordano bene con la struttura della tirosina. Infine, è stato osservato un gruppo di segnali a 6.42, 7.40 e 6.60 ppm in esperimenti TOCSY-COSY, con una correlazione tra 6.60 e 116 ppm, in HSQC.

E' importante sottolineare che le tecniche NMR e CE-TOF-MS sono in grado di dare informazioni complementari e differenti. Per esempio, tra i dieci composti identificati per la prima volta nello spettro ¹H NMR di estratti di semi di mais, soltanto adenina e arginina sono state identificate anche dallo strumento CE-TOF-MS [Levandi, et al. 2008].

6.2 Discriminazione del campione GM dal campione non-GM

In Figura 6.1A-B è possibile osservare che gli spettri ^1H di estratti di semi GM e non-GM sono conservativi, poiché tutti i segnali sono mantenuti in entrambi i genotipi, suggerendo che gli organismi transgenici non producevano nuovi metaboliti. Gli spettri ^1H conservativi sono stati osservati anche nel caso di estratti di lattuga transgenica e pomodoro transgenico [Mattoo, et al. 2006; Sobolev, et al. 2007], cosiccome nel seme di *Zea mays* [Manetti, et al. 2006].

Nei grani di “*Zea mays*” è stato precedentemente mostrato, usando tecniche metabolomiche [Manetti, et al. 2006; Levandi, et al. 2008], che la modificazione genetica, ottenuta attraverso l’inserzione del gene *CryIA(b)*, induce inaspettate variazioni metaboliche nei pathways, influenzando le concentrazioni di amminoacidi ramificati ed osmoliti. In questo studio è stato possibile differenziare i campioni GM dai non-GM, sulla base delle differenti concentrazioni di metaboliti. I dati NMR sono stati analizzati usando un approccio ottenuto dalla fusione del *profilo metabolico-metabolomica* riportato precedentemente [Mannina, et al. 2008]. Infatti, sebbene è stata eseguita una completa assegnazione degli spettri ^1H , noi preferiamo non definire questo lavoro di “*metabolomica*” come nostro approccio analitico, poiché alcuni metaboliti, presenti in concentrazioni estremamente basse, non sono stati rilevati, a causa dell’intrinseco limite di sensibilità della tecnica NMR. La rilevazione limite di un dato metabolita, analizzato in un tubo di 5 mm, usando una spettroscopia monodimensionale ^1H NMR ad alto campo (11-16 T), è tra 10-100 μM [Fan, 1996].

Di conseguenza, l’intensità di 53 segnali protonici è stata misurata in campioni GM e non-GM e sottoposta ad ANOVA per selezionare le variabili con il più alto potere discriminante; le 39 variabili sono state selezionate in accordo ai loro valori *F* e dei *p-level*, vedere Tabella 6.2 ANOVA.

	<i>F (fisher)</i>	<i>p-level</i>	<i>Order</i>
V16 CA	3.06157	0.0472	t > c
V25 (U)	4.591874	0.0460	
V17 DMA	4.951564	0.0391	
V41 FA	5.054791	0.0373	
V24 (U)	5.887674	0.0260	
V37 UMP	6.301190	0.0218	
V30 (U)	6.414180	0.0208	
V38 (U)	6.450670	0.0205	
V26 Suc	6.586361	0.0194	
V50 (U)	6.750600	0.0181	
V32 β -Glc	6.811604	0.0177	
V44 Tyr	8.288630	0.0099	
V58 GB	8.777572	0.0083	t > c
V5 EtOH	9.528544	0.0064	t > c
V52 (U)	10.44380	0.0046	
V13 PA	10.65512	0.0043	
V51 Adenine	10.80720	0.0041	
V12 Glu	13.63309	0.0016	
V21 (U)	15.45155	0.00098	t > c
V34 α -Glc	19.09433	0.00036	
V39 (U)	20.12644	0.00028	
V48 Trp	20.91203	0.00023	
V59 D-Trehalose	22.50214	0.00016	t > c
V54 Adenine	24.91015	9.47E-05	
V14 SA	28.10306	4.86E-05	
V56 LA	30.01585	3.33E-05	
V11 GABA	41.36352	4.71E-06	
V42 (U)	43.15032	3.59E-06	
V9 Pro	45.77859	2.44E-06	
V33 Raffinose	46.97719	2.06E-06	
V8 AA	50.72701	1.23E-06	
V47 Phe	51.50064	1.11E-06	
V2 Ile	55.04748	7.04E-07	
V57 Thr	60.13772	3.81E-07	
V7 Ala	79.52399	5.05E-08	
V23 (U)	81.11446	4.36E-08	
V3 Val	90.84033	1.86E-08	
V1 Leu	102.4051	7.44E-09	
V4 IA	143.1754	5.29E-10	

Tabella 6.2 ANOVA. Applicata a 39 metaboliti per discriminare le frazioni idroalcoliche di semi di mais GM e non-GM. Sono riportate variabili con *p*-levels < 0.05. Abbreviazioni: vedere lista in Tabella 6.1, U, sconosciuto; c, controllo; t, transgenico. [Piccioni, et al. 2009]

In Figura 6.6A-E sono stati riportati in un istogramma i valori medi e gli errori standard dell'intensità di queste 39 variabili.

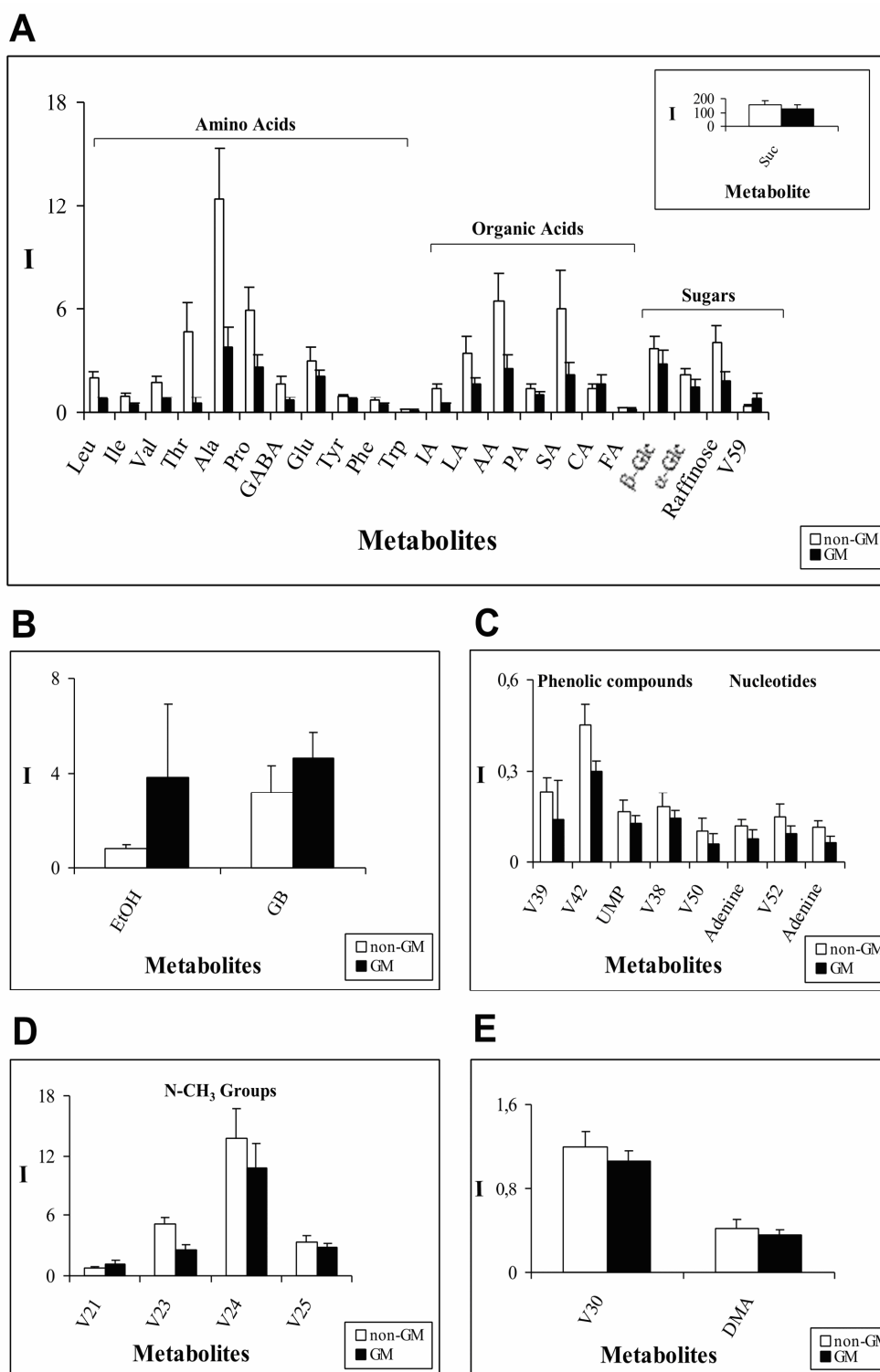


Figura 6.6 (A-E) Istogrammi relativi all'intensità dei metaboliti selezionati (unità arbitrarie); vedere lista di abbreviazioni in Tabella 6.1. Per i campioni di seme di mais della varietà GM e non-GM sono riportati i valori medi e gli errori standard. Il pannello bianco e nero riferiti rispettivamente ai campioni di seme di mais non-GM e GM. [Piccioni, et al. 2009]

E' importante notare che la concentrazione degli amminoacidi è sempre più bassa nei campioni transgenici rispetto ai campioni non-transgenici. Gli acidi organici, per esempio, l'acido isobutirrico, l'acido lattico, acetico, piruvico, succinico e fumarico, sono presenti in quantità più basse nei campioni transgenici paragonati con quelli non transgenici. Soltanto l'acido citrico mostra una concentrazione più alta nei campioni GM rispetto ai campioni non-GM. Tutti gli zuccheri, tranne il trealosio, sono presenti a concentrazioni più basse nei campioni transgenici rispetto ai campioni non-transgenici.

E' importante sottolineare che risultati differenti sono stati riportati per semi della varietà *La73-Bt* [Manetti, et al. 2006], dove le concentrazioni di GABA, glutammina, acido succinico e alcuni zuccheri come α -glucosio, β -glucosio, melibiosio e saccarosio sono state trovate in quantità più elevate nei campioni GM rispetto ai campioni di mais non-GM. Questo risultato conferma che differenti linee possono portare a profili metabolici differenti.

L'intensità delle 39 variabili, selezionate dall'ANOVA, è stata sottomessa alla PCA, vedere Figura 6.7A. Questa mappa mostra chiaramente due gruppi distinti di campioni, sul lato sinistro si osserva un gruppo di campioni non-GM mentre sul lato destro un gruppo di campioni GM.

La somma di PC1 e PC2 determina il 72.3% della varianza totale, con PC1 responsabile per il 63.9%. In Figura 6.7B è riportato il grafico dei loading delle variabili, che dà importanti informazioni circa il potere discriminante delle variabili. La variabile 58 (glicin-betaina), variabile 59 (trealosio), variabile 16 (acido citrico) e variabile 5 (etanolo), sono composti presenti in quantità maggiori nei campioni transgenici cosiccome per la variabile 21, che non è stata ancora completamente assegnata. Nello stesso tempo, negli estratti non-GM, ci sono altre variabili corrispondenti ad altri composti, presenti in una quantità maggiore.

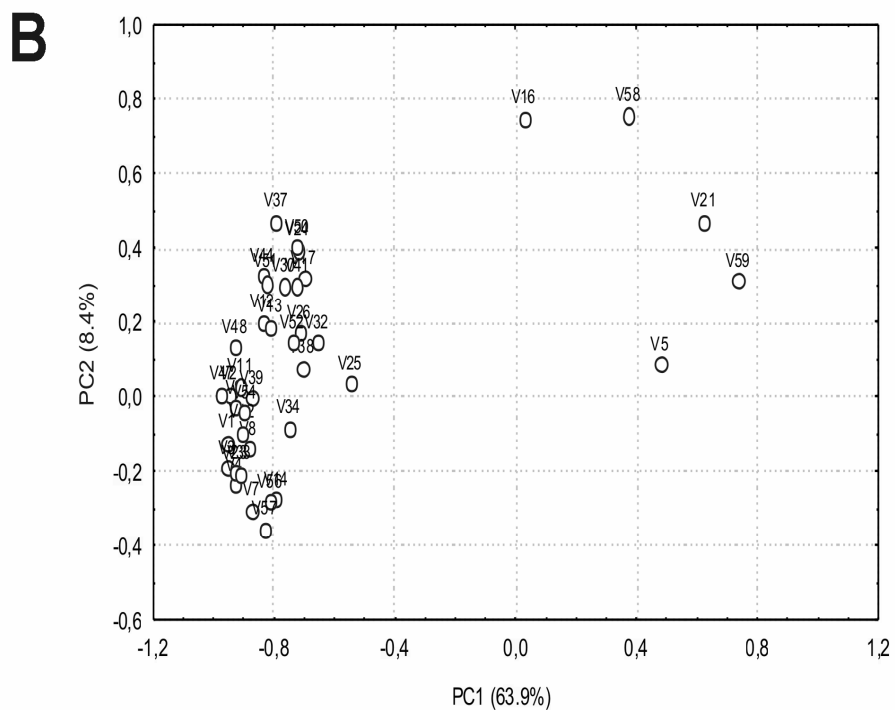
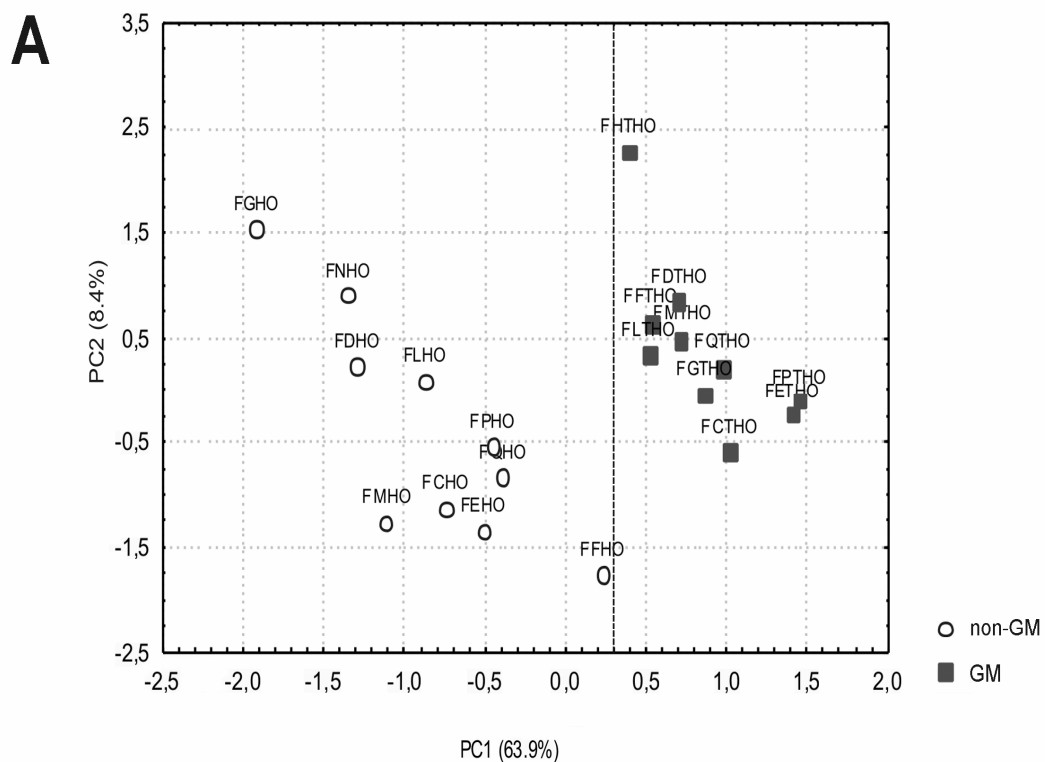


Figura 6.7 (A): PCA rappresentata sull'intensità di 39 variabili misurate in campioni GM e non-GM. **(B)** PCA plot dei loadings. [Piccioni, et al. 2009]

E' importante discutere, in maggior dettaglio, quelle variabili che aumentavano negli estratti di mais transgenici PR33P67.

La glicin-betaina (GB) è sintetizzata o dall'ossidazione (o deidrogenazione) della colina o dalla *N*-metilazione della glicina. Essa si accumula nei cloroplasti e plastidi di molte piante tolleranti, che risultano resistenti a questo stress abiotico.

Studiando la tolleranza salina delle linee di mais in assenza e presenza di glicin-betaina, è stato anche riportato [Saneoka, et al. 1995] che un singolo gene, causando un accumulo di glicin-betaina (e/o un locus strettamente legato), gioca un ruolo chiave nel regolamento osmotico delle foglie di mais.

Il trealosio è un altro osmolita presente in una grande varietà di organismi (inclusendo lieviti, funghi, insetti, piante superiori ed inferiori) [Elbein, 1974] ed ha la funzione di proteggere le piante dallo stress e dall'immagazzinamento dei carboidrati [Goddijn, et al. 1999].

La biosintesi del trealosio è stata studiata in *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* e tale processo avviene mediante due fasi, catalizzate dal trealosio-6-fosfato-sintetasi e dal trealosio-6-fosfato-fosfatasi. Il trealosio-6-fosfato è formato da glucosio-6-fosfato e uridine-5-difosfoglucosio mediante il trealosio-6-fosfato-sintetasi, successivamente viene defosforilato a trealosio mediante il trealosio-6-fosfato-fosfatasi [Eastmond, et al. 2003; Cabib, et al. 1958] Figura 6.8.

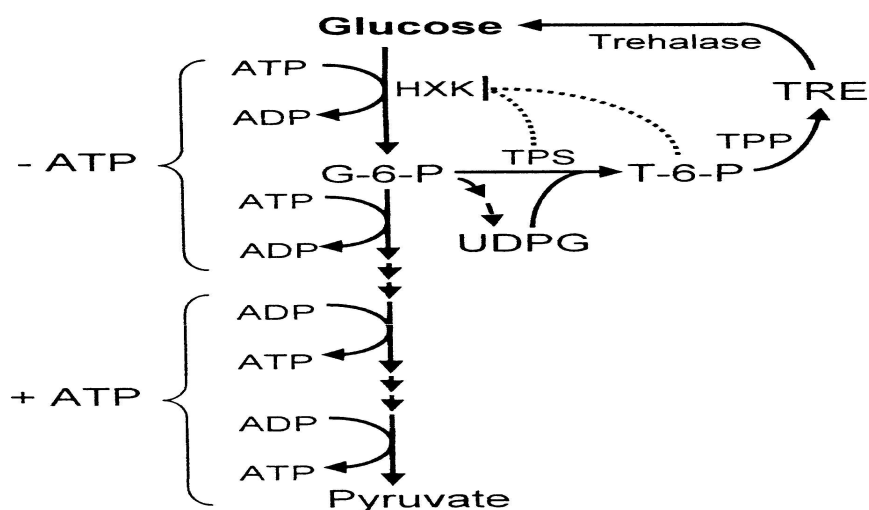


Figura 6.8 Schema della via metabolica del trealosio in *Saccharomyces cerevisiae*. [Eastmond, et al. 2003]

Esso è un componente essenziale dei meccanismi che coordinano il metabolismo durante la crescita, l'adattamento e lo sviluppo della pianta. Il trealosio è conosciuto per accumulare elevate concentrazioni, per sopperire alla completa deidratazione in organismi anidrobiotici [Drennan, et al. 1993], preservando le membrane durante i periodi di siccità [Crowe, et al. 1984]. Questa proprietà fa del trealosio un candidato interessante per l'ingegneria genetica in modo da creare piante altamente resistenti allo stress [Goddijn, et al. 1997].

L'aumento di etanolo nei campioni GM può essere attribuito ad un'alterazione della via glicolitica (trasformazione di piruvato in etanolo) e del ciclo di Krebs. L'alterazione del ciclo di Krebs, nei campioni transgenici, è anche suggerito dal decremento di acido succinico e fumarico e dall'aumento dell'acido citrico.

Lo stesso comportamento è stato osservato nel caso degli acidi organici presenti nella lattuga transgenica e non-transgenica [Sobolev, et al. 2007].

L'elevata produzione di osmoliti "glicin-betaina e trealosio" è stata rivelata in questa linea e non è stata osservata precedentemente in altre linee di mais [Manetti, et al. 2006]. Gli osmoliti come L-carnitina e L-prolin-betaina (stachidrina) sono stati identificati nella linea di mais PR33P67 [Levandi, et al. 2008], usando l'approccio CE-TOF-MS per fare uno screening del metaboloma del mais transgenico. In questo studio, si osservano delle alterazioni nella concentrazione di alcuni metaboliti, che potrebbero essere provocate da diversi fattori.

Tra questi fattori, potrebbero essere coinvolte le mutazioni genetiche come una conseguenza della tecnica biolistica "particle bombardment". Questo è un processo random, che può portare alla distruzione fisica del genoma o alterazione nella regolazione genica, con una potenziale inattivazione dei geni endogeni [Somers, et al. 2004]. Un altro evento di trasformazione, che si potrebbe verificare, è dato dalle mutazioni somaclonali; questo termine indica la generazione dei cambiamenti spontanei ed ereditari nelle culture in vitro [Larkin, et al. 1981]. Ciò è particolarmente vero se una o più mutazioni ereditarie fossero legate strettamente al transgene o a geni, che controllano altri tratti critici, un evento che limiterebbe il valore dell'ingegneria genetica. Il netto coinvolgimento di questo fattore nell'alterazione del profilo metabolico, che non è stato elucidato in questo lavoro, sarà un interessante punto d'inizio per approfondimenti futuri. Altri fattori, potenzialmente responsabili per le alterazioni metaboliche,

potrebbero essere gli effetti pleiotropici: infatti, l'introduzione di una sequenza esterna può influenzare non soltanto la regione prossimale dell'inserzione, dove le modificazioni sono dovute al rimescolamento delle sequenze genetiche per includere il nuovo frammento genetico, ma anche le regioni distali del genoma, influenzando l'intero equilibrio dei pathways metabolici [Somers, et al. 2004]. Gli effetti pleiotropici non possono esseri esclusi, sebbene non siano apparsi nuovi composti nella linea transgenica.

CAPITOLO 7

Conclusioni

Negli ultimi anni le scienze “omiche” hanno riscosso un grande successo nell’ambito scientifico, sia per quanto riguarda la ricerca nell’industria farmaceutica sia nella diagnostica, nella terapeutica e nell’ampio settore delle biotecnologie. Dai risultati, ottenuti dalla presente tesi mediante approccio metabolomico, utilizzando spettroscopia NMR, è stato possibile discriminare i profili metabolici tra varietà transgenica e non-transgenica attraverso un’analisi statistica; di conseguenza si è potuto investigare sulle relative variazioni metaboliche presenti nelle varietà GM e non-GM.

La tecnica d’elezione, scelta per l’indagine metabolomica, è la Risonanza Magnetica Nucleare, poichè ci permette di ottenere dati qualitativi e quantitativi di molti metaboliti, che costituiscono il complesso sistema biologico; inoltre risulta essere una tecnica non distruttiva che consente, contemporaneamente, la rilevazione dei dati in tempi rapidi. Questo approccio è molto diffuso nel campo alimentare, soprattutto in cibi transgenici, poiché è necessario determinare la sicurezza e la salubrità del prodotto. Oggigiorno, per capire l’effetto della dieta sulla salute è necessario lo studio dei meccanismi dei nutrienti ed altri costituenti di cibo bioattivo a livello molecolare, usando l’approccio della nutrigenomica, un nuovo campo emergente, che si focalizza sullo studio di specifici nutrienti e diete sulla salute umana, attraverso l’espressione di informazioni genetiche mediante l’integrazione di tecnologie “omiche” [Rimbach, et al. 2008; Hu and Kong, 2004]. Nel settore alimentare sarà prerogativa della nutrigenomica insieme alle scienze “omiche” di migliorare la qualità nutrizionale e sensoriale, per prevenire malattie croniche (come malattie cardiovascolari, sindromi metaboliche e cancro), ed infine di aumentare la produttività di filiera.

CAPITOLO 8

Bibliografia

Andersen, C.M.; Bro, R.; Brockoff, P.B. Quantifying and handling errors in instrumental measurements using the measurement error theory. *J. Chemometrics*. **2003**, *17*, 621-629.

Assaad, F.F.; Signer, E.R. Cauliflower mosaic virus P35S promoter activity in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **1990**, *223*, 517-520.

Bachmann, M.; Matile, P.; Keller, F. Metabolism of the raffinose family oligasaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. (cold acclimation, translocation, and sink to source transition: discovery of chain elongation enzyme). *Plant Physiol.* **1994**, *105*, 1335-1345.

Barros, E.; Lezar, S.; Antton, M.J.; Van Dijk, J.P.; Rohlig, R.M.; Kok, E.J.; Engel, K.H. Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Plant Biotechnol. J.* **2010**, *8*, 436-451.

Bauer, M.; Bertario, A.; Boccardi, G.; Fontaine, X.; Rao, R.; Verrier, D. Reproducibility of ¹H NMR integrals: a collaborative study. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **1998**, *17*, 419-425.

Bertolla, F.; Simonet, P. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. *Res. Microbiol.* **1999**, *150*, 375-384.

Betz, F.S.; Hammond, B.G.; Fuchs, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **2000**, *32*, 156-173.

Bevan, M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 8711-8721.

Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem.* **1959**, *37*, 911-917.

Braun, S.; Kalinowski, H.-O.; Berger, S. In 150 and More Basic NMR Experiments, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **1998**.

Brock, T.D.; Madigan, M.D.; Mertinko, J.M.; Parker, J. Microbiologia, **1997**. Città Studi Ed.

Cabib, E.; Leloir, L.F. The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.* **1958**, *231*, 259–275.

Cangelosi, G.A.; Martinetti, G.; Leigh, J.A.; Lee, C.C.; Theines, C.; Nester, E.W. Role of *Agrobacterium tumefaciens* chvA protein in export of β -1,2 glucan. *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 1609-1615.

Casadei E. Alimenti derivati da biotecnologie e loro regolamentazione internazionale. *Biologi Italiani Organo Ufficiale dell'Ordine Nazionale dei Biologi*, **2000**, Vol. 4, 11-13.

Castaldini, M.; Turrini, A.; Sbrana, C.; Benedetti, A.; Marchionni, M.; Fabiani, A.; Landi, S.; Santomassimo, F.; Pietrangeli, B.; Nuti, M.P.; Miclaus, N.; Giovannetti, M. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 6719-6729.

Cellini, F.; Chesson, A.; Colquhoun, I.; Constable, A.; Davies, H.V.; Engel, K.H.; Gatehouse, A.M.R.; Karenlampi, S.; Kok, E.J.; Leguay, J.J.; Lehesranta, S.; Noteborn, H.P.; Pedersen, J.; Smith, M. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 1089-1125.

Chassy, B.; Hlywka, J.J.; Kleter, G.A.; Kok, E.J.; Kuiper, H.A.; McGloughlin, M.; Munro, I.C.; Phipps, R.H.; Reid, J.E. Nutritional and safety assessments of foods and feeds nutritionally improved through biotechnology: an executive summary. *Compr. Rev. Food Saf.* 2004, *3*, 38-104.

Chen, L.; Li, C.M.; Nester, E.W. Transferred DNA (T-DNA) associated proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are exported independently of *virB*. *PNAS*, **2000**, *97*, 7545-7550.

Chilton, M.D.; Drummond, M.; Merlo, D.; Sciaky, D.; Montoya, A.; Gordon, M.; Nester, E. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*. **1977**, *11*, 263-271.

Chilton, M.D. A vector for introducing new genes into plants. *Sci Am*. **1983**, *248*, 50-59.

Christie, P.J.; Vogel, J.P. Bacterial type IV: conjugation system adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol*. **2000**, *8*, 354-360.

Christou, P. Rice transformation: bombardment. *Plant Mol. Biol*. **1997**, *35*, 197-203.

Codex Alimentarius Commission. Codex principles and guidelines on foods derived from biotechnology. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Food and Agriculture Organization, Rome. **2003**.
[<http://www.who.int/foodsafety>]

Comin Anduix, B.; Boren, J.; Martinez, S.; Centelles, J.J.; Trebukhina, R.; Petushok, N.; Lee, W.N.; Boros, L.G.; Cascante, M. The effect of thiamine supplementation on tumor proliferation : a metabolic control analysis study. *Eur. J. Biochem*. **2001**, *268*, 4177-4182.

Covacci, A. Come i batteri controllano l'ospite. *Biotech*. **1999**, *3*, 48-52.

Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Chapman, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*. **1984**, *223*, 701-703.

Dagless, E.M.; Shintaku, M.H.; Nelson, R.S.; Foster, G.D. A CaMV 35S promoter driven cDNA clone of tobacco mosaic virus can infect host plant tissue despite being uninfected when manually inoculated onto leaves. *Arch Virol*. **1997**, *142*, 183-191.

Davies, S.E.C.; Iles, R.A.; Stacey, T.E.; De Sousa, C.; Chalmers, R.A. Carnitine therapy and metabolism studied using ^1H -NMR spectroscopy. *Clin. Chim. Acta*. **1991**, *204*, 263-278.

De Fromond, A.J.; Barton, K.A.; Chilton, M.D. Mini Ti: a new vector strategy for plant genetic engineering. *Nature Biotechnol.* **1983**, *1*, 262-269.

De Maagd, R.A.; Bravo, A.; Crickmore, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics.* **2001**, *17*, 193-199.

Ding, S.W.; Rathjen, J.P.; Li, W.X.; Swanson, R.; Healy, H.; Symons, R.H. Efficient infection from cDNA clones of cucumber mosaic cucumovirus RNAs in a new plasmid vector. *J. Gen. Virol.* **1995**, *76*, 459-464.

Drennan, P.M.; Smith, M.T.; Goldsworthy, D.; Van Staden. The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* Welw. *Plant Physiol.* **1993**, *142*, 493-496.

Dunfield, K.E.; Germida, J.J. Impact of genetically modified crops on soil and -plant-associated microbial communities. *Journal of Environmental Quality.* **2004**, *33*, 806-815.

Eastmond, P.J.; Li, Y.; Graham, I.A. Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants?. *J. Exp. Bot.* **2003**, *54*, 533-537.

EC, **1996**. Commission Decision 96/281/EC of 3 April 1996. Concerning the placing on the market of genetically modified soya beans (*Glycine max* L.) with increased tolerance to the herbicide glyphosate pursuant to Council Directive 90/220/EEC. Off. J. Eur. Communities L 107, 10-11.

EC, **1997**. Commission Decision 97/98/EC of 23 January 1997. Concerning the placing on the market of genetically modified maize (*Zea mays* L.) with the combined modification for insecticidal properties conferred by the Bt-endotoxin gene and increased tolerance to the herbicide glufosinate ammonium pursuant to Council Directive 90/220/EEC. Off. J. Eur. Communities L 31, 69-70.

EC, **2001**. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organism and repealing Council Directive 90/220/EEC. Off. J. Eur. Communities L 106, 1-39.

EC, **2003a**. Regulation 1829/2003/EC of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. Off. J. Eur. Communities L 268, 1-23.

EC, **2003b**. Regulation 1830/2003/EC of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. Off. J. Eur. Communities L 268, 24-28.

EFSA. Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. EFSA J. **2006a**, 99, 1–100.

[http://www.efsa.europa.eu/science/gmo/gmo_guidance/660_en.html].

Elbein, A.D. The metabolism of α,α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1974**, 30, 227–256.

Fakhfakh, H.; Vilaine, F.; Makni, M.; Robaglia, C. Cell-free cloning and biolistic inoculation of an infectious cDNA of potato virus Y. *J. Gen. Virol.* **1996**, 77, 519-523.

Fan, T.M.-W. Metabolite profiling by one-and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1996**, 28, 161–219.

FAO/WHO. Biotechnology and Food Safety. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. FAO Food and Nutrition, Paper 61. **1996**. [www.who.int].

FAO and the biosafety. Protocol to the Convention on Biological Diversity. Plant production and protection division. FAO, Rome, Italy. **2000**. [www.fao.org]

FAO/WHO. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on foods derived from biotechnology. **2000**. FAO Food and Nutrition, Paper 29. [http://www.fao.org/ag/agn/agns/biotechnology_expert_2000_en.asp].

FAO/WHO. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO. Expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. January 22-25, Rome, Italy. **2001**. [www.who.int].

Fardella, G.; Barbetti, P.; Chiappini, I.; Grandolini, G. Quantitative analysis of fluoroquinolones by ^1H and ^{19}F NMR spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*. **1995**, *121*, 123-127.

Finamore, A.; Roselli, M.; Britti, S.; Monastra, G.; Ambra, R.; Turrini, A.; Mengheri, E. Intestinal and peripheral response to MON810 maize ingestion in weaning and old mice. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9206-9214.

Galli, E. Biotecnologie ambientali. *Le Scienze quaderni*. **1999**, *106*, 47-53.

Gan, C. Gene gun accelerates DNA-coated particles to transform intact cells. *The Scientist*, **1989**, *3*, 25.

Gao, A. G.; Hakimi, S. M.; Mittanck, C. A.; Wu, Y.; Woerner, H.; Stark, D. H.; Shah, D. H.; Liang, J.; Rommens, C. M. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1307-1310.

Gardner, R.C.; Howarth, A.J.; Hahn, P.; Brown-Luedi, M.; Shepherd, R.J.; Messing, J. The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing. *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 2871-2888.

Geiser, M.; Schweizer, S.; Grimm, C. The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of *hurdh1* gene of subsp. Kurstaki HD1. *Gene*. **1986**, *48*, 109-118.

Gilli, G.; Saglia, U.; Bugliosi, E.H. Le Biotecnologie applicate al comparto agroalimentare. *Biologi italiani Organo Ufficiale dell'Ordine Nazionale dei Biologi*, **2000**, Vol. 4, 14-19.

Goddijn, O.J.M.; Verwoerd, T.C.; Voogd, E.; Krutwagen, R.W.H.H.; De Graaf, P.T.H. M.; Poels, J.; Van Dun, K.; Ponstein, A.S.; Damm, B.; Pen, J. Inhibition of trehalose activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol.* **1997**, *113*, 181-190.

Goddijin, O.J.M.; Van Duc, K. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci.* **1999**, *4*, 315–319.

Goto, F.; Toki, S.; Uchimiya, H. Inheritance of a co-transferred foreign gene in the progenies of transgenic rice plants. *Transgenic Res.* **1999**, *2*, 300-305.

Govindaraju, V.; Young, K.; Maudsley, A.A. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed.* **2000**, *13*, 129–153.

Haritatos, E.; Keller, F.; Turgeon, R. Raffinose oligosaccharide concentrations measured in individual cell and tissue types in *Cucumis melo L.* leaves: implications for phloem loading. *Planta.* **1996**, *198*, 614-622.

Hehn, A.; Rohde, W. Characterization of cis-acting elements affecting strength and phloem specificity of the coconut foliar decay virus promoter. *J. Gen. Virol.* **1998**, *79*, 1495-1499.

Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. Metodi spettroscopici nella chimica organica. **2000**. EdiSES – Napoli.

Hiei, Y.; Ohta, S.; Komari, T.; Kumashiro, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa L.*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* **1994**, *6*, 271-282.

Hiei, Y.; komari, T.; Kubo, T. transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* **1997**, *35*, 205-218.

Hooykaas, P.J.J.; Schilperoort, R.A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* **1992**, *19*, 15-38.

Hopkins, D.W.; Gregorich, E.G., “Decomposition of transgenic (Bt) maize (*Zea mais L.*) residues in soil”. In proceedings of Eurosoil **2004**, Freiburg (Germany), 4-12 September.

Hu, R.; Kong, A.N. Activation of MAP kinases, apoptosis and nutrigenomics of gene expression elicited by dietary cancer-prevention compounds. *Nutrition.* **2004**, *20*, 23-88.

ISAAA. International Service for the Acquisition of Agri-biotechnology Applications. **2009**. [www.isaaa.org].

Jaquet, F.; Hütter, R.; Lüthy, P. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*, 500-504.

Jeon, G.A.; Eum, J.S.; Sim, W.S. The role of inverted repeat (IR) sequence of the *virE* gene expression in *Agrobacterium tumefaciens* pTiA6. *Molecules and Cells.* **1998**, *8*, 49-53.

Jermini, M. Il punto di vista dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). *Biologi Italiani Organo Ufficiale dell' Ordine Nazionale dei Biologi.* **2000**, Vol. *4*, 7-10.

Kapur, G.S.; Cabrita, E.J.; Berger, S. The qualitative probing of hydrogen bond strength by diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7181-7185.

Kiyokawa, K.; Yamamoto, S.; Sakuma, K.; Tanaka, K.; Moriguchi, K.; Suzuki, K. Construction of disarmed Ti plasmids transferable between *Escherichia coli* and *Agrobacterium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 1845-1851.

Knowles, B.H.; Dow, J.A.T. The crystal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: model for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays.* **1993**, *15*, 469-476.

Kohli, A.; Leech, M.; Vain, P.; Laurie, D.A.; Christou, P. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1998**, *95*, 7203-7208.

Kohlstedt, M.; Becker, J.; Wittmann, C. Metabolic fluxes and beyond – systems biology understanding and engineering of microbial metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 1065-1075.

Kok, E.J.; Kuiper, H.A. Comparative safety assessment for biotech crops. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 439-444.

Koziel, G.M.; Beland, G. L.; Bowman, C.; Carozzi, N. B.; Crenshaw, R.; Crossland, L.; Dawson, J.; Desai, N.; Hill, M.; Kadwell, S.; Launis, K.; Lewis, K.; Maddox, D.; McPherson, K.; Meghji, M. R.; Merlin, E.; Rhodes, R.; Warren, G. W.; Wright, M.; Evola, S.V. Field Performance of Elite Transgenic Maize Plants Expressing an Insecticidal Protein Derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nat. Biotechnol.* **1993**, *11*, 194–200.

Krishnan, P.; Kruger, N.J.; Ratcliffe, R.G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, 255-265.

Kumar, K.K.; Maruthasalam, S.; Loganathan, M.; Sudhakar, D.; Balasubramanian, P. An improved *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for recalcitrant elite indica rice cultivars. *Plant Mol. Biol. Rep.* **2005**, *23*, 67–73.

Larkin, P.J.; Scowcroft, W.R. Somaclonal variation: A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* **1981**, *60*, 197–214.

Lee, C.A. Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukariotic cells? *Trends Microbiol.* **1997**, *5*, 148-156.

Lee, T.C.; Zeng, J.; Bailey, M.; Sims, S.R.; Sanders, P.R.; Fuchs, R.L. Assessment of equivalence of insected protected corn and *E.coli* produced B.t.k. HD-1 protein. *Plant Physiol. Suppl.* **1995**, 108-151.

Le Gall, G.; Colquhoun, I.J.; Davis, A.L.; Collins, G.J.; Verhoeyen, M.E. Metabolite profiling of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using ¹H NMR spectroscopy as a tool to detect potential unintended effects following a genetic modification. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2447-2456.

Levandi, T.; Leon, C.; Kaljurand, M.; Garcia-Canas, V.; Cifuentes, A. Capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry for comparative metabolomics of transgenic versus conventional maize. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6329–6335.

Lipp, M.; Brodmann, P.; Pietsch, K.; Pauwels, J.; Anklam, E.; Borchers, T.; Braunschweiger, G.; Busch, U.; Eklund, E.; Eriksen, F.D.; Fagan, J.; Fellingner, A.; Gaugitsch, H.; Hayes, D.; Hertel, C.; Hörtner, H.; Joudrier, P.; Kruse, L.; Meyer, R.; Miraglia, M.; Müller, W.; Phillipp, P.; Pöpping, B.; Rentsch, R.; Wurtz, A. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *J. AOAC Int.* **1999**, 82, 923-928.

Lundina, T.A.; Knubovets, T.L.; Sedov, K.R.; Markova, S.A.; Sibeldin, L.A. Variability of Kidney tubular interstitial distortions in glomerulo nephritis as measured by ¹H-NMR urinalysis. *Clinica Chimica Acta.* **1993**, 214, 165–173.

Manetti, C.; Bianchetti, C.; Bizzarri, M. Casciani, L.; Castro, C.; D'Ascenzo, G.; Delfini, M.; Di Cocco, M.E.; Laganà, A.; Miccheli, A.; Motto, M.; Conti, F. NMR-based metabonomic study of transgenic maize. *Phytochem.* **2004**, 65, 3187-3198.

Manetti, C.; Bianchetti, C.; Casciani, L.; Castro, C.; Di Cocco, M.E.; Miccheli, A.; Motto, M.; Conti, F. A metabonomic study of transgenic maize (*Zea mays*) seeds revealed variations in osmolytes and branched amino acids. *J. Exp. Bot.* **2006**, 57, 2613–2625.

Mannina, L.; Cristinzio, M.; Sobolev, A.P.; Ragni, P.; Segre, A.L. High-Field Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Study of Truffles (*Tuber aestivum vittadini*). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 7988-7996.

Mannina, L.; Sobolev, A.P.; Capitani, D.; Iaffaldano, N.; Rosato, M.P.; Ragni, P.; Reale, A.; Sorrentino, E.; D'Amico, I.; Coppola, R. NMR metabolic profiling of organic and aqueous sea bass extracts: implication in the discrimination of wild and cultured sea bass. *Talanta.* **2008**, 77, 433-444.

Matsuki, R.; Onodera, H.; Yamauchi, Y.; Uchimiya, H. Tissue-specific expression of the rolC promoter of the Ri plasmid in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* **1989**, 220, 6-12.

Matthysse A.G. Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **1987**, 169, 313-323.

-
- Mattoo, A. K.; Sobolev, A.P.; Neelam, A.; Goyal, R.K.; Handa, A.K.; Segre, A.L. Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolite profiling of transgenic tomato fruit engineered to accumulate spermidine and spermine reveals enhanced anabolic and nitrogen-carbon interactions. *Plant Physiol.* **2006**, *142*, 1759–1770.
- Matzke, A.J.; Chilton, M.D. Site-specific insertion of genes into T-DNA of the *Agrobacterium* tumor – inducing plasmid: an approach to genetic engineering of higher plant cells. *J. Mol. Appl. Genet.* **1981**, *1*, 39-49.
- Mendz, G.L.; Hazell, S.L. Aminoacid Utilization by *Helicobacter pylori*. *J. Biochem. Cell Biol.* **1995**, *27*, 1085–1093.
- Metcalf, D.D.; Astwood, J.D.; Townsend, R.; Sampson, H.A.; Taylor, S.L.; Fuchs, R.L. Assessment of the allergenic potentials of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1996**, *36*, 165-186.
- Meyer, R. Understanding and controlling transgene expression. *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 332-337.
- Miccheli, A.; Aureli, T.; Delfini, M.; Di Cocco, M.E.; Viola, P.; Gobetto, R.; Conti, F. Study on influence of inactivation enzyme techniques and extraction procedures on cerebral phosphorylated metabolite levels by ^{31}P NMR spectroscopy. *Cell. Mol. Biol.* **1988a**, *34*, 591–603.
- Miccheli, A.; Ricciolini, R.; Piccolella, E.; Delfini, M.; Conti, F. Modulation of human lymphoblastoid B cell line by phorbol ester and sphingosine. A ^{31}P - NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1991**, *1093*, 29–35.
- Miccheli, A.; Aureli, T.; Di Cocco, M.E.; Veneziane, E.; Conti, F. ^{31}P and ^1H -NMR Spectroscopy in rat brain. Glycerophosphodieester levels and energy metabolism. *Mag. Res. Med. Biol.* **1988b**, *1*, 297 –304.
- Miccheli, A.; Delfini, M.; Aureli, T.; Di Cocco, M.E.; Tomassini, A.; Calderoni, G.; Conti, F. Aging brain: ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy study on energy and phospholipid metabolism. *Mag. Res. Med. Biol.* **1988c**, *1*, 157–168.

Morris, K.F.; Johnson, C.S. Diffusion-ordered-two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Amer. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3139-3141.

Morris, K.F.; Stilbs, P.; Johnson, C.S. Analysis of mixtures based on molecular size and hydrophobicity by means of diffusion ordered 2D-NMR. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 211-215.

Mountford, C.E.; and Mackinnon, W.B. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Lymphocytes: An Historical Perspective. *Immunomethods.* **1994**, *4*, 98–112.

Nicholson, J.K.; Lindon, J.C.; Holmes, E. Metabolomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica.* **1999**, *29*, 1181-1189.

Nielsen, J.; Oliver, S. The next wave in metabolome analysis. *Trends in Biotechnol.* **2005**, *23*, 544-546.

Nordlee, S.; Taylor, S.L.; Townsend, J.A.; Thomas, L.A.; Bush, R.K. Identification of a Brazil nut allergen in transgenic soybeans. *New England Journal of Medicine.* **1996**, *334*, 688-692.

Oliver, S.G.; Winson, M.K.; Kell, D.B.; Baganz, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 373- 378.

Peng, J.; Lyznik, L.; Lee, L.; Hodges, T.K. Co-transformation of indica rice protoplasts with gus A and neo genes. *Plant Cell Rep.* **1990**, *9*, 168-172.

Pereira, A. A transgenic perspective on plant functional genomics. *Transgenic Res.* **2000**, *9*, 245-260.

Perlak, F.J.; Deaton, R.W.; Armstrong, T.A.; Fuchs, R.L.; Sims, S.R.; Greenplate, J.T.; Fischhoff, D.A. Insect resistant cotton plants. *Nature Biotechnol.* **1990**, *8*, 939-943.

Piccioni, F.; Borioni, A.; Delfini, M.; Del Giudice, M. R.; Mustazza, C.; Rodomonte, A.; Risuleo, G. Metabolic alterations in cultured mouse fibroblasts

induced by an inhibitor of the tyrosine kinase receptor FGFR-1. *Anal. Biochem.* **2007**, *367*, 111–121.

Piccioni, F.; Capitani, D.; Zolla, L.; Mannina, L. NMR metabolic profiling of transgenic maize with the *CryIA(b)* gene. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6041-6049.

Pietramellara, G.; Asher, J.; Ceccherini, M.T.; Renella, G. Soil as a biological system. *Ann. Microbiol.* **2002**, *52*, 119-131.

Pontoni, G.; Rotondo, F.; Spagnolo, G.; Aurino, M.T.; Cartenì-Farina, M.; Zappia, V.; Lama, G. Diagnosis and follow-up of cystinuria: use of proton magnetic resonance spectroscopy. *Aminoacids.* **2000**, *19*, 469-476.

Rauschen, S.; Schaarschmidt, F.; Gathmann, A. Occurrence and field densities of Coleoptera in the maize herb layer: implications for Environmental Risk Assessment of genetically modified Bt-maize. *Transgenic Res.* **2010**, *19*, 727-744.

Rimbach, G.; Boesch-Saadatmandi, C.; Frank, J.; Fuchs, D.; Enzel, H.; Daniel, W.L.; Hall, P.D.; Weimberg, P.D. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease a molecular perspective. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 1308-1319.

Ronald, P.C. Rendere il riso resistente alle malattie. *Quaderni Le Scienze.* **1999**, *106*, 64-69.

Rubtsov, D.V.; Jenkins, H.; Ludwig, C.; Easton, J.; Viant, M.R.; Gunther, U.; Griffin, J.L.; Hardy N. Proposed reporting requirements for the description of NMR- based metabolomics experiments. *Metabolomics.* **2007**, *3*, 223-229.

Sampson, H.A.; Burks, A.W. Mechanisms of food allergy. *Ann. Rev. Nutr.* **1996**, *16*, 161-177.

Saneoka, H.; Nagasaka, C.; Hahn, D.T.; Yang, W.; Premachandra, G.S.; Joli, R.J.; Rhodes, D. Salt tolerance of glycinebetainedeficient and -containing maize lines. *Plant Physiol.* **1995**, *107*, 631–638.

Saxena, D.; Stotzki, G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringensis* is released from root of transgenic *Bt* corn in vitro and in situ. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2000**, *33*, 35-39.

Scholthof, H.B.; Wu, F.C.; Gowda, S.; Shepherd, R.J. Regulation of caulimovirus gene expression and the involvement of cis-Acting elements on both viral transcripts. *Virology.* **1992**, *190*, 403-412.

Scholthof, H.B. Rapid delivery of foreign genes into plants by direct rub-inoculation with intact plasmid DNA of a tomato bushy stunt virus gene vector. *J. Virol.* **1999**, *73*, 7823-7829.

Shah, D.M.; Rommens, C.M.T.; Beachy, R.N. Resistance to disease and insects in transgenic plants: progress and application to agriculture. *Trends in Biotechnol.* **1995**, *13*, 362-368.

Shen, W.H.; Escudero, J.; Hohn, B. T-DNA transfer to maize plants. *Mol. Biotechnol.* **1999**, *13*, 165-170.

Sobolev, A.P.; Segre, A.L.; Giannino, D.; Mariotti, D.; Nicolodi, C.; Brosio, E.; Amato, M.E. Strong increase of foliar inulin occurs in transgenic lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) overexpressing the *Asparagine synthetase A* gene from *Escherichia coli*. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10827–10831.

Somers, D.A.; Makarevitch, I. Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 126-131.

Stam, M.; Mol, J.N.M.; Kooter, J.M. The silence of genes in transgenic plants. *Ann. Bot.* **1997**, *79*, 3-12.

Summer, L.W.; Mendes, P.; Dixon, R.A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochem.* **2003**, *62*, 817-836.

Taji, T.; Ohsumi, C.; Iuchi, S.; Seki, M.; Kasuga, M.; Kobayashi, M.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2002**, *29*, 417-426.

The *Arabidopsis* Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **2000**, 408, 776-815.

Tolonen, A.; Joutsamo, T.; Mattila, S.; Kamarainen, T.; Jalonen, J. Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and ¹H-NMR methods. *Phytochem. Anal.* **2002**, 13, 316-328.

Trovato, M. Trasferimento genico in cellule vegetali. [<http://darwin01.bio.uniroma1.it/Vettori piante aggiornato al 14/12/1999>].

Tzfira, T.; Rhee, Y.; Chen, M.H.; Kunik, T.; Citovsky, V. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: molecules that walk through the walls. *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**, 54, 187-219.

Uchimiya, H.; Handa, T.; Brar, D.S. Transgenic plants. *J. Biotech.* **1989**, 12, 1-20.

Van Rie, J.; Jansens, S.; Höfte, H.; Degheele, D.; Van Mellaert, H. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of bacillus thuringiensis delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, 56, 1378-1385.

Viel, S.; Mannina, L.; Segre, A.L. Detection of a π - π complex by diffusion-ordered spectroscopy (DOSY). *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 2515-2519.

Weber, H.P.; Haeckel, P.; Pfitzner, A.J. A cDNA clone of tomato mosaic virus is infectious in plants. *J. Virol.* **1992**, 66, 3909-3912.

Wecknerth, W.; Morgenthal, K. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discov. Today.* **2005**, 10, 1551-1558.

Wevers, R.A.; Engelke, U.; Heerschap A. High Resolution ¹H NMR spectroscopy of blood plasma for metabolic studies. *Clin. Chem.* **1994**, 40, 1245-1250.

Widmer, F.; Seidler, R.J.; Watrud, L.S. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosmos. *Mol. Ecol.* **1996**, 5, 603-613.

Widmer, F.; Seidler, R.J.; Donegan, K.K.; Reed, G.L. Quantification of transgenic plant marker gene persistence in the field. *Mol. Ecol.* **1997**, 5, 6-17.

Wiechert, W. ^{13}C Metabolic Flux Analysis. *Metab. Eng.* **2001**, 3, 195-206.

Winans, S.C.; Burns, D.L.; Christie, P.J. Adaptation of conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol.* **1996**, 4, 64-68.

www.nepadbiosafety.net

Ziemienowicz, A. Plant transgenesis. *Methods Mol. Biol.* **2010**, 631, 253-268.

Zolla, L.; Rinalducci, S.; Antonioli, P.; Righetti, P.G. Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications. *J. Proteome Res.* **2008**, 7, 1850-1861.

Zupan, J.R.; Zambryski, P.C. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* **1995**, 107, 1041-1047.