



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA VEGETALE
CICLO XXII**

*Colture cellulari di Artemisia annua L. per lo studio
della via biosintetica e la produzione dell'antimalarico
artemisinina*

Dottoranda
Dott.ssa Rossella Nisi

Tutor
Prof. Andrea Fabbri

Coordinatore
Prof. Marcello Tomaselli

Co-tutore
Dott.ssa Sofia Caretto

Anno 2010

INDICE

SCOPO DELLA RICERCA	1
Abbreviazioni	5
INTRODUZIONE	6
Malaria	7
Vettore malarico	7
Farmaci antimalarici	9
<i>Artemisia annua</i> L.	10
Artemisinina	11
Attività farmacologica dell'artemisinina	14
Analisi dell'artemisinina	15
Biosintesi dell'artemisinina	16
Sintesi chimica dell'artemisinina	18
Produzione biotecnologica dell'artemisinina mediante ingegneria metabolica	18
Colture <i>in vitro</i>	20
Colture <i>in vitro</i> per la produzione di metaboliti secondari	22
Colture <i>in vitro</i> per la produzione di artemisinina	24
MATERIALI E METODI	26
Induzione delle colture di callo	27
Materiale di partenza	27
Terreno di coltura	27
Condizioni di crescita	29
Induzione delle colture cellulari in sospensione	30
Materiale di partenza e terreno di coltura	30
Condizioni di crescita	30
Curva di crescita delle cellule in sospensione	30
Trattamento delle cellule in sospensione con elicitatori e inibitori	31
Micropropagazione dei germogli	31
Materiale di partenza	31
Terreno di coltura	32

Condizione di crescita	32
Valutazione del contenuto di artemisinina	32
Colorazione dei terpeni	33
Documentazione microscopica e fotografica	34
Analisi della espressione genica	34
Estrazione dell'RNA totale dalle cellule e piantine	34
Elettroforesi su gel di agarosio	34
Stima della concentrazione di RNA	35
Estrazione di DNA	35
<i>Reverse transcription-PCR</i>	36
<i>Real time PCR</i>	37
Isolamento del fattore di trascrizione <i>AaWRKY3</i>	38
Clonaggio	39
Preparazione di un costrutto chimerico tra WRKY e GFP	39
Cellule competenti e trasformazione	39
Estrazione di DNA plasmidico da batteri (mini prep)	41
Purificazione dei frammenti di DNA da gel	42
Ligazione	42
Screening delle colonie ricombinanti	43
Sequenziamento	43
Protoplasti	43
Preparazione di protoplasti	43
Trasformazione transiente dei protoplasti con PEG	44
Visualizzazione mediante microscopia confocale	47
Analisi statistica	49
RISULTATI	50
Colture <i>in vitro</i>	51
Induzione di calli	51
Induzione di sospensioni cellulari	54
Micropropagazione dei germogli	55
Valutazione del contenuto di artemisinina	56
Colorazione dei terpeni	59

Elicitazione delle colture per la produzione di artemisinina	59
Trattamento con estratti fungini	63
Alterazione dell'espressione genica	65
Analisi semi-quantitativa <i>Reverse Transcription-PCR</i>	65
Analisi quantitativa <i>Real Time PCR</i>	66
Caratterizzazione dei domini subcellulari in cellule di <i>A. annua</i>	68
Fattori di trascrizione WRKY	72
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	74
BIBLIOGRAFIA	81
RINGRAZIAMENTI	93

SCOPO DELLA RICERCA

La malaria è una malattia febbrile acuta diffusa dalla puntura della zanzara femmina del genere *Anopheles*, che colpisce 350-500 milioni di persone l'anno, è endemica in Africa ed Asia. Nell'uomo la malaria è causata da quattro specie diverse di un protozoo del genere *Plasmodium*. Il *P. falciparum*, è la specie che provoca la forma più grave di malaria. Per più di 350 anni questa malattia è stata trattata con chinino, ma nell'ultimo decennio è stato scoperto che il chinino, non ha più effetto su molti ceppi resistenti di *P. falciparum*. Oggi un trattamento alternativo, efficace e sicuro, contro la malaria è rappresentato dall'artemisinina, un sesquiterpene lattone estratto da una pianta medicinale cinese *Artemisia annua* L. Recentemente l'OMS ha raccomandato di utilizzare trattamenti combinati con artemisinina (*Artemisinin-Based Combined Therapy*), come prima linea di trattamento per quei ceppi resistenti alla cura tradizionale.

L'*Artemisia annua* L. è una pianta aromatica erbacea annuale appartenente alla famiglia delle *Asteraceae*. E' una pianta endemica della Cina ma ormai naturalizzata in diversi Paesi, in Europa e Nord America. L'artemisinina è sequestrata nei tricomi ghiandolari che ricoprono in particolar modo la superficie di foglie e fiori. La concentrazione di artemisinina nella pianta è relativamente bassa da 0,1 a 1% del peso secco. La produzione di artemisinina è ancora notevolmente costosa, vista la scarsa quantità di molecola presente nella pianta ed il periodo piuttosto limitato della sua presenza nella pianta. D'altra parte l'estrazione dell'artemisinina richiede un'attenta separazione cromatografica e la sintesi chimica della stessa molecola è difficile da ottenere, con costi elevati e bassa resa. Ecco perché sono numerosi i gruppi di ricerca il cui principale obiettivo è quello di aumentare il contenuto *in planta* di artemisinina oppure di produrla in colture *in vitro* o mediante ingegnerizzazione di microrganismi.

Gli studi finora condotti, per definire la via biosintetica dell'artemisinina hanno permesso di individuare diversi enzimi e i relativi geni. Tuttavia alcuni passaggi restano ancora da chiarire. Le colture *in vitro* rappresentano un valido strumento per uno studio approfondito delle vie biosintetiche di metaboliti vegetali, perché permettono di operare in condizioni sperimentali ben definite e controllate.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di allestire diversi tipi di colture cellulari di *Artemisia annua* al fine di individuare il sistema più idoneo alla produzione *in vitro* di artemisinina e

di indagare sulla regolazione della via biosintetica, valutando l'espressione dei geni noti in colture in sospensione di *A. annua*, sottoposte a differenti trattamenti.

Sono state allestite diverse tipologie di colture *in vitro* di *Artemisia annua* L. (colture di calli, cellule in sospensione e piantine micropropagate). Per aumentare il contenuto di artemisinina le colture in sospensione sono state elicitate con metil jasmonato, una molecola che stimola il metabolismo secondario e miconazolo, un inibitore della sintesi degli steroli, la via competitiva dei sesquiterpeni. Inoltre, le cellule sono state trattate con elicitori biotici come l'estratto fungino di *Penicillium verrucosum*. Attraverso analisi HPLC si è potuto osservare che i trattamenti hanno stimolato in misura differenziale la produzione di artemisinina. Il trattamento con metil jasmonato ha indotto un aumento massimo di 2,4 volte del contenuto di artemisinina dopo 4 ore di trattamento. Nel trattamento con miconazolo si è raggiunto il livello più alto di artemisinina (1,6 volte) quando le cellule sono state trattate per 5 giorni alla concentrazione di 200 µM.

L'analisi dell'espressione genica, mediante *Real Time* PCR, ha permesso di studiare la regolazione di alcuni geni della via biosintetica dell'artemisinina. L'analisi dell'espressione in cellule in sospensione di *Artemisia annua* ha rivelato, un aumento dell'espressione dei geni *CYP71AV1*, *CPR* e *Dbr2*, codificanti rispettivamente per gli enzimi *citocromo P450 monossigenasi*, *citocromo P450 reduttasi* e *aldeide artemisinica Δ11(13) reduttasi*. In particolare si è evidenziato un aumento dell'espressione di *CYP71AV1* di circa 7 volte, dopo 30 min di trattamento con metil jasmonato. Nelle cellule trattate con miconazolo 200 µM si è evidenziato un forte aumento dell'espressione del gene *Dbr2*, e di *CPR* rispettivamente dopo 30 min e 4 ore di trattamento.

In questo lavoro di tesi è stato inoltre messo a punto il protocollo di isolamento di protoplasti sia da cellule in sospensione sia da piantine micropropagate di *Artemisia annua*. I protoplasti sono stati trasformati transientemente.

Un altro aspetto della ricerca è stato volto ad identificare geni codificanti fattori di trascrizione in grado di influenzare la biosintesi di artemisinina. In particolare la nostra attenzione è stata focalizzata sulla famiglia di fattori di trascrizione WRKY. È stato isolato un nuovo fattore WRKY in *Artemisia annua* denominato *AaWRKY3*. La sequenza di *AaWRKY3* è stata utilizzata per creare un costrutto chimerico con *tag* fluorescente: WRKY:GFP, utilizzato per trasformare transientemente protoplasti di cellule in sospensione di *A. annua*. Il costrutto WRKY:GFP andava a localizzarsi specificamente nel nucleo, così come tutti i fattori di trascrizione.

Questo lavoro è inserito in un progetto di ricerca finanziato dalla Regione Puglia dal titolo: “Caratterizzazione molecolare e attività biologica di principi farmacologicamente attivi estratti da varietà di artemisia, pianta proposta per la riconversione di zone destinate alla tabacchicoltura”; che vede come partner l’Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) del CNR di Lecce, l’Università degli Studi di Bari, l’Università del Salento e l’azienda farmaceutica Lachifarma.

ABBREVIAZIONI

2,4-D	acido 2,4-diclorofenossiacetico
ACT	<i>Artemisinin-Based Combined Teraphy</i> (terapia combinata all'artemisinina)
ADS	<i>amorfa-4,11-diene sintasi</i>
artemisia	<i>Artemisia annua</i> L.
BAP	benzilaminopurina
CPR	<i>citocromo P450 reduttasi</i>
CYP71AV1	<i>citocromo P450 monoossigenasi</i>
Dbr2	<i>aldeide artemisinina $\Delta 11(13)$ reduttasi</i>
DDT	diclorodifeniltricloroetano
DMAPP	dimetilallil pirofosfato
DMSO	dimetilsolfossido
ELISA	saggio d'immunoassorbimento con enzima coniugato (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FPS	<i>farnesil pirofosfato sintasi</i>
GA ₃	gibberellina
HPLC	cromatografia liquida ad alta prestazioni
IPP	isopentenil pirofosfato
MeJA	metil jasmonato
MS	terreno di coltura Murashige e Skoog
MS/MS	spettrometria di massa in tandem
NAA	acido naftalenacetico
NMR	risonanza magnetica nucleare
PS	peso secco
RE	Reticolo endoplasmatico
UV	ultravioletto
WHO	Organizzazione Mondiale della Sanità (<i>World Health Organization</i>)

INTRODUZIONE

MALARIA

E' argomento di attualità il proposito dell'Italia e della Unione Europea di mettere a punto nuove strategie per il controllo della malaria e per l'eliminazione completa del parassita dalle aree più povere del mondo. Secondo le stime più accreditate dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO), quasi 500 milioni di persone contraggono annualmente la malaria e tra questi due milioni sono le persone che muoiono ogni anno di malaria. Ma il dramma peggiore è che il 90% sono bambini sotto i cinque anni e donne gravide (Butler *et al.*, 1997). In pratica la malaria uccide un bambino ogni 30 secondi (WHO, 1996).

La malaria è una malattia endemica in vaste aree del pianeta, soprattutto in Africa ed Asia (Fig. 1), dalle quali provengono i flussi migratori verso l'Europa. Inoltre la possibilità di spostarsi nei diversi continenti ha contribuito alla diffusione della malaria anche nei paesi industrializzati, dove ogni anno si evidenziano circa 10.000–30.000 nuovi casi.

L'interesse nei confronti della malaria è, inoltre, aumentato dall'inefficacia dei trattamenti con i comuni antimalarici, incapaci di combattere la diffusione della malattia a causa di una crescente farmaco-resistenza. Il problema della diffusione della malaria è reso ancora più importante dall'assenza di un vaccino contro il suo parassita.

VETTORE MALARICO

Il termine *malaria* deriva dall'italiano medievale *mala aria* e rappresenta una parassitosi che colpisce le persone che vivono in zone paludose, da cui deriva il vecchio nome di *paludismo*. La malaria è causata da un protozoo del genere *Plasmodium*, in particolare dalle quattro specie: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Recentemente è stato scoperto una quinta specie di protozoo che causa la malaria sia nell'uomo che negli animali (in particolare nelle scimmie), si tratta di *Plasmodium knowlesi* (White, 2008). La specie responsabile del maggior numero di morti è il *P. falciparum*, ospite del principale vettore malarico africano, la zanzara *Anopheles gambiae*. I sintomi della malattia sono comuni a tutte le forme di malaria: brividi, febbre, cefalea, dolori addominali ed infine anemia. Solo il *Plasmodium falciparum* può attaccare il cervello e dare luogo alla malaria celebrale o pernicioso.

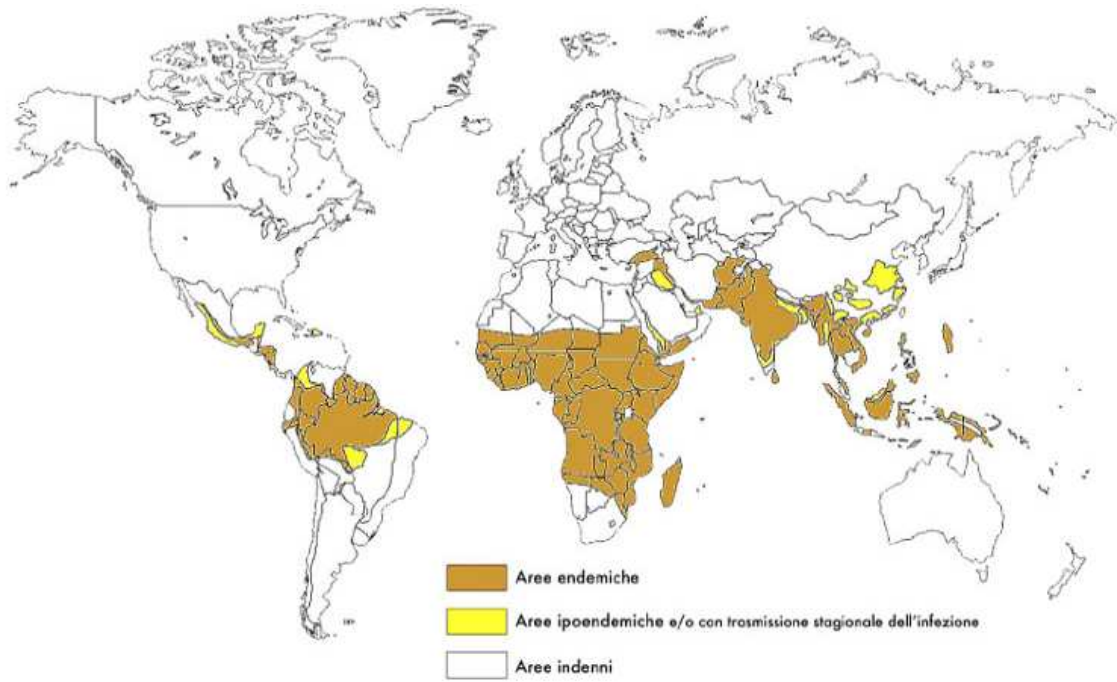


Fig. 1. Distribuzione geografica della malaria nel mondo. (Da Bisoffi *et al.*, 2006).

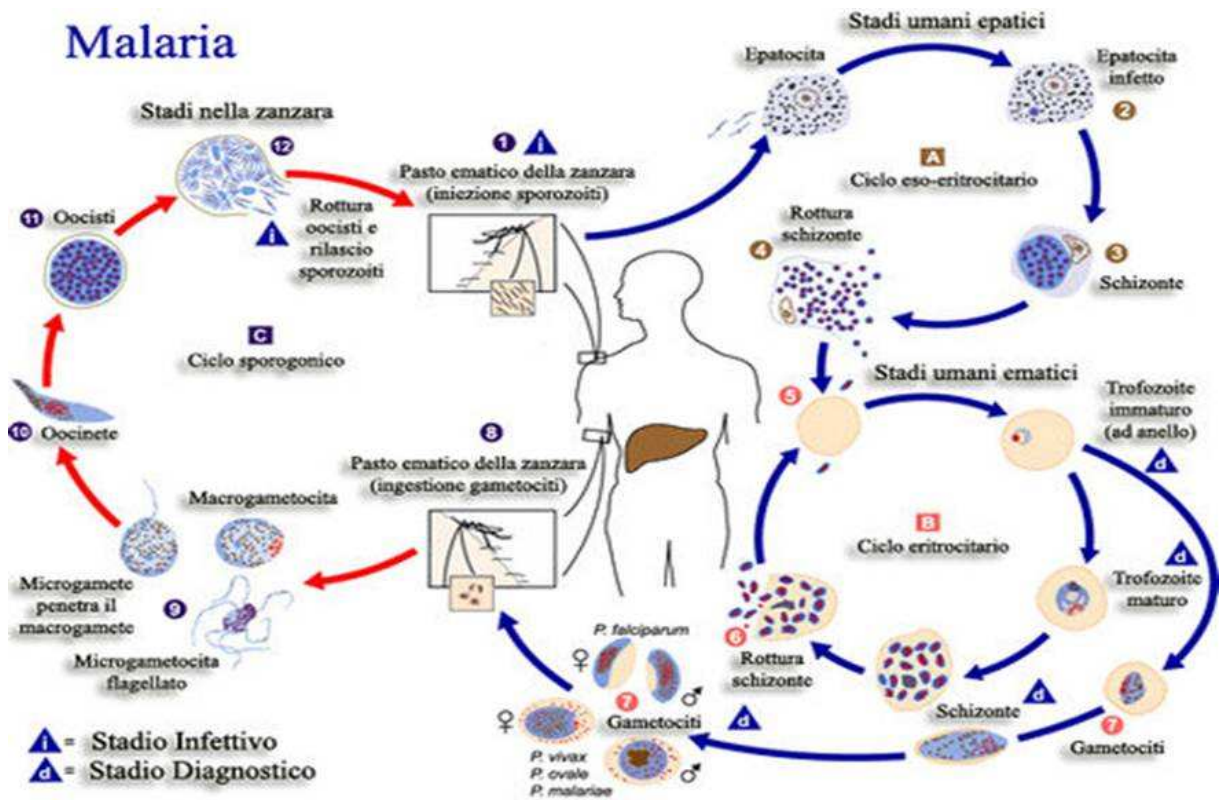


Fig. 2. Ciclo vitale dei plasmodi (Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta).

Il ciclo del plasmodio viene suddiviso in due fasi principali: quella esoeritrocitaria e la fase sporogonica.

L'infezione nell'uomo inizia con la puntura di una zanzara femmina del genere *Anopheles* (Fig. 2), la quale per potersi nutrire inietta dalle sue ghiandole salivari un anticoagulante, col quale vengono trasmessi i plasmodi allo stadio di sporozoiti. Dopo una breve permanenza nel circolo ematico, gli sporozoiti invadono gli epatociti dove subiscono schizogenia producendo i merozoiti, che vanno ad invadere nuove cellule. Questa fase moltiplicazione a sessuata viene detta eso-eritrocitaria (perchè esterno ai globuli rossi). Dopo alcuni giorni i merozoiti entrano nel circolo sanguigno infettando gli eritrociti (ciclo eritrocitario), dove possono accrescersi (trofozoiti) assumendo inizialmente la tipica forma ad anello e riprodursi. Quando il globulo rosso risulta riempito da queste forme si rompe, liberandole in circolo, dove i plasmodi possono infettare nuovi globuli rossi. Ad un certo punto alcuni merozoiti si modificano in forme sessuate: i gametociti. Quando una nuova zanzara punge l'individuo ammalato, col sangue succhia anche i gametociti (nei globuli rossi) che termineranno la differenziazione solo nell'intestino dell'insetto (ciclo sessuato o sporogonico). Dopo la fecondazione lo zigote subisce meiosi e diventa un organismo detto oocinete, mobile e di forma allungata; questo invade la parete del medio intestino della zanzara, dove diventa oocisti. L'oocisti cresce, si rompe e libera gli sporozoiti, che raggiungono le ghiandole salivari della zanzara e vengono inoculati nell'uomo, alla successiva puntura, dando nuovamente inizio al ciclo.

FARMACI ANTIMALARICI

In passato la lotta contro la malaria si basava su diverse strategie, la prima prevedeva la disinfezione dalla zanzara, vettore della malaria, attraverso l'uso del pesticida DDT (diclorodifeniltricloroetano). Ma questo approccio ha portato all'emergenza della resistenza al DDT nella zanzara. Inoltre questo pesticida induce effetti collaterali per la riproduzione degli animali e infine risulta molto persistente nella catena alimentare.

Nella storia della medicina occidentale, il primo medicamento efficace, impiegato per il trattamento della malaria fu la corteccia della pianta di *Chincona ledgeriana*, scoperta in Perù nel 1600 e importata in Europa dai gesuiti. Nel 1800 in Francia, si ottenne dalla corteccia il principio attivo anti-malarico in forma pura, un alcaloide che fu chiamato chinino. La sua corteccia contiene altri alcaloidi anti-malarici (chinidina, cinchonina, cinchonidina), ma quello comunemente impiegato è rimasto il chinino. Successivamente furono scoperte altre sostanze come la cloroquina, amodiachina e pirimetamina. Purtroppo

l'impiego su larga scala dei farmaci per la profilassi avrebbe selezionato ceppi di plasmodio chemio-resistenti. La farmaco-resistenza (o chemio-resistenza) in *P. falciparum* comparve in seguito all'impiego esteso del farmaco, al quale sopravvivono solo i ceppi meno sensibili o resistenti, che successivamente rimpiazzano quelli completamente sensibili. Ciò avviene più rapidamente quando il farmaco in questione viene usato in quantità insufficiente riguardo alla posologia e alla durata del trattamento. La farmaco-resistenza, secondo la WHO, si definisce come “la capacità dei ceppi di plasmodio di sopravvivere e moltiplicarsi nonostante la somministrazione e l'assorbimento di un farmaco somministrato in dosi uguali o maggiori a quelle normalmente raccomandate, ma comunque sopportabili dal paziente”.

La medicina occidentale attinse allora da quella tradizionale cinese e scoprì il *qing hao su*, o artemisinina, estratto dalla pianta aromatica *Artemisia annua* L., che veniva impiegato da secoli in Oriente, sotto forma di infuso, per il trattamento delle febbri. Questa pianta è stata già menzionata per la prima volta nel 168 a.C. nel testo cinese "Rimedi per 52 malattie" ritrovato in Mawangdui nella tomba della dinastia degli Han (Abdin *et al.*, 2003). Il primo riferimento sicuro sull'uso della pianta contro la malaria risale al 340 d.C., quando la stessa venne menzionata da Ge Hon nel "Manuale delle prescrizione per terapie d'urgenza". Nel 1969 l'esercito cinese trovava che un estratto di etere dietilico di *A. annua* aveva un eccellente effetto contro la malaria (Abdin *et al.*, 2003).

L'artemisinina è un farmaco senza nessuna somiglianza chimico-strutturale con i precedenti antimalarici, dalla quale furono successivamente sintetizzati l'artemetere, l'artesunato e l'arteetere.

Attualmente l'artemisinina rientra tra i farmaci utilizzati per la terapia, nota come *Artemisinin-Based Combined Therapy* (ACT) raccomandata dalla WHO (2005), in associazione con la cloroquina o pirimetamina e sulfadiazina. È stato dimostrato che l'artemisinina è efficace anche nella cura di alcune forme di cancro come il cancro al colon e la leucemia (Panossian *et al.*, 2005; Singh e Lai 2004; Efferth, 2006; Withers e Keasling, 2007).

ARTEMISIA ANNUA L.

L'*Artemisia annua*, detta anche *sweet annie* o *annual wormwood*, è una pianta erbacea annuale che appartiene alla famiglia delle *Asteraceae* (Tab. 1), endemica della vegetazione della steppa cinese tra i 1000 e i 1500 m sopra il livello del mare (Wang, 1961). La pianta presenta un potenziale adattamento a diversi suoli e latitudini, oggi, si è naturalizzata anche

in altri paesi quali Ungheria, Bulgaria, Romania, Turchia, Argentina, Italia, Francia e Spagna (Klayman, 1993); ma non si sviluppa in zone tropicali dove la malaria è così diffusa. La fioritura è indotta da periodi brevidiurni con fotoperiodo di 14/16 h. I suoi semi germinano in primavera e la sua fioritura avviene a fine estate (ad una latitudine di 40°21'N). La propagazione può avvenire per seme o per talea. E' una pianta a portamento cespuglioso che può raggiungere i 2 metri di altezza, con fogliame verde ceruleo, le foglie presentano auricole basali e la pagina superiore si presenta di un colore verde scuro, mentre la pagina inferiore biancastra e tomentosa. Le foglie alla base del fusto sono ampie e frastagliate, mentre quelle apicali sono allungate e divise in 2-3 lobi; i rami sono alternati. I capolini giallo oro sono portati in pannocchie su lunghi fusti ramificati e solcati, i frutti sono costituiti da minuscoli acheni senza pappo, la radice è fittonante (Fig. 3).



Fig. 3. A. Pianta di *Artemisia annua* L. B. Capolini di artemisia. C. Particolare della foglia di artemisia.

Tab. 1. Pianta *Artemisia annua* L. e la sua classificazione botanica.

Classificazione botanica	
Regno:	Plantae
Divisione:	Magnoliophyta
Classe:	Magnoliopsida
Ordine:	Asterales
Famiglia	Asteraceae
Genere:	Artemisia
Specie:	A. annua L.

ARTEMISININA

L'artemisinina è un endoperossido sesquiterpene lattone che appartiene al gruppo degli isoprenoidi (o terpenoidi). Le proprietà antimalariche dell'artemisinina sono legate alla funzione di perossido del sesquiterpene lattone. Il principio attivo è stato isolato nel 1972 e la sua struttura è stata definita nel 1979 mediante l'analisi ai raggi X (Liu *et al.*, 1979; Klayman 1985). La sua formula chimica è C₁₅H₂₂O₅ (Fig. 4). La particolarità

dell'artemisinina consiste nel fatto di presentare caratteristiche strutturali diverse dagli altri farmaci antimalarici, poiché presenta un anello eterociclico contenente ossigeno e non azoto, tipico degli altri antimalarici.

Il trattamento con artemisinina e i suoi derivati è attivo rapidamente sulla fase asessuale del *Plasmodium falciparum*, rimuove velocemente i parassiti eliminando così i sintomi della malattia. Questi farmaci sono ben tollerati e privi di significativi effetti collaterali.

I derivati dell'artemisinina, artesunato, artemetere, arteetere, acido artesunico e artenulico, (Wallaart *et al.*, 1999) (Fig. 5) hanno un'azione più rapida e sono da 5 a 10 volte più efficaci delle molecole abituali. La loro durata di vita molto breve rende minimo il rischio di apparizione di resistenza.

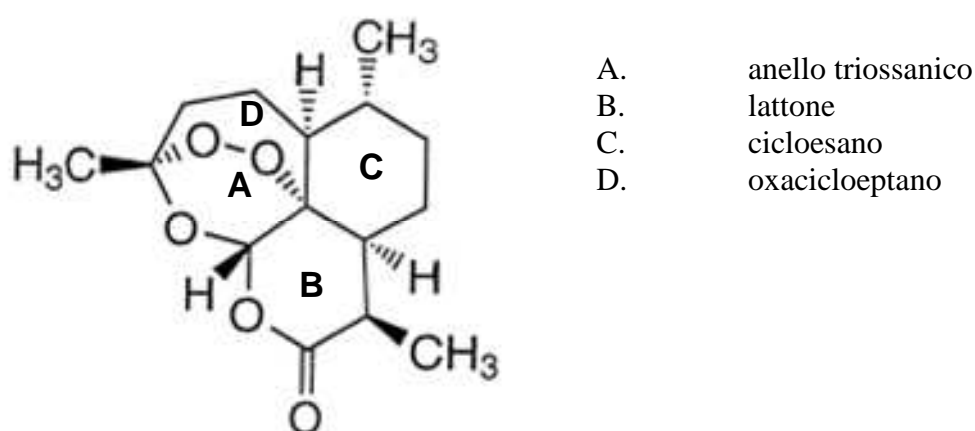


Fig. 4. Struttura chimica dell'artemisinina.

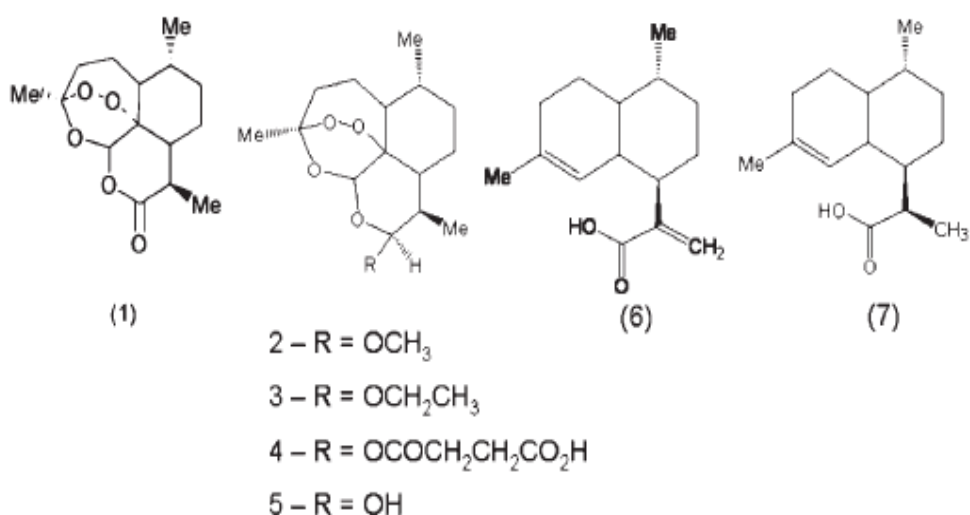


Fig. 5. Derivati dell'artemisinina: artemisinina (1), artemetere (2), arteetere (3), artesunato (4), diidroartemisinina (5), acido artemisinico (6) e acido diidroartemisinico (7) (Castilho *et al.*, 2008).

Il luogo di maggior accumulo dell'artemisinina sono le foglie ma anche i fiori, i semi e le gemme. L'unica parte della pianta in cui non è stata rilevata la presenza è rappresentata dalle radici e nel polline (Acton e Klayman, 1985; Charles *et al.*, 1990; Ferriera e Janick 1995). In particolare l'artemisinina è sequestrata all'interno dei tricomi ghiandolari che ricoprono la superficie di foglie e fiori. In artemisia ritroviamo due tipi di tricomi: uno filamentoso in cui non si accumulano oli essenziali e uno ghiandolare, in cui si accumulano (Ferriera e Janick, 1995). I tricomi ghiandolari sono formati da 5 paia di cellule con diversi tipi cellulari, che svolgono funzioni diverse (Fig. 6). Duke e Paul nel 1993, attraverso studi ultrastrutturali, hanno dimostrato che nei tricomi ghiandolari si ritrovano un paio di cellule basali, uno mediale e tre paia di cellule secretorie. Osservando al microscopio ottico le cellule basali, mediali e il paio di cellule secretorie apicale si nota che risultano essere incolore al contrario le due paia di cellule secretorie subapicali sono verdi (Covello *et al.*, 2007). La cuticola, che ricopre le tre paia di cellule apicali forma una sacca bilobata dove si accumulano i mono e sesquiterpeni (Fig. 7 A). Lo sviluppo dei tricomi inizia subito dopo lo sviluppo della foglia. L'analisi di un biotipo di *Artemisia annua* senza tricomi ghiandolari ha evidenziato l'assenza di artemisinina nella pianta (Duke *et al.*, 1994).

Vi sono opinioni contrastanti circa il periodo in cui la concentrazione di artemisinina è più elevata. Secondo alcuni ricercatori, la maggior produzione del sesquiterpene lattone si ha nel periodo immediatamente precedente alla fioritura, secondo altri, invece, si ha durante il periodo di massima fioritura. Wang nel 2004 ha studiato gli effetti del gene *fpfl* (fattore promotore della fioritura di *Arabidopsis thaliana* Landsberg, trasferito in artemisia mediante *Agrobacterium tumefaciens*) evidenziando che la fioritura non è necessaria per aumentare il contenuto di artemisinina in pianta; e inoltre, il periodo migliore di raccolta è tra la fine della crescita vegetativa e l'inizio della fioritura.

Durante tutto il ciclo vitale della pianta l'artemisinina è sempre presente, la quantità è bassa quando spuntano le foglie, ma aumenta con lo sviluppo delle foglie e la massima produzione si ottiene quando inizia la senescenza delle foglie (Lommen *et al.*, 2005). La produzione di artemisinina è influenzata da fattori climatici come luce, temperatura, acqua e sali minerali.

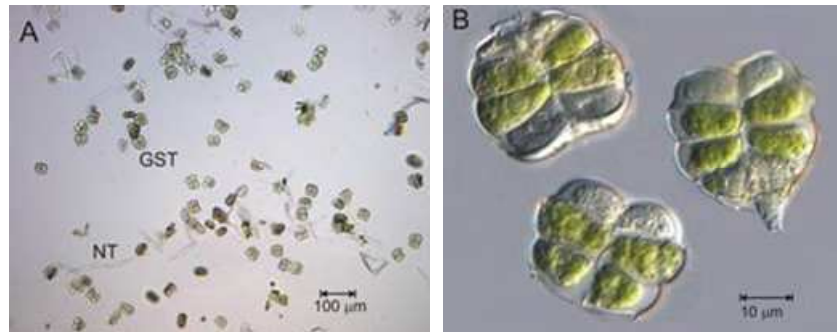


Fig. 6. A. Tricomi di *Artemisia annua* L. al microscopio ottico: tricomi ghiandolari secretori (GST) e tricomi non ghiandolari (NT). B. Ingrandimento dei tricomi ghiandolari (da Covello et al., 2007).

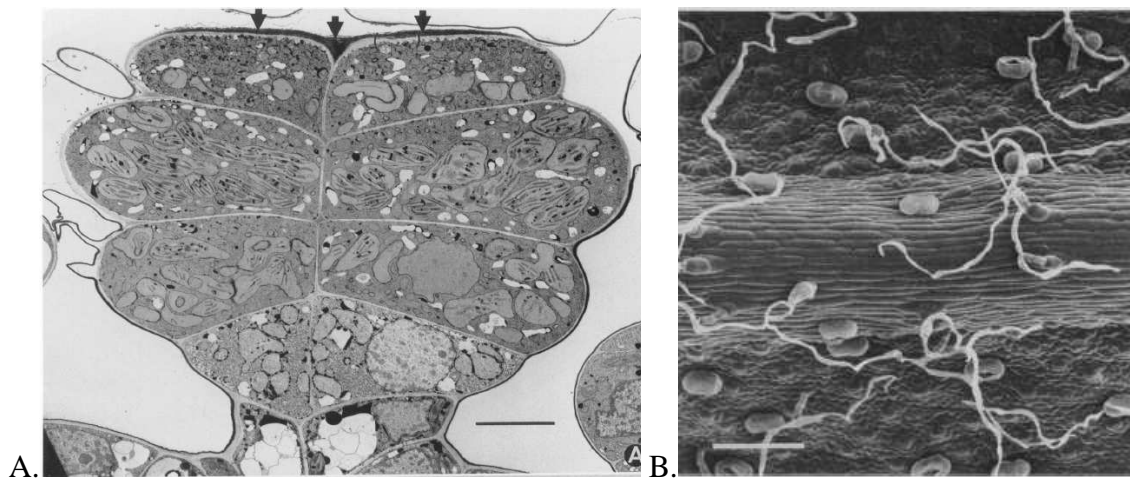


Fig. 7. A. Tricoma ghiandolare al TEM (Microscopio elettronico a trasmissione) allo stadio di 10 cellule dopo l'espansione cuticolare. Barra= 5 µm. B. Foglia di *Artemisia annua* L. con tricomi ghiandolari. Barra= 100 µm (Duke e Paul, 1993).

ATTIVITÀ FARMACOLOGICA DELL'ARTEMISININA

L'artemisinina e i suoi derivati riescono a eliminare il plasmodio molto più velocemente degli altri farmaci, grazie al fatto che sono efficaci già a basse concentrazioni. Essi determinano cambiamenti strutturali delle membrane dei parassiti, causando la formazione di vacuoli autofagici, con conseguente perdita del citoplasma e morte dei parassiti stessi. La funzione perossidica è di fondamentale importanza per l'attività antimalarica; sembra, infatti, che ad uccidere i parassiti sia la produzione di composti citotossici quali radicali liberi ed aldeidi reattive. L'artemisinina agisce rapidamente a livello dello stadio asessuato del parassita, che rappresenta la forma più maligna e con modalità diverse rispetto agli altri antimalarici. Nel trattamento di una forma grave di malaria l'iniezione endovenosa di

artesanato (un derivato dell'artemisinina) ha un'azione molto più rapida rispetto a quella esercitata dal chinino (Dondorp *et al.*, 2006). Mentre questi ultimi reagiscono con l'ossigeno, producendo radicali liberi, l'artemisinina si converte essa stessa in radicale libero, reagendo con il ferro. La sua azione dipende da due passaggi sequenziali. Il primo passaggio è detto di attivazione e prevede una scissione del ponte endoperossidico mediata dal ferro, che genera un radicale organico instabile e/o un'altra specie elettrofilica (Kamchonwongpaisan *et al.*, 1992; Posner e Oh, 1992). Infine il ferro attiva l'artemisinina convertendola in radicale libero (Meshnick, 1994) (Fig. 8).

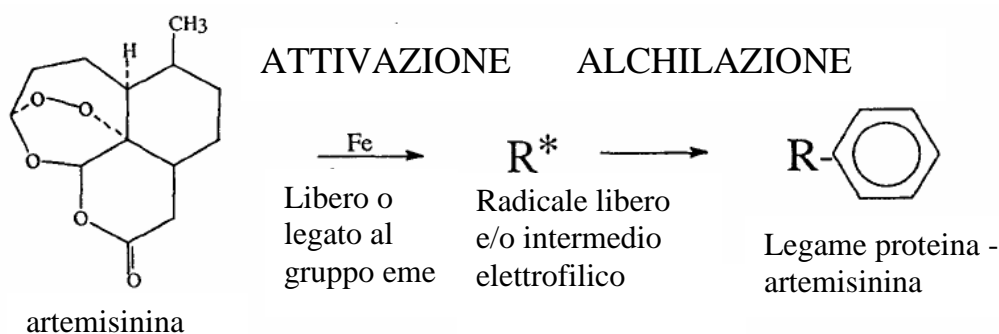


Fig. 8. Meccanismo d'azione dell'artemisinina.

ANALISI DELL'ARTEMISININA

L'analisi dell'artemisinina è particolarmente difficile poiché il composto è instabile, è presente in basse concentrazioni nella pianta, si colora scarsamente; la presenza di altri composti nell'estratto della pianta interferisce con la sua determinazione. Inoltre è sensibile al trattamento con acidi e basi; risulta stabile fino ad una temperatura di 150°C, ma quando la temperatura raggiunge i 180-200°C inizia a degradarsi, dando origine a numerosi sottoprodotti (Luo e Shen, 1987).

E' possibile determinare il contenuto di artemisinina utilizzando un sistema costituito dalla spettrometria di massa in tandem (MS/MS) (Ranashige *et al.*, 1993). Sono stati sviluppati anche dei metodi basati sull'uso di anticorpi come il metodo RIA (saggio radio immunologico) (Zhao *et al.*, 1986) o ELISA (saggio d'immunoassorbimento con enzima coniugato) (Jaziri *et al.*, 1993), che risultano essere molto sensibili e specifici rispetto ai metodi convenzionali.

Un metodo innovativo è rappresentato dalla quantificazione dell'artemisinina direttamente nell'estratto con acetone mediante H-NMR (Castilho *et al.*, 2008).

Infine, sebbene sia noto che l'artemisinina manca di gruppi cromofori, essa può essere derivatizzata con idrossido di sodio e trasformata in una molecola (Q260) che assorbe agli UV e quindi analizzata mediante HPLC (Smith *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2004).

BIOSINTESI DELL'ARTEMISININA

I terpenoidi si formano a partire da due precursori: l'isopentenil pirofosfato (IPP) e il suo isomero dimetilallil pirofosfato (DMAPP). Le piante superiori hanno due diverse vie biosintetiche di formazione dell'IPP: il *pathway* citosolico del mevalonato e il *pathway* mevalonato-indipendente localizzato nei plastidi. Gli emiterpeni isopentenil pirofosfato e dimetilallil difosfato condensandosi danno origine al geranyl difosfato (GPP). Il GPP possiede un gruppo allilico fosfato attivo in grado di reagire con una nuova molecola di IPP per dare il farnesil pirofosfato, con tre unità isopreniche (C₅). Il precursore dell'artemisinina è l'amorfa-4,11-diene, che deriva dal farnesil pirofosfato, mediante ciclizzazione; la reazione è catalizzata dall'*amorfa-4,11-diene sintasi*. Anche se la struttura dell'artemisinina è stata scoperta nel 1979, il gene responsabile del primo step, l'*amorfa 4-11-diene sintasi*, è stato isolato solo nel 1999 (Bouwmeester *et al.*, 1999). Il secondo enzima *CYP71AV1*, *citocromo P450 monoossigenasi*, è stato isolato da tricomi ghiandolari di *A. annua* (Teoh *et al.*, 2006). Si tratta di un citocromo P450 multifunzionale NADPH dipendente, che catalizza ossidazioni multiple, utilizzando un *citocromo P450 reduttasi* (CPR), dall'amorfadiene all'alcol artemisinico (idrossilazione), dall'alcol all'aldeide artemisinina e infine dall'aldeide all'acido artemisinico (Fig. 9) (Bertea *et al.*, 2005; Covello *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008).

La riduzione del doppio legame del $\Delta^{11(13)}$ dell'aldeide artemisinica a acido diidroartemisinico è catalizzato dall'enzima *aldeide artemisinina $\Delta^{11(13)}$ reduttasi* (*Dbr2*) (Zhang *et al.*, 2008).

Rimane ancora non chiarita la parte finale della biosintesi dall'acido artemisinico all'artemisinina, poiché non sono stati ancora caratterizzati gli enzimi coinvolti. Una via alternativa propone che l'artemisinina derivi dall'acido diidroartemisinico attraverso una serie di reazioni non enzimatiche. Brown ha sviluppato lo schema in figura 10 per la conversione ossigeno-dipendente a artemisinina (Brown e Sy, 2004). Il keto-enol può essere formato dall'acido diidrossiartemisinico in presenza di un singoletto ossigenico, che può derivare dall'assorbimento di UV o di luce visibile o dal perossido di idrogeno; l'intermedio è l'idroperossido allilico terziario. Un secondo perossido viene formato in presenza di un tripletto ossigenico, segue la formazione di un perossido acetile e un gruppo

acetile lattone, con la formazione dell'artemisinina, attraverso reazioni spontanee non catalizzate da enzimi (Covello, 2008).

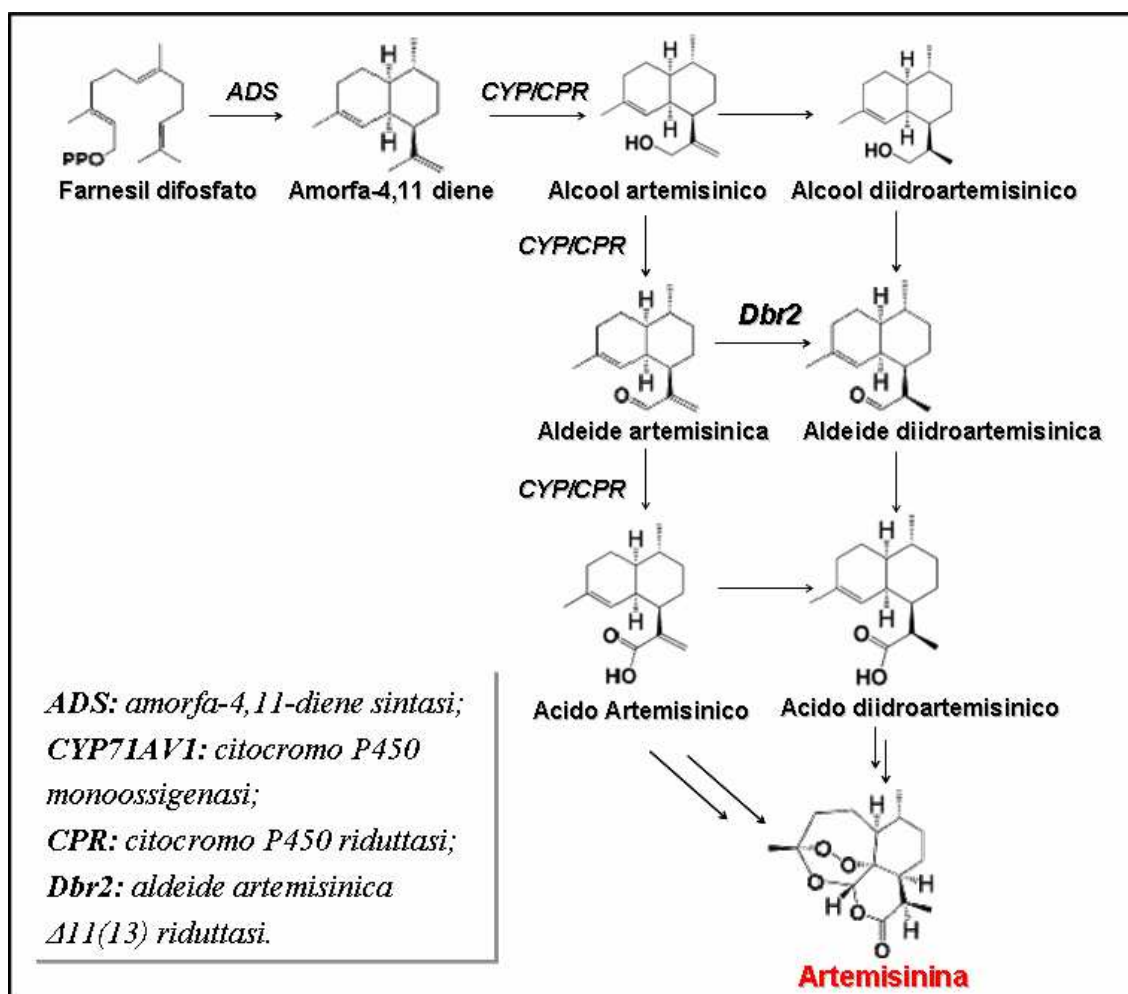


Fig. 9. Biosintesi dell'artemisinina (Teoh *et al.*, 2006).

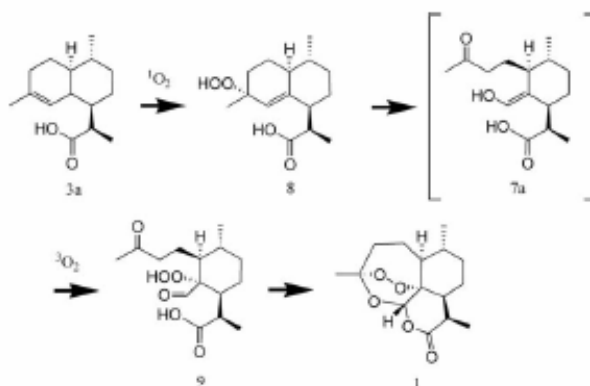


Fig. 10. Possibile ossidazione non enzimatica da diidroartemisinina a artemisinina: 3a. acido diidroartemisinico, 8. idroperossido allilico terziario, 7a. keto-enol, 9. idroperossido, 1. artemisinina. (Covello, 2008).

SINTESI CHIMICA DELL'ARTEMISININA

Il primo tentativo di sintesi dell'artemisinina si ebbe grazie a Schmid e Hofheinz (1983) che convertirono la molecola di (-)-isopulegol in artemisinina in 13 passaggi con una resa finale del 5%. Un'alternativa è quella di ottenere l'artemisinina a partire dai suoi precursori biosintetici. Tra questi compare l'acido artemisinico che è 8-10 volte più abbondante della stessa artemisinina (Haynes e Vonwiller, 1991). Recentemente un analogo dell'artemisinina OZ 277 è stato sintetizzato e mostra un'attività antimalarica (Vennerstrom *et al.*, 2004).

L'artemisinina ottenuta per sintesi chimica richiede costi elevati, sebbene sia difficile determinare il costo di una molecola la cui produzione richieda vari passaggi. L'artemisinina ottenuta a partire da monoterpene β -pinene viene, ad esempio, venduta al prezzo finale di circa 100 \$/kg che risulta poco vantaggioso soprattutto per i paesi in via di sviluppo (Covello, 2008).

PRODUZIONE BIOTECNOLOGICA DELL'ARTEMISININA MEDIANTE INGEGNERIA METABOLICA

Le attuali fonti commerciali di artemisinina sono le piante cresciute in campo che come è noto, sono soggette alle variazioni stagionali e ai possibili attacchi di patogeni, funghi, batteri e insetti, che potrebbero alterare la biosintesi del principio attivo (Klayman, 1985). La produzione dell'artemisinina è ancora notevolmente costosa, vista la scarsa quantità di molecola presente nella pianta (la sua quantità varia tra 0.01-0,8% di peso secco; (Abdin *et al.*, 2003), il periodo piuttosto limitato della sua presenza. Per questi motivi, sono numerosi i gruppi di ricerca il cui principale obiettivo è quello di aumentare il contenuto *in planta* di artemisinina utilizzando vari approcci come *breeding* tradizionale e/o biotecnologie innovative.

Gruppi di ricerca, finanziati da importanti fondazioni come Bill and Melinda Gates Foundation, stanno portando avanti ricerche per aumentare la disponibilità di artemisinina nel mondo. Tra questi l'Università di York (UK), dove si sta studiando il breeding tradizionale di *Artemisia annua* L. e il miglioramento genetico con tecniche molecolari (Delabays *et al.*, 2001).

Un approccio di ingegneria metabolica mira ad aumentare la produzione di artemisinina andando ad agire sui geni codificanti per enzimi e fattori di trascrizione, che regolano la via biosintetica dell'artemisinina. Grazie all'ingegneria genetica possono essere utilizzati vettori per la trasformazione derivati dai plasmidi naturali di due specie di *Agrobacterium*:

rhizogenes e *tumefaciens*. Il gruppo di Han ha ottimizzato il sistema di trasformazione in *A. annua* mediata da *A. tumefaciens*, ottenendo un'alta efficienza di trasformazione e con un'ottima rigenerazione di piante di artemisia (Han *et al.*, 2005).

In piante transgeniche di artemisia, trasformate con *Agrobacterium tumefaciens*, è stato overespresso l'enzima *farnesil pirofosfato sintasi (FPS)* che catalizza la reazione tra IPP e GPP per formare farnesil pirofosfato. Le piante transgeniche mostravano un incremento di artemisinina di 2-3 volte rispetto alle non transgeniche (Han *et al.*, 2006).

L'effetto del gene dell'*isopentenil transferasi (ipt)* sulle caratteristiche fisiologiche e biochimiche è stato indagato in *Artemisia annua* da Geng (2001). L'overespressione di questo gene aumentava il livello di citochinine nella pianta. E' stata trovata una correlazione positiva tra citochinine, clorofilla e artemisinina, infatti l'artemisinina aumentava del 20-30% in piante transgeniche (Sa *et al.*, 2001).

Anche altre piante potrebbero essere utilizzate per la produzione di artemisinina, come la cicoria (*Cichorium intybus*, *Asteraceae*) che appartiene alla stessa famiglia dell'*Artemisia annua* e produce dei sesquiterpeni lattoni. E' stata rilevata la presenza in cicoria dell'attività di *amorfa diene ossidasi*; l'espressione dell'*amorfa diene sintasi* potrebbe portare alla formazione acido artemisinico che attraverso una sintesi chimica potrebbe essere convertito in artemisinina (De Kraker *et al.*, 2003).

Poiché l'estrazione da tessuti vegetali, anche quelli trasformati, dà basse rese di terpenoidi, alcuni ricercatori hanno studiato un metodo alternativo per produrre tali composti in un ospite microbico, poiché potrebbe essere una via di produzione su larga scala e con costi contenuti. Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è stato ingenerizzato per produrre acido artemisinico, in tre fasi: a) espressione in lievito della via del mevalonato, b) espressione in lievito del gene *amorfa diene sintasi* isolato da artemisia, c) espressione del citocromo P450 che determina l'ossidazione a tre step all'amorfa-4,11-diene, fino alla produzione di acido artemisinico. L'acido artemisinico prodotto in *S. cerevisiae* recuperato nel substrato di coltura, viene poi convertito, in seguito ad una semi-sintesi, in artemisinina (Ro *et al.*, 2006). Martin e collaboratori sono riusciti a ingegnerizzare *Escherichia coli* per il gene *amorfa diene sintasi* e far esprimere in batteri il *pathway* del mevalonato proveniente da *Saccharomyces cerevisiae*, ottenendo così acido artemisinico, che attraverso una sintesi chimica viene convertito in artemisinina (Martin *et al.*, 2003) (Tab. 2).

L'università di Berkeley in collaborazione con l'industria farmaceutica Sanofi-Aventis ha prodotto artemisinina semisintetica ottenuta da ospiti microbici. Con il recente clonaggio del gene *aldeide artemisinica $\Delta 11(13)$ reductasi* è stato possibile produrre in lieviti acido

diidroartemisinico che può essere convertito chimicamente in artemisinina (Zhang *et al.*, 2008).

È evidente però che con la manipolazione genetica finora sono stati ottenuti solo alcuni precursori dell'artemisinina.

Tab. 2. Produzione artemisinina in ospiti biologici (Covello 2008).

Biological host	Starting material or intermediate for chemical synthesis	Reference	Comments
None	Monoterpenes	Schmid and Hofmeier, 1983	Expensive; low yields in >8 steps
<i>E. coli</i>	Amorphadiene (4)	Martin <i>et al.</i> , 2003	High biosynthetic yields; >3 chemical steps
Tobacco	Amorphadiene (4)	Wu <i>et al.</i> , 2006	Low yield
<i>E. coli</i>	Artemisinic acid (2)	Chang <i>et al.</i> , 2007	Efficient cytochrome P450 expression is a challenge
Yeast	Artemisinic acid (2)	Ro <i>et al.</i> , 2006	High yields
Yeast	Dihydroartemisinic acid (3a)	Zhang <i>et al.</i> , 2008	Yields not optimized, simple chemistry
Chicory	Artemisinic acid (2)/dihydroartemisinic acid (3a)	http://www.difra.be	In progress
<i>A. annua</i> hairy roots	None	Towler <i>et al.</i> , 2007	Low yields
<i>A. annua</i>	None	Delahays <i>et al.</i> , 2001	US\$150-1600/kg; expensive compared to other malaria drugs

Per aiutare concretamente i paesi colpiti dalla malaria bisognerebbe aumentare il contenuto del principio attivo *in planta*. Attualmente si stanno testando le proprietà terapeutiche della tisana fatta con le foglie dell'*Artemisia annua* Anamed, un ibrido dell'*Artemisia annua* che può crescere ai tropici. È importante utilizzare l'estratto da foglie di artemisia perchè esso contiene altre sostanze come i flavonoidi che potenziano l'azione tossica dell'artemisinina nei confronti del *Plasmodium falciparum*.

La Mediplant in Svizzera ha brevettato un incrocio dell'artemisia, Artemis, un ibrido tra i cloni cinesi e vietnamiti, che produce artemisinina per una resa dell'1% del peso secco. Questo clone è caratterizzato da una tarda fioritura ed è disponibile per i paesi tropicali (Ferreira *et al.*, 2005).

COLTURE IN VITRO

Con il termine di “coltura *in vitro* di cellule o tessuti vegetali” si indica l'insieme di procedure e tecnologie atte alla introduzione di espianti vegetali in condizioni di sterilità, su substrati nutritivi appositamente formulati e in ambiente controllato per luce (intensità e qualità), fotoperiodo e temperatura, allo scopo di stimolare e controllare i fenomeni di differenziazione, moltiplicazione e morfogenesi cellulare.

Il principio su cui si basa la coltura *in vitro* è la totipotenza delle cellule vegetali, queste ultime hanno la capacità di moltiplicarsi indefinitamente oppure possono riprendere il processo differenziativo fino a formare un nuovo individuo completo attraverso un processo di rigenerazione (Vasil e Hildebrandt, 1965).

Cellule isolate da organi o tessuti della pianta possono essere indotte a crescere e a proliferare se poste in opportune condizioni ambientali rigenerando organi o piante intere con caratteristiche genetiche esattamente uguali a quelle della pianta madre. Gli espianti colturali possono essere costituiti da una svariata gamma di organi (quali gemme, antere, ovari ed altre strutture fiorali), di tessuti (parti di radici, di foglie, di fusto), di embrioni o di parti embrionali. Per poter allestire una coltura *in vitro* bisogna scegliere un adeguato terreno di coltura, che simula *in vitro* le condizioni nutrizionali delle cellule all'interno dell'organismo integro. Si tratta di una soluzione acquosa in cui sono disciolti i sali minerali (micro e macroelementi), vitamine (tiamina, biotina, mio-inositolo, biotina, acido nicotinico, glicina e riboflavina) e una sorgente di carbonio organico.

In condizioni di eterotrofia o di mixotrofia (tipiche della coltura *in vitro*) è necessario aggiungere al substrato di coltura anche uno o più carboidrati, affinché forniscano l'energia e il carbonio necessario ai processi di moltiplicazione cellulare e morfogenesi. Il carboidrato di gran lunga più utilizzato è il saccarosio; più di rado trovano impiego fruttosio, glucosio e mannitolo. I fitoregolatori sono composti organici capaci di controllare i processi fisiologici, la crescita degli organi e lo sviluppo della pianta, *in vitro* possono essere impiegati ormoni naturali oppure di sintesi. Gli ormoni utilizzati sono tra le auxine l'acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D), l'acido naftalenacetico (NAA) e acido indol-3-butirrico (IBA); tra le citochinine, la benzilaminopurina (6-BAP), la kinetina e il thidiazuron. Altre sostanze ormonali di impiego più occasionale sono l'acido abscissico (ABA) e l'acido gibberellico (GA₃).

Si possono utilizzare sia substrati liquidi sia semisolidi, ottenuti aggiungendo sostanze gelificanti; come l'agar e il gelrite (o phytigel).

In pratica, l'allestimento di una coltura *in vitro* si realizza a partire da frammenti di tessuti vegetali, previa sterilizzazione, messi in coltura su terreno di crescita, solido o liquido e incubati in condizioni ambientali controllate (luce, temperatura e umidità).

La micropropagazione consiste nella propagazione per via agamica di genotipi selezionati (di piante arboree, floricole ed ortive) in condizioni di sterilità, allo scopo di ottenere una rapida moltiplicazione di un singolo espianto. Le colture possono prendere avvio per moltiplicazione dei germogli ascellari o avventizi.

Le colture cellulari in sospensione sono un tipo di coltura vegetale *in vitro* in substrato liquido e in costante agitazione, che permette di distribuire uniformemente tutti i nutrienti

in maniera omogenea e fornire un'ottima aerazione per le cellule, senza farle depositare sul fondo del contenitore.

Le colture *in vitro* offrono la possibilità di utilizzare le cellule vegetali come “bio-fabbriche”, per la produzione industriale di metaboliti vegetali.

COLTURE *IN VITRO* PER LA PRODUZIONE DI METABOLITI SECONDARI

Le piante producono una serie numerosa ed eterogenea di composti organici che non hanno una diretta funzione nei processi di crescita e di sviluppo; queste sostanze vengono chiamate metaboliti secondari. A differenza dei metaboliti primari, i prodotti secondari non prendono parte ai processi di assimilazione, respirazione, trasporto e differenziamento, essenziali per la vita di un organismo vegetale. Molti dei prodotti secondari hanno un'importante funzione ecologica, un ruolo di difesa contro l'attacco di erbivori, in virtù delle loro frequenti caratteristiche irritanti, tossiche o repellenti, oppure contrastano l'attacco di microrganismi patogeni. D'altra parte sono responsabili dei colori e dei profumi dei fiori necessari ad attirare gli insetti impollinatori; dei sapori gradevoli dei frutti necessari per attirare gli animali responsabili della diffusione dei semi. Le colture *in vitro* rappresentano per questo una valida alternativa per la produzione di metaboliti.

I metaboliti secondari sono raggruppati in varie classi, suddivise in genere su base chimico-organica e biosintetica. Tra di essi troviamo: alcaloidi, fenoli e terpeni. In questo capitolo saranno trattati nello specifico solo i terpeni, vista l'appartenenza dell'artemisinina a questa classe di composti.

I TERPENI

I terpeni (o terpenoidi) sono sostanze formate da un'unità di base a 5 atomi di carbonio ramificati (isoprene), come illustrato dalla Fig. 11.

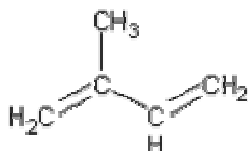


Fig. 11. Scheletro carbonioso dell'isoprene.

I terpeni sono probabilmente il gruppo più vasto di prodotti naturali delle piante e non si possono considerare dei veri e propri prodotti secondari, perché rivestono ruoli metabolici di notevole importanza. È il caso dell'isopentenile pirofosfato e del dimetilallile pirofosfato, che fanno parte della catena laterale delle citochinine; del fitolo, componente

essenziale per la funzione fotosintetica della clorofilla; o ancora dell'acido abscissico e delle gibberelline, ormoni che fanno parte interamente di questo gruppo. Un criterio di suddivisione si basa sul numero di atomi di C, secondo il quale essi appartengono al sottogruppo:

emiterpeni (C5) di cui fanno parte l'isopentenile e il dimetilallile pirofosfato;

monoterpeni (C10) molto diffusi nelle piante superiori e dotati spesso di un forte odore. Costituiscono gli oli essenziali, secreti da particolari tessuti, di molte specie, ad esempio il geranil pirofosfato;

sesquiterpeni (C15), gruppo numericamente più ricco in natura, tra questi si trovano spesso componenti degli oli essenziali, in questo gruppo rientrano l'acido abscissico e l'artemisinina;

diterpeni (C20), gruppo esiguo rappresentato da un centinaio di molecole tra cui si possono ritrovare le gibberelline e il fitolo;

triterpeni (C30) e loro derivati, gruppo ricco di composti; tra i derivati dei triterpeni ciclici si trovano anche i derivati degli steroli come le saponine;

tetraterpeni (C40) gruppo costituito solo dai pigmenti carotenoidici; fanno parte di questo gruppo il β -carotene, la luteina e la violaxantina.

politerpeni sono costituiti da una lunga catena di unità isopreniche; fanno parte di questo gruppo la gomma e la guttaperca.

L'impiego delle colture di cellule e tessuti vegetali *in vitro* costituisce un sistema di produzione efficiente, poiché permette di svincolarsi dai fattori limitanti che condizionano la produzione della materia prima in campo (variazioni climatiche, somatiche e problemi di infestazioni). Le colture *in vitro* permettono di ovviare al problema della produzione, ma anche quello dovuto alla stagionalità. Possono inoltre offrire la possibilità di incrementare i livelli di sintesi o di biosintetizzare metaboliti non prodotti normalmente dalla pianta. Molti di questi composti trovano impiego nell'industria alimentare, cosmetica e farmaceutica. Per questo le colture cellulari possono rappresentare delle "fabbriche" di sostanze come integratori alimentari, additivi, ecc.. (Scarpa *et al.*, 2009).

Sono numerosi gli esempi di colture cellulari allestite per la produzione *in vitro* di metaboliti secondari come sostanze coloranti per l'industria alimentare o sostanze farmacologicamente attive (Smetanska, 2008).

COLTURE *IN VITRO* PER LA PRODUZIONE DI ARTEMISININA

I primi risultati riportati in letteratura sull'utilizzo di colture *in vitro* di artemisia per la produzione di artemisinina hanno evidenziato la necessità di un certo grado di differenziamento. Paniego e Giulietti, nel 1996, non hanno ritrovato artemisinina nelle sospensioni cellulari e solo tracce nelle colture di germogli. D'altra parte, nei germogli di artemisia è stato ritrovato un livello, seppur minimo, di artemisinina (Woerdenbag *et al.*, 1993). In altri studi è stata valutata la possibilità di incrementare i livelli di artemisinina modificando alcune condizioni fisiche e chimiche: modificando il mezzo di coltura, utilizzando diversi tipi di ormoni vegetali quali acido naftalenacetico (NAA), bezilaminopurina (BAP), kinetina, acido 2,4 diclorofenossiacetico (2,4 D), o la gibberellina (GA₃); aggiungendo alcuni elicitatori come la caseina idrolizzata (Weathers *et al.*, 2005; Whipkey *et al.*, 1992; Woerdenbag *et al.*, 1993). Tuttavia gli incrementi di produzione ottenuti in queste colture *in vitro* sono risultati sempre limitati.

In un lavoro recente è stata analizzata la correlazione tra zuccheri e produzione di artemisinina in colture di germogli. Sostituendo il glucosio al saccarosio è stato ottenuto un forte aumento di artemisinina, pari al 200% (Wang e Weathers, 2007).

Le colture di radici dette "*hairy roots*" sono un'alternativa alle colture cellulari per la produzione di metaboliti secondari. Si ottengono tramite trasformazione con *Agrobacterium rhizogenes*, possono essere manipolate geneticamente per aumentare la produzione di metaboliti secondari, poiché sono stabili geneticamente e infine sono caratterizzate da crescita elevata. Differenti tipi di bioreattori sono stati utilizzati per la coltura di *hairy roots* di artemisia quali il *bubble column*, *inner loop air-lift* e *mist reactor* (Liu *et al.* 1998).

Numerosi studi sono stati condotti per ottimizzare le condizioni di crescita di queste colture in funzione della produzione di artemisinina, quali: la composizione del mezzo di coltura e gli effetti della radiazione luminosa (Liu *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001; Weathers *et al.*, 2004).

Le colture *hairy roots* cresciute in bioreattore, sono state utilizzate per aumentare la produzione di artemisinina mediante trattamento con metil jasmonato, ottenendo un aumento di 5 volte rispetto al controllo (Putalun *et al.*, 2007).

Souret e collaboratori nel 2003 hanno messo a confronto colture di *hairy roots* cresciute sia in beute sia in due tipi di bioreattore: un *mist reactor* e un *bubble column reactor*. Le colture in *mist reactor* hanno mostrato una maggior produzione di artemisinina rispetto al *bubble column reactor*.

In generale, nonostante i diversi studi condotti, i sistemi *in vitro* finora utilizzati non hanno permesso di ottenere una produzione di artemisinina economicamente vantaggiosa.

In questo lavoro di tesi, sono stati allestiti diversi tipi di colture cellulari di *Artemisia annua* al fine di individuare il sistema più idoneo alla produzione *in vitro* di artemisinina e di indagare sulla regolazione della via biosintetica di questo metabolita.

MATERIALI E METODI

INDUZIONE DELLE COLTURE DI CALLO

Materiale di partenza

Il callo è stato indotto da porzioni di foglie di piante di *Artemisia annua* L. (ecotipo Pericles) allevate in vaso e da piante dell'ibrido Artemis, previa sterilizzazione del materiale.

La sterilizzazione della parte aerea della pianta prevede:

- lavaggio con acqua e Tween 20 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA), in agitazione;
- trasferimento in una soluzione di ipoclorito di sodio commerciale diluito 1:5 per 20';
- tre lavaggi con acqua sterile;
- eliminazione dalle foglie dell'acqua in eccesso, mediante carta da filtro;
- frammentazione delle foglie con bisturi.

I frammenti di foglie sono stati poi messi in coltura su piastre Petri del diametro di 5 cm Bibby Sterilin (LD Stone Staffs, UK), contenenti un mezzo per l'induzione del callo.

Terreno di coltura

Per la preparazione del terreno di coltura sono stati sciolti in acqua distillata (milli Q) 4,4 g/L di una preparazione commerciale di sali minerali MS (Murashige e Skoog, 1962) con vitamine incluse (Duchefa, Haarlem, Olanda) (Tab. 3); è stato aggiunto saccarosio, come fonte di carbonio esogena, alla concentrazione di 30 g/L. Il tutto è stato portato a pH 5,7. Per il terreno solido, infine, è stato aggiunto agar (Plant agar, Duchefa, Haarlem, Olanda), 8 g/L prima della sterilizzazione in autoclave a 120°C per 20 minuti.

I fitoregolatori utilizzati sono stati: NAA (acido naftalenacetico, Duchefa, Haarlem, Olanda), 6-BAP (6-benzilaminopurina, Duchefa, Haarlem Olanda) e 2,4-D (acido 2,4-diclorofenossiacetico, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) e sono prelevati da soluzioni stock (1 mg/mL) tenute a 4°C. I fitoregolatori, dopo essere stati preventivamente sterilizzati per filtrazione con un filtro di nylon (Millipore) con pori di 0,22 µm di diametro, sono stati aggiunti dopo la sterilizzazione del terreno in autoclave.

Inizialmente il callo è stato indotto su un terreno MC1 addizionato con NAA (0,5 mg/L) come auxina in combinazione con la citochinina 6-BAP (0,05 mg/L); successivamente, al fine di determinare l'influenza dei fitoregolatori sulla produzione di callo, è stato utilizzato un *Broad Spectrum* di combinazioni ormonali utilizzando 2,4-D o NAA come auxine (a pari concentrazioni molari) e 6-BAP come citochinina (Tab. 4 e 5).

Infine il terreno è stato dispensato, in condizioni di sterilità, in piastre Petri, diametro 9,5 cm (Bibby Sterilin, LD Stone Staffs, UK), dispensando circa 25 mL per piastra.

Tab. 3. Composizione chimica del terreno di coltura Murashige e Skoog (MS).

MS (Murashige e Skoog)	
Microelementi	Concentrazione mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
FeNaEDTA	36,70
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9
Na ₂ MOO ₄ ·2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
Macroelementi	Concentrazione mg/L
CaCl ₂	332,2
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
MgSO ₄	180,7
NH ₄ NO ₃	1650
Vitamine	Concentrazione mg/L
Glicina	2
Mio-inositolo	100
Acido nicotinico	0,5
Piridossina HCl	0,5
Tiamina HCl	0,1

Condizioni di crescita

Il materiale vegetale utilizzato negli esperimenti è stato mantenuto nelle condizioni ambientali della camera di crescita, ad una temperatura di $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo di 16 ore, con un'irradianza di $125 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fornita dai tubi fluorescenti del tipo coolwhite (Osram L36W/12-950, Lumiluxe de Luxe).

I trasferimenti dei calli sono stati effettuati in condizioni di sterilità, sotto una cappa a flusso laminare Steril Helios (Tecnomed s.a.s, Pescara, Italia).

Tab. 4. *Broad Spectrum* dei fitoregolatori 2,4D e BAP espressi in mg/L.

2,4D BAP	0	0,1	0,25	0,5	1	1,5	2
0	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1
0,01	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2
0,025	A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3
0,05	A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4
0,1	A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5
0,15	A6	B6	C6	D6	E6	F6	G6
0,2	A7	B7	C7	D7	E7	F7	G7

Tab. 5. *Broad Spectrum* dei fitoregolatori NAA e BAP espressi in mg/L.

NAA BAP	0	0,083	0,2	0,41	0,83	1,25	1,67
0	H8	I8	L8	M8	N8	O8	P8
0,01	H9	I9	L9	M9	N9	O9	P9
0,025	H10	I10	L10	M10	N10	O10	P10
0,05	H11	I11	L11	M11	N11	O11	P11
0,1	H12	I12	L12	M12	N12	O12	P12
0,15	H13	I13	L13	M13	N13	O13	P13
0,2	H14	I14	L14	M14	N14	O14	P14

INDUZIONE DELLE COLTURE CELLULARI IN SOSPENSIONE

Materiale di partenza e terreno di coltura

Per allestire la sospensione sono state fatte varie prove di induzione con calli cresciuti su diversi terreni del *Broad Spectrum* ed infine sono stati scelti quelli cresciuti su terreno G6 per la loro migliore consistenza.

Le colture cellulari di *Artemisia annua* sono state ottenute mediante trasferimento di porzioni di calli singoli cresciuti su terreno G6 (2 mg/L di 2,4D e 0,15 mg/L di BAP) (Tab. 4) in piccoli volumi (5-10) sempre di terreno G6 ma liquido, in beute Erlenmeyer da 100 mL preventivamente sterilizzate. Successivamente è stato aggiunto terreno ogni 5 giorni, fino a raggiungere il volume di 25 mL. Da questa sospensione sono stati prelevati 5 mL successivamente risospesi in un volume finale di 50 mL. Le colture sono state mantenute rinnovando il terreno di coltura ogni 35 giorni inoculando 15 mL di volume cellulare in 85 mL di terreno fresco G6 in beute Erlenmeyer da 500 mL.

Condizioni di crescita

Le beute sono state poste su un agitatore orbitale a 105 rpm a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, sotto luce fluorescente bianca continua ($125 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ sec}$).

Curva di crescita delle cellule in sospensione

La crescita delle cellule in coltura è stata valutata misurando il volume cellulare impaccato, nel tempo. Ad intervalli regolari (ogni 5 giorni) è stato valutato il volume cellulare impaccato sottoponendo le cellule a centrifugazione a 400 g per 10 minuti (Megafuge 1,0 Heraeus Sepatech) in tubi graduati. I dati raccolti per cinque settimane e sono stati inseriti in un grafico (curva di crescita).

La vitalità delle cellule è stata valutata attraverso la colorazione con fluoresceina diacetato (Wildhom, 1972).

Per la determinazione del peso le colture sono state filtrate su filtri nylon di $30 \mu\text{m}$ e subito congelati in azoto liquido, infine liofilizzate *overnight* (Feezone 2.5, Labconco, Kansas City, MO, USA).

TRATTAMENTO DELLE CELLULE IN SOSPENSIONE CON ELICITORI E INIBITORI

Per il trattamento con metil jasmonato (MeJA) (Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, MO, USA) questo è stato aggiunto al terreno di coltura G6 alla concentrazione finale di 22 μ M. Cellule al 15° giorno di subcoltura (25 mL) sono state incubate con il mezzo G6 contenente il metil jasmonato per diversi tempi: 30 min, 1h, 2h, 4h, 24h, 48h e 5 giorni. Come controllo è stato utilizzato un ugual volume di solvente (etanolo 95%).

Il miconazolo (Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, MO, USA) è stato disciolto in DMSO (Dimetilsolfossido) e questo è stato aggiunto al terreno di coltura G6 a una concentrazione finale di 10, 100 e 200 μ M. Gli intervalli di tempo utilizzati nel trattamento con miconazolo sono stati: 30 min, 1h, 2h, 4h, 24h, 48h e 5 giorni. Il controllo è rappresentato dal volume equivalente di solvente (DMSO).

Le cellule in sospensione sono state inoltre elicitate con estratti fungini quali: *Alternaria radicina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium acuminatum*, *Alternaria alternata*, *Verticillium dahliae*, *Penicillium verrucosum*. Frammenti di ogni fungo sono stati autoclavati a 120 °C per 20 minuti a 1 atm e poi omogenizzati con acqua milli Q sterile fino ad ottenere una concentrazione di 1 mg/mL. Ogni estratto fungino è stato aggiunto al terreno di coltura G6 alla concentrazione di 1%, 5%, 10 %. Cellule al 15° giorno di subcoltura (25 mL) sono state incubate con il mezzo G6 contenente le varie concentrazioni dell'estratto fungino per diversi tempi: 5 e 9 giorni. Come controllo è stata utilizzata acqua sterile milli Q in volume equivalente all'estratto.

MICROPROPAGAZIONE DEI GERMOGLI

Materiale di partenza

Dalle foglie sterilizzate per ottenere callo su terreno MC1 si sono sviluppati anche piccoli germogli (NAA 1,25 mg/L e BAP 0,15 mg/L), grazie alla presenza di gemme ascellari. Un germoglio (micro-talea) è stato prelevato e, inizialmente, trasferito per la subcoltura sullo stesso terreno di crescita dei calli MC1 in un contenitore vitrobox (Duchefa, Biochemie B.V, Olanda). Dopo circa 20 giorni, lo stesso è stato trasferito su un terreno specifico per la micropropagazione MM (0,05 mg/L, BAP 0,5 mg/L). Dopo circa un mese il germoglio che aveva sviluppato altri germogli dalle gemme ascellari è stato propagato in diversi vitrobox. Le successive subculture sono fatte ogni 30 giorni.

Inoltre, con lo stesso protocollo, sono state ottenute piantine micropropagate di *Artemisia annua* della cultivar Artemis.

Terreno di coltura

Il mezzo di micropropagazione utilizzato per trasferire i germogli provenienti da terreno MC1, denominato MM (Mezzo di Moltiplicazione) è stato dispensato in vitrobox. I trasferimenti, ad intervalli di 30 giorni, sono stati eseguiti sullo stesso mezzo di micropropagazione (Tab. 6).

I diversi terreni di coltura per la micropropagazione sono stati preparati utilizzando sempre il terreno di coltura MS come descritto in precedenza per i calli.

Tab. 6. Composizione dei terreni di micropropagazione.

Mezzo	Sali minerali	Vitamine	Saccarosio (g/L)	Fitoregolatori (mg/L)		Agar g/L	pH
				NAA	BAP		
MC1	MS	MS	30	1,25	0,15	7	5,7
MM	MS	MS	30	0,05	0,5	7	5,7

Condizione di crescita

Il materiale vegetale micropropagato è stato mantenuto nelle condizioni ambientali della camera di crescita, ad una temperatura di $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo di 16 ore, con un'irradianza di $125 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fornita dai tubi fluorescenti del tipo coolwhite (Osram L36W/12-950, Lumiluxe de Luxe).

VALUTAZIONE DEL CONTENUTO DI ARTEMISININA

Sono state prelevate le cellule in sospensione, porzioni di calli e foglie da piantine *in vitro* (micropropagate) e in vaso, per procedere all'estrazione dell'artemisinina. Le cellule in sospensione sono state filtrate con un filtro di nylon da $30 \mu\text{m}$ e le cellule e il mezzo di coltura sono stati conservati in tubi graduati da 50 mL (Corning, Lowell, USA) e posti in azoto liquido e mantenuti a -80°C . Anche i germogli micropropagati e i calli sono stati raffreddati in azoto liquido e quindi conservati a -80°C . Tutti i campioni (cellule, calli e piantine) sono stati preventivamente liofilizzati nel liofilizzatore (Feezone 2.5, Labconco, Kansas City, MO, USA) per 24 ore prima di essere analizzati. Per ogni campione 50 mg di peso secco sono stati estratti con 4 mL di n-esano, sotto agitazione per 16 ore e successivamente le vials sono state poste nel bagnetto a ultrasuoni per 15 minuti a

temperatura ambiente (L&R SweepZone Technology). Tutto il contenuto delle vials è stato centrifugato a 4000 g per 10 minuti. È stato prelevato tutto l'esano e trasferito in un pallone di vetro. Sono stati aggiunti 2 mL di n-esano al campione e poi è stato centrifugato a 4000 g per 10 minuti, l'esano estratto è stato posto nel pallone di vetro. L'estratto esanico è stato seccato mediante sottovuoto in Rotavapor (RV 06-ML, Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Germania).

Il terreno di coltura è stato prima liofilizzato e poi estratto seguendo la stessa procedura utilizzata per le cellule.

Quindi il campione secco è stato ripreso con 1 mL di esano. Il residuo disciolto è stato portato a secco allo Speedvac (SC 100, Savant, Ramsey Minnesota, USA). Per la derivatizzazione pre-colonna il residuo è stato risospeso in 100 µL di etanolo assoluto, sono stati poi aggiunti 200 µL di NaOH 60 mM. Il campione è stato posto in un bagnetto a 45 °C per 30 minuti. La reazione è stata arrestata aggiungendo 200 µL di acido acetico alla concentrazione finale 62,5 mM.

Il campione, dopo esser stato centrifugato a 15000 g, può essere iniettato in HPLC (Agilent 1100 Series HPLC), associata a una pre-colonna (Guard Ultrasphere ODS, Beckmann, 0.46 x 4.5 cm) e una colonna C18 Ultrasphere (Beckmann, 0.46 x 25 cm); la fase mobile era così composta: metanolo: buffer sodio fosfato a pH 7 (55:45 v/v) con un flusso di 1 mL/ min a 35 °C e una lunghezza d'onda di 216 nm per la determinazione. Il volume iniettato è stato di 20 µL. Lo standard di artemisinina (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA), è stato derivatizzato e opportunamente diluito per poi essere utilizzato per costruire la curva standard per la quantificazione dell'artemisinina. Gli standard sono stati preparati in metanolo in un range da 0,005 a 1 mg/mL (Smith *et al.*, 1997).

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti in triplo ed è stata calcolata la media e la deviazione standard.

COLORAZIONE DEI TERPENI

Il reagente NADI è stato utilizzato per localizzare i terpeni in cellule in sospensione e nei calli. Il colorante è stato preparato utilizzando α -naftolo (0.5 mL 1% v/v in 40% etanolo, Sigma, St. Louis, MO, USA) e dimetilfenilenediamina-HCl (0.5 mL 1% v/v, Sigma, St. Louis, MO, USA) in buffer sodio fosfato pH 7 (5 mL 50 mM) (David e Carde 1964). Le cellule e i calli sono stati posti in tubi contenenti 1 mL di colorante e subito utilizzati per la

preparazione dei vetrini. Le osservazioni sono state effettuate utilizzando il microscopio ottico invertito Leica (DM IRBE, Wetzlar, Germania).

DOCUMENTAZIONE MICROSCOPICA E FOTOGRAFICA

Le osservazioni al microscopio dei calli e delle cellule di artemisia sono state eseguite mediante l'ausilio di uno stereomicroscopio Zeiss (Stemi SV11, Jena, Germania) e di un microscopio ottico invertito Leica (DM IRBE, Wetzlar, Germania).

Per la documentazione fotografica è stata usata la macchina fotografica digitale Coolpix 995, Nikon (Tokio, Giappone).

ANALISI DELLA ESPRESSIONE GENICA

Estrazione dell'RNA totale dalle cellule e piantine

Tutto il materiale utilizzato per l'estrazione dell'RNA è stato sottoposto ad opportuni trattamenti per inattivare la ribonucleasi e garantire la massima sterilità; il materiale plastico (puntali ed tubi graduati) e i mortai, i pestelli e le spatole sono stati autoclavati a 120 °C e alla pressione di 1 atm per 40 min.

Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato il kit "SV Total RNA Isolation System" (Promega, Milano, Italia), seguendo le istruzioni del produttore.

Elettroforesi su gel di agarosio

L'elettroforesi su gel di agarosio consente la separazione di molecole di DNA o RNA di diverse dimensioni, sotto l'azione di un campo elettrico. Il supporto utilizzato per la separazione delle molecole è costituito da agarosio. Il gel di agarosio all'1% è stato preparato sciogliendo a caldo 1 g di agarosio in 100 mL di tampone Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE). A tale soluzione sono stati aggiunti 5 µL di etidio bromuro (10 mg/mL). Il gel, è stato inserito nell'apposita cella per elettroforesi, contenente il tampone TAE 1X, collegata, attraverso dei cavetti, ad un alimentatore di corrente. I campioni di DNA e RNA da analizzare sono stati caricati, dopo aver aggiunto in essi il "Loading Buffer" e sottoposti a una differenza di potenziale elettrico di 100 volts. Alla fine della corsa elettroforetica i frammenti di DNA separati e le bande relative all'RNA ribosomiale sono stati osservati sul trans-illuminatore a luce UV. Le dimensioni delle bande di RNA sono state determinate per confronto con un marker di DNA: il "DNA Molecular Weight Marker X".

Soluzioni:

Tampone TAE 50X

Tris	242 g
Acido Acetico Glaciale	57,1 mL
EDTA 0,5 M pH 8	100 mL

Loading Buffer 6X

blu di bromofenolo	0,25%
xilene cianolo FF	0,25%
glicerolo	30%

Stima della concentrazione di RNA

La concentrazione dell'RNA estratto è stata stimata mediante lettura spettrofotometrica (Beckman DU-640 Spectrophotometer, Fullerton, CA, USA) alla lunghezza d'onda di 260 nm (un valore di assorbanza 1 a 260 nm corrisponde ad una soluzione contenente 40 µg/mL di RNA o DNA a singolo filamento) e a 280 nm; 1 µL di RNA sono stati diluiti in 95 µL di acqua distillata sterile, il bianco è stato rappresentato da acqua distillata sterile. Il valore di concentrazione del campione è stato calcolato in base alla seguente formula:

D.O. (densità ottica) a 260nm x 40 x 100 (fattore di diluizione) = concentrazione di RNA in µg/mL.

Un rapporto tra DO260 e DO280 di 1,8-2, suggerisce una buona qualità di RNA estratto.

Estrazione di DNA

Il DNA dalle piantine e cellule è stato estratto con il kit "DNeasy Plant Mini kit" (Qiagen, Milano, Italia), secondo le istruzioni del produttore.

Per stimare la quantità del DNA 1 µL in 100 µL sono stati letti allo spettrofotometro (Beckman DU-640 Spectrophotometer, Fullerton, CA, USA). Per la stima della concentrazione del DNA si procede in maniera identica alla quantificazione dell'RNA (vedi Stima della concentrazione di RNA).

D.O. (densità ottica) a 260nm x 50 x 100 (fattore di diluizione) = concentrazione di DNA in µg/mL.

Reverse Transcription-PCR

Per l'analisi semi-quantitativa dell'espressione genica 1 µg di RNA totale è stato retroscritto con il sistema "ImProm-II Reverse Transcription System" (Promega, Milano Italia) allo scopo di ottenere il cDNA, corrispondente utilizzando esameri come innesco.

L'amplificazione è stata condotta in un "thermocycler" Personal-one (EuroClone, Milano, Italia) che è stato programmato in modo da eseguire da 28 a 35 cicli a seconda dei primer utilizzati, usando la ReadyMix Taq PCR Reaction Mix (Sigma, St. Louis, MO, USA). Ogni ciclo prevedeva:

la denaturazione a 94 °C per 30 sec;

l'appaiamento a 54 °C per 30 sec;

la sintesi del DNA a 72 °C per 1 min.

I primer utilizzati sono stati disegnati sulla base della sequenza nucleotidica dei geni che codificano per: enzima *amorfa diene sintasi (ADS)*, *citocromo P450 monoossigenasi (CYP71AV1)*, *citocromo P450 reduttasi (CPR)*, *aldeide artemisinica Δ11(13) reduttasi (Dbr2)* e *ubiquitina (UBQ)*. Tutti i primer, indicati nella tabella 7, sono stati acquistati dalla PRIMM Srl (Milano, Italia). Il gene dell'ubiquitina di artemisia è stato utilizzato come riferimento interno, in quanto nota la sua espressione è costitutiva. Per il controllo negativo è stata incubata la mix per la PCR senza aggiungere il DNA stampo.

Tab. 7. Sequenze dei primer e geni *target* utilizzati per l'analisi semi-quantitativa *Reverse Transcription-PCR*.

Gene target	Primer	Sequenza	Referenze
<i>ADS</i>	ADSfor ADSrev	5'- CATTACTGGCGGTGCTAAC- 3' 5'- GTATTCGTCTCCCATACGT -3'	Mercke <i>et al.</i> , 2000
<i>CYP71AV1</i>	CYP71AV1for CYP71AV1rev	5'-GCAAACCTGGTGGTTTTGATG-3' 5'-GCAGAACCAAGGGTAGTG-3'	Teoh <i>et al.</i> , 2006
<i>DBR2</i>	DBR2a DBR2b	5'-CTTGGGTTACAAGCTGTGGCTCAAG-3' 5'-ATATAATCAAACTAGAGGAGTGACC-3'	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>CPR</i>	CPRF CPRR	5'-GGAGTCTACGTTGAGAATC-3' 5'-GTATCTCGGCTGCAAACG-3'	GenBank Acc. nr. EF104642
<i>UBQ</i>	UBIfor UBIrev	5'-GCCAAGATTCAGGACAAGGAAGG-3' 5'-CTTGGGGGAAGACGGGC-3'	Zheng <i>et al.</i> , 2008

Real Time PCR

La *Real Time PCR* permette di monitorare in tempo reale il processo di amplificazione nella fase esponenziale, quando cioè l'efficienza di amplificazione è minimamente influenzata dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto ad una tradizionale PCR.

Nell'indagine *Real Time PCR* sono state utilizzate sonde TaqMan marcate alle estremità con molecole fluorescenti: il fluoroforo al 5' è il 6-carbossifluoresceina (FAM), mentre al 3' è la Tetrametilrodamina (TAMRA).

Per lo studio dell'espressione dei geni in *Artemisia annua* è stata utilizzata la strumentazione Applied Biosystems 7500 e i relativi *software* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sono stati utilizzati primer specifici ad una concentrazione di 900 nM ognuno, sonde specifiche (200 nM), 0,5 µL di cDNA a singolo filamento e 12,5 µL di 2X TaqMan Master Mix Universal per PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in un totale di 25 µL.

I primer scelti sono stati elencati nella tabella 8.

Per valutare l'eventuale contaminazione delle reazioni è stata utilizzata la mix per la PCR senza aggiungere il DNA stampo (controllo negativo). Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato, utilizzando cDNA ottenuto da almeno 2 esperimenti indipendenti. È stato impostato il seguente ciclo di amplificazione:

- 1 ciclo a 50°C per 2 min;
- 1 ciclo a 95°C per 10 min;
- 40 cicli, a 95°C per 15 sec e a 60°C per 1 min.

La quantificazione è stata effettuata secondo le indicazioni presenti in ABI 7500 Sequence Detection System, User Bulletin 2 (Applied Biosystems). L'espressione relativa è stata normalizzata utilizzando il gene dell'ubiquitina, ed è stata calcolata utilizzando il campione non trattato come calibratore, la cui espressione risulta essere uguale a 1.

Tab. 8. Sequenze e caratteristiche dei primer, sonde e geni target utilizzati per la tecnica *Real Time PCR*.

Gene target	Primer	Sequenza	Referenze
<i>ADS</i>	RTADSfor RTADSrev ADSprobe	5' -TGGTCGACGCCT AAATGATCT-3' 5' -TGGGCATACTCCTCATTGACAT-3' 5' -TGACCC AC AAGGCCGAGC AAGAA-3'	Mercke <i>et al.</i> , 2000
<i>CYP71AV1</i>	RTCYPfor RTCYPrev CYPprobe	5' -GTTTGGAGCTGGGAGAAGGAT-3' 5' -GGTCATGTCGATCTGGTCATAGC-3' 5' -ACGTGCAGCTCCCGCTCGCTAATAT-3'	Teoh <i>et al.</i> , 2006
<i>DBR2</i>	RTDBR2for RTDBR2rev DBR2probe	5' -GGGTTACAAGCTGTGGCTCAAG-3' 5' -CAAGGTCAGGATTCGAGACAAAA-3' 5' -TGCTGATTTGGTCGCTTTTGGTCGTT-3'	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>CPR</i>	RTCPRfor RTCPRrev CPRprobe	5' -GCTCGGAACAGCCATCTTATTCT-3' 5' -CCCCAGTCTCCACGAAATTATT-3' 5' - CGGATGCAGGAATCGCAAAGTGGAT-3'	GenBank Acc: F104642
<i>UBI</i>	RTUBIfor RTUBIrev UBIprobe	5' -CGGACCAGCAGAGGTTGATATT-3' 5' -CAGCCTTAAGACCAAATGGAGAGT-3' 5' -CAGGAAAGCAGCTTGAAGATGGCCG-3'	GenBank Acc: U258763

ISOLAMENTO DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE *AaWRKY3*

Foglie di *Artemisia annua* cultivar Artemis in fioritura (coltivate in campo, presso l'istituto di tabacchicoltura di Monteroni, Lecce), sono state utilizzate per l'estrazione dell'RNA totale. Il cDNA ottenuto da retrascrizione dell'RNA totale è stato utilizzato come *template* in esperimenti di PCR. I primer utilizzati sono primer degenerati disegnati sulla regione conservata della sequenza della proteina *GaWRKY1* (Xu *et al.*, 2004), conservate nella famiglia WRKY: LEUCINE ZIP-for (TGG (C/A)GI AA(A/G) TA(T/C) GGI CA(A/G) AA(A/G)) e WRKYGQK-rev (GA(G/A) AA(T/C) AA(A/G) AA(A/G) (T/C)TI ACI GA(G/A). In seguito ad amplificazione con Taq polimerasi è stato ottenuto un frammento di circa 340 bp che è stato purificato da gel e clonato nel vettore pGEM T-easy. Con questo ligato sono state trasformate le cellule competenti XL1 BLUE.

I primer specifici RACE 1F (TGGCCAAGAATCCAGGAC) e RACE 1R (GTCCTGGATTCTTGGCCA), RACE 2F (GAGAGAGGCAATTCTGAG) e RACE 2R (CTCAGAATTGCCTCTCTC), sono stati disegnati sulla sequenza della regione di 340

nucleotidi e utilizzati per l'isolamento delle regioni 3'-5' del gene *AaWRKY3*, seguendo le istruzioni del kit 3' e 5' RACE (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

CLONAGGIO

Preparazione di un costrutto chimerico tra WRKY e GFP

La sequenza completa di *AaWRKY3* è stata utilizzata per produrre una variante con *tag* fluorescente, utilizzando la *Green Fluorescent Protein* (GFP) (Haseloff *et al.*, 1997), WRKY:GFP. Il costrutto WRKY:GFP è stato ottenuto fondendo la sequenza WRKY *in frame* con l'estremità N-terminale di GFP e ponendo il costrutto genico sotto il controllo del promotore 35S. Un sito BamHI N-terminale ed un sito NheI in posizione C-terminale sono stati inseriti per mutagenesi della sequenza di WRKY attraverso una reazione di PCR con i primer BAMfor (GGATCCTTCAATGGAATATAACCAGCTTGGT) e NHErev (GCTAGCCCACTTTTGGGACTGATTTTGTGA) . Il prodotto di amplificazione è stato clonato in pGEMTeasy (Promega) e sequenziato, per poi digerirlo con BamHI ed NheI e clonarlo in un vettore pGY1 già contenente la sequenza di GFP. A questo scopo è stato utilizzato come vettore di destinazione pAleu-GFP (Di Sansebastiano *et al.*, 2001) in cui il frammento di restrizione WRKY ha sostituito il segnale di targeting vacuolare N-terminale. Il vettore pGY1 è un vettore derivato da pUC18 e predisposto per l'espressione transiente in protoplasti (Di Sansebastiano *et al.*, 1998).

Cellule competenti e trasformazione

Per ottenere cellule competenti è stato utilizzato uno stock di cellule di *Escherichia coli* in glicerolo (50% glicerolo) conservate a -80 °C. I batteri sono stati inoculati in 5 mL di LB a 37 °C *overnight* in agitazione a 220 rpm. Dopo l'inoculo è stato diluito 1:1000 in 10 mL di LB. Quando la coltura è cresciuta fino a ottenere una densità ottica a 660 nm tra 0,5-0,6, dopo circa 5 ore, le cellule sono state centrifugate a 4 °C per 15 min a 2000 rpm e quindi eliminato il surnatante. Il pellet è stato risospeso nel buffer di trasformazione e stoccaggio (TBS).

Per la trasformazione 100 µL di cellule e il DNA plasmidico (100 pg di DNA con 20 µL di KCM portato a volume di 100 µL con H₂O sterile), sono stati incubati in ghiaccio per 20 min e in seguito a temperatura ambiente per 10 min, quindi sono stati aggiunti 800 µL di LB e incubate a 37 °C per 50 min in agitazione a 200 rpm). Successivamente le cellule

sono state piastrate su terreno IAX, che è stato reso selettivo dall'aggiunta dell'antibiotico ampicillina, e incubate a 37°C *overnight*. Per l'analisi dei cloni positivi sono state prelevate alcune colonie e sono state inoculate in terreno liquido LB contenente l'antibiotico ampicillina (100 mg/L), ed incubate a 37°C in agitazione per 16 ore in agitazione (150 rpm).

Terreno LB	1 L
Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	Fino a 1 L
pH	7

Per terreni solidi

Agar	15 g
------	------

Terreno IAX	1 L
Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	Fino a 1 L
pH	7

Per terreni solidi

Agar	15 g
Ampicillina	1 mL
XGal	1,6 mL
PTG	800 µL

Ampicillina 100 mg/mL

Ampicillina	100 mg
H ₂ O	1 mL

Sterilizzazione per filtrazione

5X KCM

KCl	0.5 M
CaCl ₂	0.15 M
MgCl ₂	0.25 M

TBS

LB pH 6.1	
PEG (PM 3,350)	10%
DMSO	5%
MgSO ₄	10 mM
MgCl ₂	10 mM

Estrazione di DNA plasmidico da batteri (mini prep)

Per l'estrazione di DNA plasmidico è stato seguito il metodo della lisi alcalina, basato sulla seguente procedura:

- una colonia batterica isolata è stata inoculata in 3mL di LB contenente l'antibiotico appropriato ed incubata *overnight*, in agitazione (250 rpm) a 37°C;
- sono stati trasferiti 1,5 mL di coltura batterica in un tubo sterile da 1,5 mL e le cellule sono state raccolte centrifugando per 5 minuti a 15500 g;
- è stato eliminato il sovrnatante e sono stati aggiunti al precipitato 100 µL di SOLUZIONE 1, incubando per 3 minuti a temperatura ambiente;
- sono stati aggiunti 200 µL di SOLUZIONE 2 e il tubo è stato posto in ghiaccio 3 minuti;
- sono stati aggiunti 150 µL di SOLUZIONE 3, si è mescolato per 10 secondi usando il vortex e si è incubato in ghiaccio per 3 minuti;
- la soluzione è stata centrifugata per 10 minuti a 15500 g a 4°C;
- al sovrnatante, sono stati aggiunti 2 volumi di etanolo assoluto, il tubo è stato incubato per 15 minuti in ghiaccio;
- la soluzione è stata centrifugata per 15 minuti 15500 g a 4°C;
- il pellet è stato lavato con 1 mL di etanolo 70%;
- il sovrnatante è stato eliminato e il precipitato è stato asciugato a temperatura ambiente;
- il precipitato è stato infine risospeso in un opportuna quantità di acqua milliQ sterile più 0,02 unità di RNase e conservato a -20°C.

SOLUZIONE 1

Glucosio	2,25 g
EDTA	5 mL
TRIS (pH 8)	6,25 mL
H ₂ O	fino a 250 mL

SOLUZIONE 2

NaOH 1 N	50 mL
SDS	2,5 g
H ₂ O	fino a 250 mL

SOLUZIONE 3

Potassio acetato	73,6 g
Acido acetico	28,5 mL
H ₂ O	fino a 250 mL

Purificazione dei frammenti di DNA da gel

Attraverso la purificazione da gel dopo l'elettroforesi si possono isolare bande di interesse che corrispondono al frammento di DNA cercato. Tali bande sono state tagliate da gel e sono state purificate tramite il kit di purificazione Euro Gold Extraction Kit (EuroClone). Questo kit si basa sulle capacità del DNA di legarsi a membrane di silice in presenza di sali caotropici, e prevede le seguenti fasi:

- la banda di interesse è stata tagliata dal gel è stata posta in una provetta da 2 mL, ed è stato determinato il peso;
- è stato aggiunto un ugual volume (rapporto peso/volume) di buffer XP2, e la provetta è stata incubata a 55°C, fino a sciogliere completamente l'agarosio (7 min);
- la soluzione è stata trasferita in un nuovo tubo fornito dal kit ed è stata centrifugata per 1 min a 10000 g e successivamente è stato eliminato il sovrantante;
- sono stati aggiunto 750 µL di buffer SPW ed è il tubo è stato centrifugato per 1 min a 10000 g e successivamente è stato eliminato il sovrantante;
- il pellet è stato risospeso in un volume di acqua da 30 a 50 µL ed è stato centrifugato a 5000 g per 1 min.

Ligazione

Le reazioni di ligazione sono state effettuate utilizzando un rapporto molare di 1:1 tra vettore e inserto, calcolando la quantità in ng di inserto da impiegare con la seguente formula:

$$\text{ng di inserto} = (\text{ng di vettore} \times \text{dimensioni in kbp dell'inserto}) / \text{dimensione in kbp del vettore.}$$

Ogni reazione è stata incubata in presenza dell'enzima T4 DNA Ligasi (Promega) e del tampone di ligazione 1X. Le miscele di ligazione sono state quindi poste a 16°C *overnight*. Nel nostro caso utilizziamo il vettore Aleu GFP. Una volta completato questo processo il vettore con l'inserto viene inserito in cellule batteriche competenti XL1 BLUE attraverso uno shock termico.

Screening delle colonie ricombinanti

Per verificare l'avvenuta trasformazione delle cellule si sfrutta la colorazione di screening blu-bianco dovuta all'aggiunta di X-Gal all'inoculo delle cellule batteriche. È stato effettuato l'inoculo con le colonie ricombinanti, inoculando parte di colonia in terreno LB e antibiotico ampicillina (a una concentrazione finale 1X), l'inoculo viene lasciato incubare *overnight* a 37°C.

Sequenziamento

Una volta accertata la presenza dell'inserito il prodotto di Mini prep è stato sequenziato, dopo averlo amplificato mediante PCR.

L'amplificazione è stata condotta in un "thermocycler" Personal-one (EuroClone, Milano, Italia) che è stato programmato in modo da eseguire da 25 cicli, utilizzando diverse coppie di primer. Ogni ciclo prevedeva:

- la denaturazione a 96 °C per 10 sec;
- l'appaiamento a 55 °C per 10 sec;
- la sintesi del DNA a 60 °C per 4 min.

Il sequenziamento è stato effettuato utilizzando il kit "BigDye terminator v 1.1 Cycle sequencing" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nel sequenziatore 3130 Genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Le sequenze analizzate sono state analizzate con il programma online BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Le sequenze nucleotidiche sono state allineate con il programma online ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html).

PROTOPLASTI

Preparazione di protoplasti

I protoplasti di *Artemisia annua* sono stati ottenuti da cellule in sospensione di *Artemisia annua* G6, al 15° giorno di subcoltura. Le cellule sono state centrifugate in un tubo graduato da 50 mL a 300 g per 5 min, dopo è stato eliminato il substrato. Sotto cappa 10 mL di cellule sono state poste in una piastra tipo Petri a cui vengono aggiunti 10 mL di soluzione di digestione. Si tratta di una soluzione isotonica contenente sostanze nutritive e enzimi di digestione.

Anche le foglie di piantine micropropagate e cresciute sterilmente fino ad una altezza di 5-6 cm sono state utilizzate per ottenere protoplasti. Sono state utilizzate foglioline ben espanse, dal 2° al 4° internodo, purché prive di segni di stress e non a contatto con le pareti del contenitore di crescita. Le foglioline sono state poste in una piastra Petri disposte in uno strato continuo, limitando per quanto possibile le sovrapposizioni dei tessuti. Sono state poi incise con un bisturi, in modo da provocare tagli su tutta la superficie utili alla penetrazione degli enzimi, ma senza produrre piccoli frammenti capaci di ammassarsi ed impedire quindi l'azione degli stessi enzimi. Sul materiale così preparato sono stati aggiunti, in modo analogo a quanto fatto con la sospensione cellulare, 10 mL di soluzione di digestione.

Le piastre sono state chiuse con del parafilm e messe a incubare *overnight* a 26 °C, al buio. Dopo le piastre sono state poste in delicata agitazione per 15 min a 45 giri/minuto. Le piastre sono state aperte sottocappa e la sospensione di protoplasti è stata prelevata con una pipetta pasteur con la punta tagliata, per evitare di danneggiare le cellule, e quindi la sospensione è stata filtrata su un filtro metallico con passo di 150 µm sterile, e divisa in aliquote di 5 mL in ogni tubo. Ad ogni aliquota è stato aggiunto delicatamente sulla superficie 1 mL di W5, il gradiente formatosi è stato quindi centrifugato a 65 g per 5 min senza uso di freni e con bassa accelerazione. I protoplasti interi si raccolgono all'interfaccia tra le 2 fasi, mentre quelli rotti si depositano sul fondo. I protoplasti sono stati raccolti prelevandoli, con una pipetta tagliata, dalla fase superiore, evitando la fase inferiore; ottenendo aliquote da 3 mL. I protoplasti sono stati sottoposti a 2 lavaggi con 8 mL di soluzione W5 e centrifugandoli a 65 g per 5 min. I protoplasti sono stati risospesi con 5 mL di W5 e infine riposti a 4 °C al buio per 2 ore, ponendo i tubi in posizione orizzontale, per favorire l'aerazione della soluzione.

Trasformazione transiente dei protoplasti con PEG

Per la trasformazione transiente dei protoplasti mediante PEG sono state usate proteine chimeriche con *tag* fluorescenti, quali GFP e due modificazioni della GFP: YFP, RFP. Sono stati scelti i seguenti costrutti: GFP-Chi (Di Sansebastiano *et al.*, 1998), Aleu-GFP (Di Sansebastiano *et al.*, 2001), KCO1-GFP (Verweij *et al.*, 2008), ERD2-YFP (Brandizzi *et al.*, 2002), RFP-KDEL (De Domenico *et al.*, in preazione) e WRKY-GFP.

Per la trasformazione le cellule sono state raccolte (5 minuti a 65 g, accelerazione minima e decelerazione nulla) e risospese in un'opportuna quantità di soluzione MMM (300 µL per ogni trasformazione), in un'unica aliquota.

In condizioni di sterilità, in tubi da 12 mL con fondo tondo, sono stati mescolati circa 20 µg di DNA plasmidico (nel caso di cotrasformazione sono stati aggiunti 2 diversi plasmidi sino a 40 µg) e 300 µL di protoplasti in soluzione MMM, successivamente sono stati aggiunti 300 µL di soluzione PEG 40%, mescolando immediatamente delicatamente. Abbiamo atteso in modo che l'intera operazione durasse circa 1 min ed abbiamo quindi aggiunto 2 mL di soluzione K3. I tubi così preparati sono stati incubati al buio a 26 °C per 2 h in posizione orizzontale per permettere la massima aereazione della sospensione. Sono poi stati aggiunti 8 mL di soluzione W5 per lavare tramite centrifugazione a 65 g per 5 min i protoplasti e risospenderli in 2 mL di K3. Tale sospensione è stata infine posta in incubazione al buio a 26 °C.

Durante l'incubazione la sintesi dei costrutti contenuti nei plasmidi inizia immediatamente ed aumenta nell'arco delle prime 12 ore. Normalmente, in sistemi analoghi, la rilevazione della fluorescenza è possibile già dopo 3-6 ore ma i costrutti proteici utilizzati sono per lo più descritti dopo 18 ore di espressione, quando il loro accumulo consente una agevole acquisizione di immagini. Le osservazioni sono state condotte al microscopio confocale.

K3 MACRO g in 1 L di soluzione

KNO₃ 25.3

NH₄NO₃ 2.5

NaH₂PO₄*2H₂O 1.69

CaCl₂*2H₂O 9

MgSO₄*7H₂O 2.5

(NH₄)₂SO₄ 1.34

H₂O Portare a 1 L

K3 100X-vit g in 100 mL di soluzione

Inositolo 1

Piridossina HCl 0,01

Tiamina HCl 0,1

Acido nicotinico 0,01

H₂O Portare a 100 mL

Sterilizzazione per filtrazione

B5 micro	g in 100 mL di soluzione
MgSO ₄ *H ₂ O	1
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,0002
H ₃ BO ₃	0,3
KI	0,075
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,0025
H ₂ O	Portare a 100 mL
Na ₂ EDTA (200X)	0,149
FeCl ₃ *6H ₂ O (200X)	0,54
Sterilizzare in autoclave	

K3 (0,3 M di saccarosio)	in 1L di soluzione
Na ₂ EDTA (200X)	5 mL
K3-macro	100 mL
FeCl ₃ *6H ₂ O (200X)	5 mL
B5-micro	1 mL
K3-vit	10 mL
Saccarosio	102,7 g
Xilosio	0,25 g
pH	5.8
Sterilizzazione in autoclave	
2,4 D	0,5 mL
NAA	1 mL
BAP	1 mL

Soluzione di Digestione	g in 100 mL di soluzione K3 Macro
Cellulasi Onozuka R10	1.2
Macerozima	0.4
Saccarosio	0.3

Soluzione PEG	g in 20 mL
Mannitolo 0,4 M	1,457
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	0.472
pH	8
PEG 4000 40%	8

W5	g in 1 L di soluzione
NaCl 154 mM	9
CaCl ₂ *2H ₂ O 125 mM	18,3
KCl 5mM	0,37
Glucosio	1
H ₂ O	Portare a 1 L

MMM	g in 100 mL di soluzione
Mannitolo 0,5 M	9,11
MgCl ₂ esaidrato 15 mM	0,3
MES 0,1%	0,1
H ₂ O	Portare a 100 mL

Visualizzazione mediante microscopia confocale

I protoplasti sono stati osservati nel loro stesso mezzo di incubazione, in vetrini predisposti con una camera chiusa da un coprioggetto in cui la sospensione cellulare è stata introdotta per capillarità.

Tutte le osservazioni condotte sulle piante e sui protoplasti di *Artemisia annua* L. sono state effettuate con un microscopio Zeiss Axiovert 200 (con un obiettivo 40x/0.75 Plan-Neofluar) associato ad un sistema laser scanning confocal (LSM Pascal, Zeiss). L'eccitazione è stata prodotta mediante una lampada a mercurio e mediante laser Argon 488 nm di lunghezza d'onda, (10% di potenza) e l'emissione della GFP è stata raccolta in una finestra tra 505 a 530 nm; l'emissione della YFP ha un picco a 538 nm ma è stata raccolta nella stessa finestra usata per GFP; l'emissione di RFP (massima tra 570 e 610 nm) è stata raccolta nella finestra 560-600 nm. Le immagini sono state acquisite attraverso l'intero aggregato cellulare in 15-20 sezioni ottiche di 0.5-0.8 µm (asse z). In seguito all'acquisizione sono state ricostruite le immagini tridimensionali e convertite in files Adobe Photoshop per la presentazione nelle figure.

La necessità dell'utilizzo del microscopio confocale è dovuto ai limiti ormai noti del microscopio ottico e del microscopio a fluorescenza. Infatti con il primo non si possono distinguere tra loro piccoli organelli con proprietà ottiche simili (endosomi e goccioline lipidiche) e con il secondo, una modificazione del microscopio ottico che visualizza strutture grazie all'uso di sonde fluorescenti, si ottengono spesso immagini sfocate, dovute in particolar modo alla fluorescenza derivante da piani diversi dal piano di fuoco. Con la microscopia confocale si è in grado di osservare strati sottili di un campione spesso. Si ottengono così immagini confocali con meno fluorescenza sparsa e con una risoluzione ed un contrasto decisamente migliori. Questa proprietà di selezionare degli strati sottili del campione da osservare è detta sezione ottica.

Le proteine cosiddette fluorescenti sono in grado di assorbire delle radiazioni a determinate lunghezze d'onda e di emetterle a lunghezze d'onda superiori. La GFP in particolare assorbe nel blu ed emette fluorescenza verde. La luce di eccitazione, emessa dalla sorgente luminosa (costituita da uno o più laser), è riflessa da uno specchio diecrico (2 Fig. 12) in direzione del campione (4) ed è focalizzata su di un punto ben preciso sul vetrino da un obiettivo (3). L'eccitazione non è molto intensa a livello del punto di messa a fuoco (punto di intersezione delle linee nere) sebbene i fluorocromi presenti nel campione siano eccitati dovunque entro il cono di luce. La fluorescenza è quindi emessa anche sopra (linee blu) e sotto (linee rosse) il piano di messa a fuoco. La luce emessa dal campione è raccolta da un obiettivo (3) e messa a fuoco su un diaframma (5), così che il fuoco nel campione e quello nel diaframma (pinhole) sono posti in piani otticamente coniugati (sono confocali). La sola luce che può attraversare il diaframma e che può essere registrata dal rivelatore (6) è quella derivante dal punto di messa a fuoco. Il rivelatore, o fotomoltiplicatore converte l'informazione ottica in segnali elettrici. Questa serie di obiettivi e specchi confocali forniscono immagini ad alta definizione, che sono libere dalla luce dispersa (deviante). Aumentando o diminuendo l'apertura del diaframma si mettono a fuoco piani diversi dello stesso campione. Le immagini confocali delle varie sezioni ottiche così ottenute, possono essere combinate e dare un'immagine tridimensionale su uno schermo (di un computer collegato), nella forma di una proiezione laterale, di una sezione crociata o di un'animazione. Inoltre, lo specchio diecrico separa la fluorescenza di diversi colori in rivelatori differenti, così da osservare strutture colorate diversamente nello stesso piano confocale.

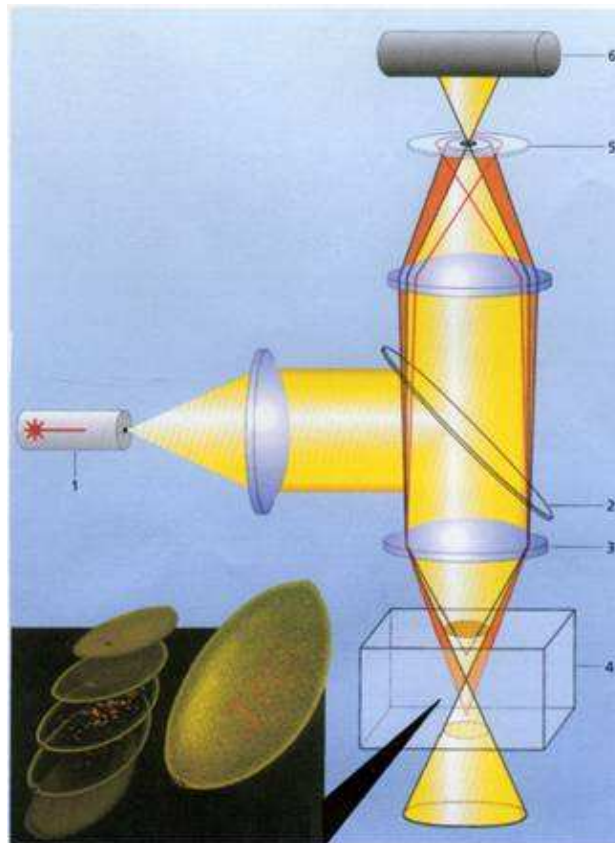


Fig. 12. Struttura schematica di un microscopio confocale. 1. sorgente luminosa (laser); 2. specchio dicroico, divisore di fascio; 3. obiettivo; 4. campione; 5. diaframma (pinhole); 6. rivelatore. Nel riquadro in basso a sinistra, si vede come le immagini di un ipotetico campione siano acquisite in sezioni ottiche che possono poi essere ricombinate come “proiezione” tridimensionale su di uno schermo bidimensionale.

ANALISI STATISTICA

Gli esperimenti sono stati condotti almeno in triplicato e i dati sono espressi come media \pm deviazione standard (DS). I dati, sono stati poi analizzati statisticamente mediante ANOVA a 2 vie seguito dal test di Tukey HSD post hoc, utilizzando il software SigmaStat Version 3.1. (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Il livello di significatività è stato impostato al 5%.

RISULTATI

COLTURE *IN VITRO*

Induzione di calli

L'allestimento dei calli è stato avviato utilizzando foglioline prelevate dalla parte centrale del fusto di piante in vaso di *Artemisia annua* L. (ecotipo Pericles), allo scopo di evitare sia stadi di sviluppo delle foglie eccessivamente precoci sia avanzati. Le foglioline, preventivamente sterilizzate, sono state frammentate e i frammenti di foglie sono stati trasferiti in piastre contenenti un *Broad Spectrum* di composizioni ormonali (vedi tabelle 4 e 5). Le piastre sono state messe al buio. Sulle porzioni di foglie incubate sui diversi terreni, dopo circa un mese, è stato possibile osservare la formazione di callo (Fig. 13). Aspetto, colore e consistenza dei calli sono risultati variabili a seconda della composizione ormonale del terreno. Tale variabilità è stata mantenuta anche nelle subcolture successive. Nei terreni che contenevano basse concentrazioni di 2,4-D (da 0,1 a 1 mg/L) e alte concentrazioni di BAP (da 0,1 a 0,2 mg/L) è stata osservata, in alcuni casi, una intensa rizogenesi; al contrario, nei terreni contenenti elevate concentrazioni di NAA (da 1,25 a 1,67 mg/L) e di BAP 0,15 mg/L è stata osservata, in alcuni casi, la neo-formazione di germogli (Fig. 14).

In tutti i casi, i calli, indotti sui diversi terreni, sono stati valutati dopo 5 subcolture, prendendo in esame diversi parametri:

- pigmentazione dei calli, variabile tra bianco, marrone chiaro e verde chiaro;
- consistenza dei calli, variabile tra duro, spugnoso e friabile;
- presenza/assenza di radici e/o germogli;
- uniformità della crescita;

Per quanto riguarda la consistenza, i calli friabili sono stati considerati potenzialmente utili per un rapido allestimento di colture liquide.

Dalla valutazione dei calli cresciuti sui diversi terreni, risultati ottimali, in termini di pigmentazione e friabilità, sono stati ottenuti quando la concentrazione di 2,4-D era compresa tra 1 e 2 mg/L e quella di BAP era compresa tra 0,01 e 0,2 mg/L (Fig. 16). Risultati simili si sono ottenuti con concentrazioni di NAA di 0,2 mg/L e di BAP di 0,2 mg/L (Fig. 15).

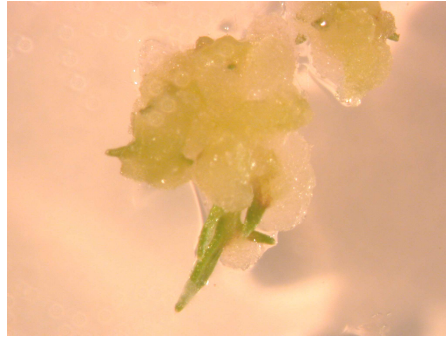


Fig. 13. Formazione di callo dai bordi del taglio della fogliolina di *Artemisia annua* L.

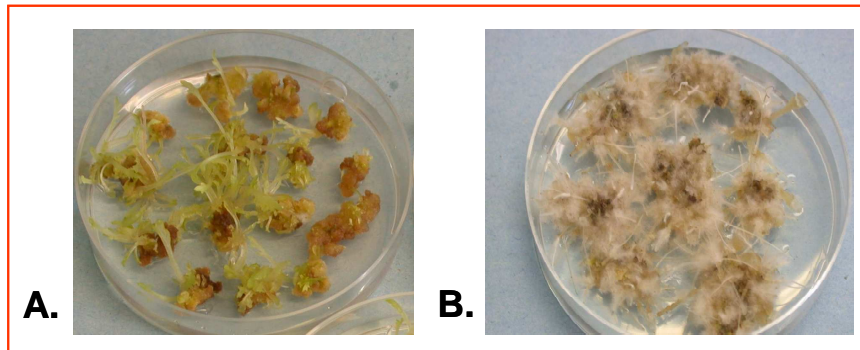


Fig. 14. Organogenesi (A) e rizogenesi (B) da calli di *A. annua*.

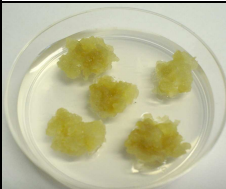



Nome	Ormoni [mg/L]		
	NAA	BAP	
O₁₁	1,25	0,05	
I₁₄	0,083	0,2	
L₁₄	0,2	0,2	
M₁₄	0,41	0,2	

Fig. 15. Calli cresciuti su terreno contenente gli ormoni NAA e BAP a diverse concentrazioni che hanno mostrato una buona friabilità.


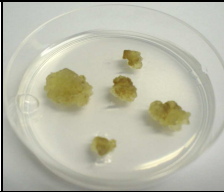

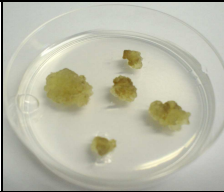

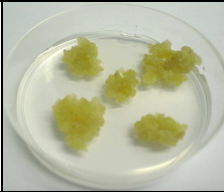
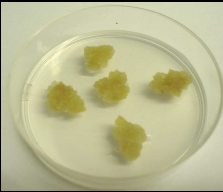




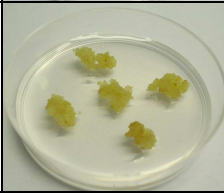



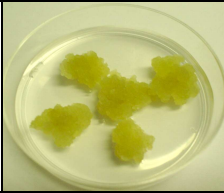


Nome	Ormoni [mg/L]			Nome	Ormoni [mg/L]		
	2,4D	BAP			2,4D	BAP	
F1	1,5	0		G4	2	0,05	
G1	2	0		E5	1	0,1	
E2	1	0,01		F5	1,5	0,1	
F2	1,5	0,01		F6	1,5	0,15	
G2	2	0,01		G6	2	0,15	
F3	1,5	0,025		D7	0,5	0,2	
G3	2	0,025		E7	1	0,2	
F4	1,5	0,05		G7	2	0,2	

Fig. 16. Calli cresciuti su terreno contenente gli ormoni 2,4 D e BAP a diverse concentrazioni che hanno mostrato una buona friabilità.

Induzione di sospensioni cellulari

Per l'induzione delle sospensioni cellulari di *Artemisia annua* L. sono stati utilizzati i calli selezionati per la consistenza friabile ritenuta più adatta per l'allestimento di tali sospensioni. In particolare è stata selezionata la linea cellulare G6 (2,4 D 2 mg/L e BAP 0,15 mg/L) poiché era caratterizzata da una crescita rapida, buona friabilità e pigmentazione verde. Frammenti di callo sono stati posti in beute in presenza di pochi millilitri di terreno della stessa composizione utilizzata per la coltura solida. Ad intervalli regolari di 2-3 giorni è stato aggiunto nuovo terreno fino al raggiungimento della densità e del volume ottimali di sospensione. Diverse subcolture successive, ad intervalli di un mese, sono state quindi effettuate per stabilizzare la crescita (Fig. 17).



Fig. 17. Sospensioni cellulari di *Artemisia annua* della linea G6.

Per valutare la crescita delle colture cellulari in sospensione è stata costruita una curva misurando gli incrementi del volume cellulare impaccato, ad intervalli regolari (ogni 5 giorni), durante il ciclo di sub-coltura di 5 settimane. Le sospensioni cellulari raggiungevano la fase stazionaria intorno al 25° giorno di subcoltura con un incremento della biomassa di circa 4 volte alla fine della subcoltura (Fig. 18).

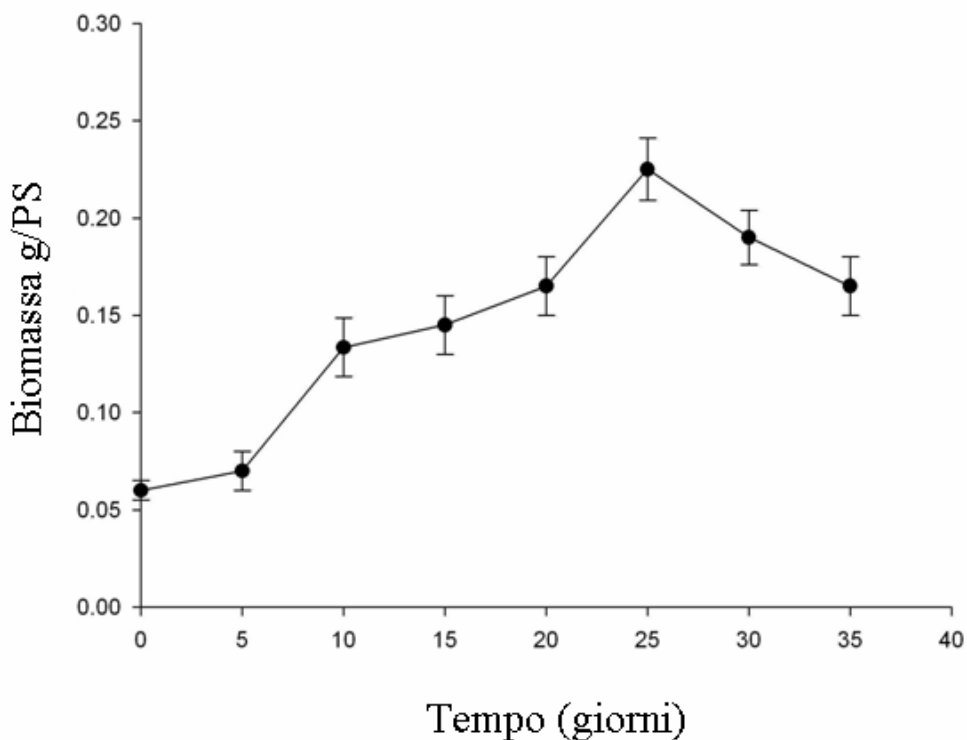


Fig. 18. Curva di crescita di cellule in sospensione di *Artemisia annua* L. della linea cellulare G6 durante tutto il ciclo di crescita. I valori ottenuti sono la media di tre esperimenti indipendenti, \pm deviazione standard.

Micropropagazione dei germogli

Dalle foglie sterilizzate per ottenere callo si sono sviluppati anche piccoli germogli, a causa dell'induzione di gemme avventizie. Le micro-talee trasferite in terreno di micropropagazione MM (Sali e vitamine MS, saccarosio 30 g/L, NAA 0,05 mg/L, BAP 0,5 mg/L, agar 7g/L e pH 5,7) in breve tempo hanno dato vita ad una coltura sterile di piantine di artemisia, con un tasso di proliferazione medio di 1:3 (Fig. 19). Con la stessa metodologia sono state ottenute piantine micropropagate della cultivar Artemis. Artemis è un ibrido, che produce artemisinina con rese dell'1%, ed è caratterizzato da una tarda fioritura. Artemis è stato brevettato dalla Mediplant (Svizzera).

In alcune colture di germogli di artemisia è stato evidenziato il fenomeno della vitescenza. Si tratta di un'alterazione fisiologica, che determina l'iper-idrosi dei tessuti e porta alla morte le colture. Le foglie dei germogli vitrescenti assumono un aspetto traslucido, appaiono arricciate, ingrossate e succulente, con visibile ipertrofia degli steli. Il problema è stato superato diminuendo la dose di auxina presente nel terreno (da 0,05 a 0,01 mg/L) e aumentando la dose di agar, da 7 a 8 g/L.

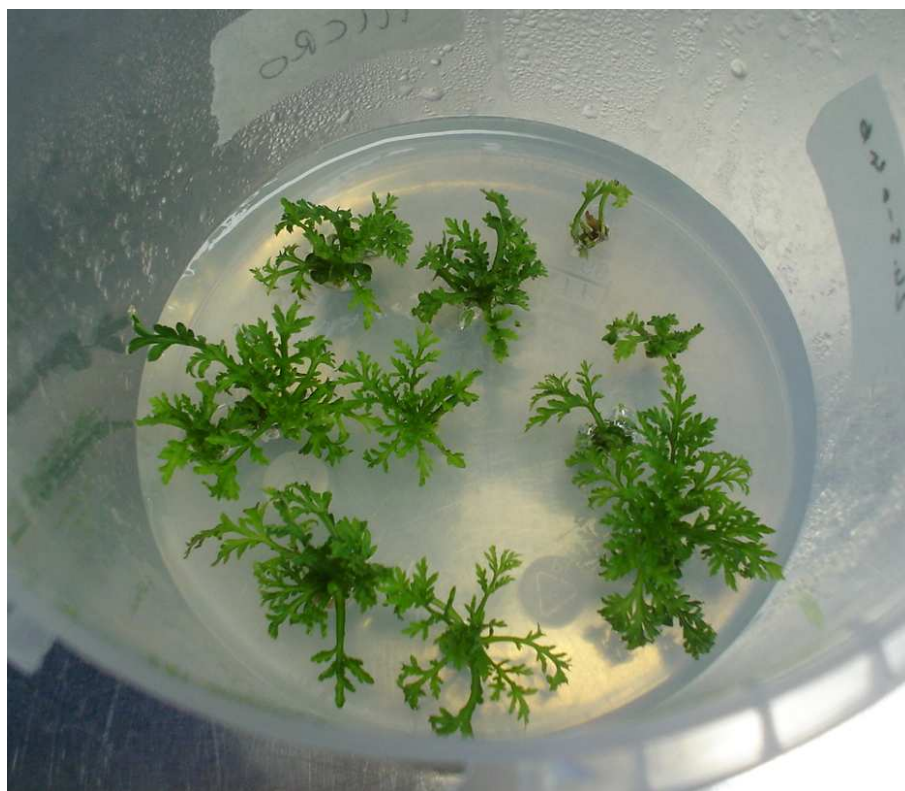


Fig. 19. Germogli micropropagati di *Artemisia annua* L. varietà Artemis.

VALUTAZIONE DEL CONTENUTO DI ARTEMISININA

La produzione e l'accumulo di artemisinina sono stati valutati mediante HPLC con la tecnica della derivatizzazione pre-colonna, dopo un'opportuna estrazione.

La presenza di artemisinina nei campioni analizzati è stata confermata confrontando il picco cromatografico dell'estratto con quello dello Standard (Artemisinina, Sigma) separatamente o in combinazione (Fig. 20).

Sono stati analizzati sia tessuti differenziati, come i germogli ottenuti per micropropagazione, sia quelli indifferenziati, come le cellule in sospensione. La quantità di artemisinina (0,05-0,07 % PS) presente nei germogli dell'ecotipo Pericles, ottenuti per micropropagazione, è risultata inferiore a quella della pianta in vaso di circa dieci volte (0,8-0,9% PS).

Le analisi effettuate nelle colture cellulari di artemisia hanno evidenziato che la produzione di artemisinina era continua durante tutto il ciclo di subcoltura, oscillando tra 4,90 e 5,44 $\mu\text{g/g}$ PS (Tab. 9). L'artemisinina è stata analizzata anche nel mezzo di coltura ed ha mostrato un aumento durante il ciclo cellulare, raggiungendo al 25° giorno valori di 22,35 $\mu\text{g/L}$ (Fig. 21).

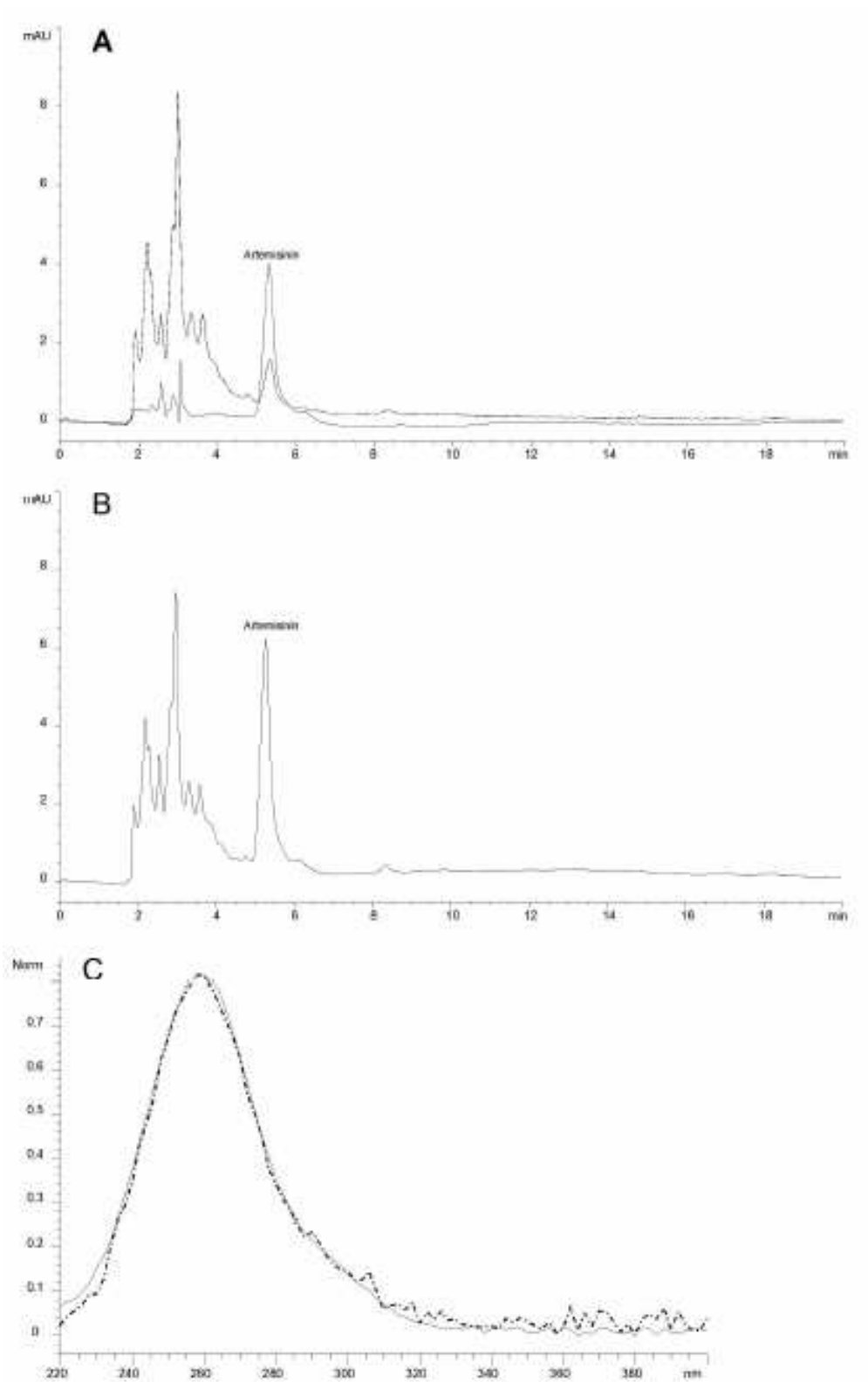


Fig. 20. A. Cromatogramma dello standard di artemisinina derivatizzato (-) e dell'estratto di colture cellulari (--). B. Il picco specifico dell'artemisinina è stato confermato dall'analisi del campione iniettato insieme all'estratto. C. Comparazione degli spettri dello standard (-) e il picco caratteristico dell'artemisinina (--).

Tab. 9. Biosintesi dell'artemisinina durante tutto il ciclo di subcoltura (35 giorni). I valori sono la media di tre esperimenti indipendenti, \pm deviazione standard.

Giorni di subcoltura	Artemisinina ($\mu\text{g/gPS}$)
0	5.14\pm0.06
5	5.15\pm0.07
10	4.96\pm0.06
15	4.90\pm0.01
20	5.03\pm0.16
25	4.98\pm0.54
30	5.04\pm0.48
35	5.44\pm0.79

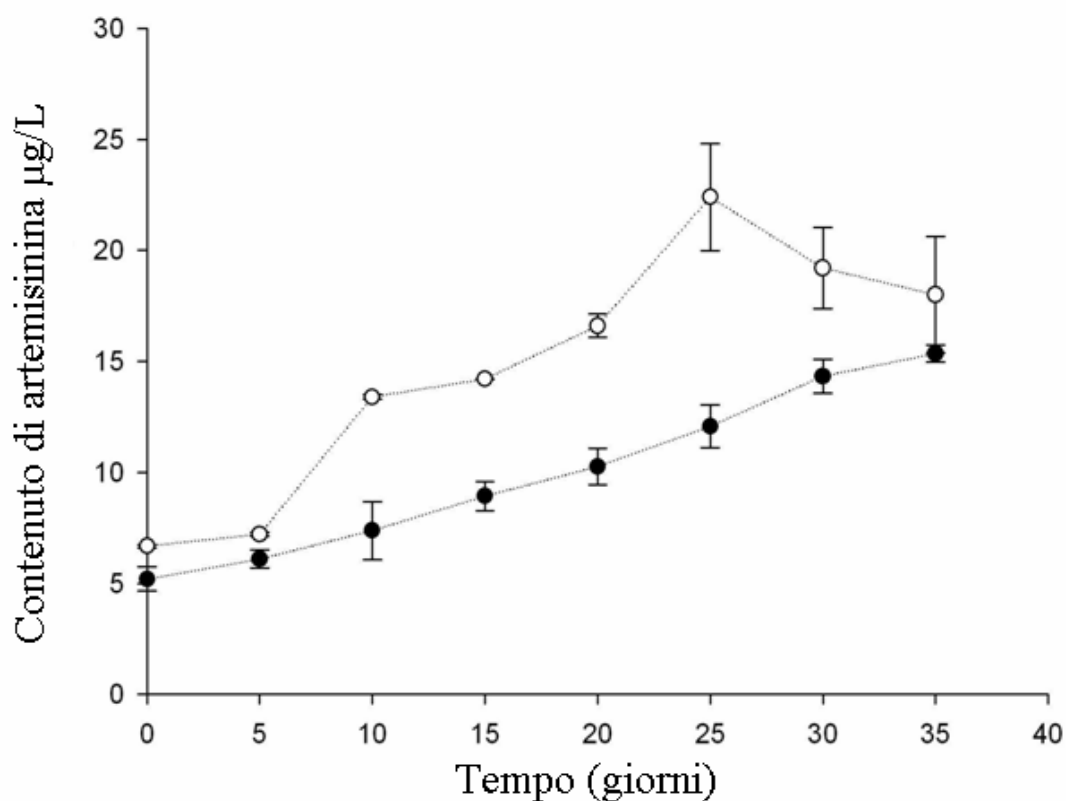


Fig. 21. Determinazione dell'artemisinina intracellulare (\circ) ed extracellulare (\bullet) in colture cellulari di *Artemisia annua*, \pm deviazione standard.

COLORAZIONE DEI TERPENI

Il reagente NADI, specifico dei terpeni, è stato utilizzato per localizzare la eventuale presenza del sesquiterpene artemisinina nelle cellule di *Artemisia annua*. Le cellule in sospensione di *Artemisia annua* L hanno evidenziato una colorazione in blu-violetto nello spazio intracellulare. (Fig. 22 A). Le cellule del callo di *A. annua* non presentavano la colorazione (Fig. 22 B).

ELICITAZIONE DELLE COLTURE PER LA PRODUZIONE DI ARTEMISININA

Allo scopo di aumentare la produzione di artemisinina nelle colture di *Artemisia annua* sono stati condotti esperimenti che prevedevano l'aggiunta di alcuni elicitori al mezzo di coltura e la successiva valutazione del metabolita.

Le cellule di artemisinina al 15° giorno di subcoltura sono state elicitate con metil jasmonato (MeJA) 22 μM per diversi intervalli (30 min, 1 h, 2h, 4h 24 h, 48h e 5giorni) e quindi sono state analizzate per il contenuto di artemisinina (Fig. 23), dopo la valutazione della vitalità cellulare. Soltanto dopo 5 giorni di trattamento con MeJA si osservava una riduzione della vitalità che scendeva fino all'85% (Fig. 24). I livelli di artemisinina determinati dopo trattamento per 30 min con MeJA mostravano un aumento significativo rispetto al controllo non trattato (12,44 $\mu\text{g/g PS}$ contro 5,94 $\mu\text{g/g PS}$), e raggiungevano il valore massimo (14,40 $\mu\text{g/g PS}$) dopo trattamento per 4 ore. Nei trattamenti più lunghi, 24 ore e 5 giorni, non si sono riscontrate differenze significative se comparate ai controlli. Le cellule utilizzate come controllo trattate con etanolo 95% (solvente del MeJA) e quelle non trattate non hanno mostrato differenze significative (Fig. 26).

Le cellule in sospensione di *Artemisia annua* sono state trattate con miconazolo a differenti concentrazioni (10, 100 e 200 μM) per diversi intervalli di tempo (30 min, 1 h, 2h, 4h 24 h, 48h e 5giorni) e successivamente sono state analizzate per il contenuto di artemisinina. È stata anche valutata la vitalità cellulare: il trattamento con miconazolo 200 μM per 30 min riduceva la vitalità del 40%, concentrazioni di miconazolo più basse avevano effetti meno drastici sulla vitalità, mentre concentrazioni di 200 e 100 μM di miconazolo per tempi prolungati non permettevano di effettuare la conta cellulare per eccessiva tossicità (Fig. 24 e 25). La vitalità non era influenzata dal trattamento con il DMSO (Fig. 24).

I trattamenti con miconazolo 100 e 200 μM hanno indotto un aumento di artemisinina dopo 24 ore, in particolare l'aumento massimo si è avuto con il trattamento a 200 μM per 5 giorni (13,04 $\mu\text{g/g PS}$); al contrario il trattamento con miconazolo 10 μM non ha indotto

nessuna variazione significativa. È interessante notare che nelle cellule trattate con DMSO c'è stato un aumento di artemisinina di 1,4 volte dopo tempi prolungati (24h, 48 h e 5 giorni) rispetto al controllo non trattato (Fig. 27).

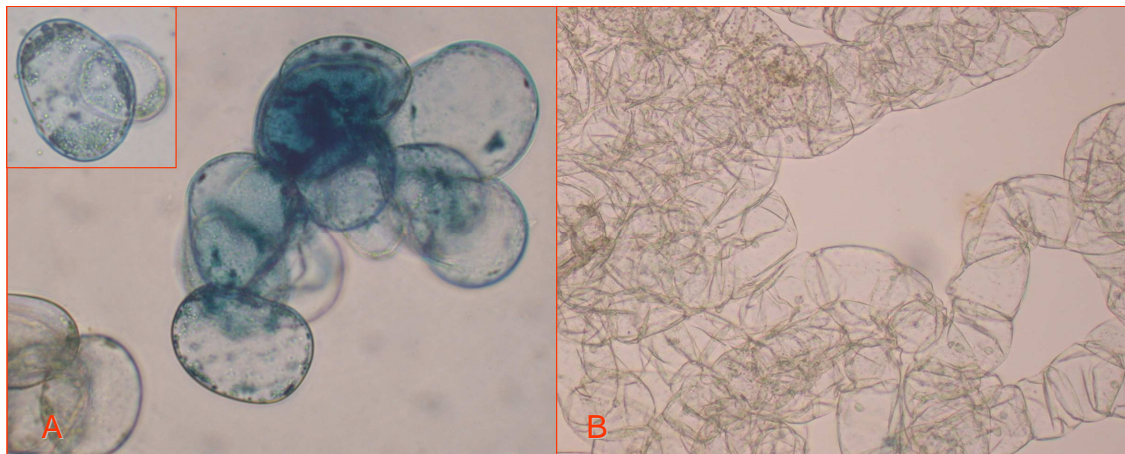


Fig. 22. Colorazione con il reagente NADPH di cellule in sospensione (A) in alto a sinistra un particolare di una cellula colorata di blu-violetto (ingrandimento 40X); e di cellule di callo di *Artemisia annua* (B) (ingrandimento 20X).

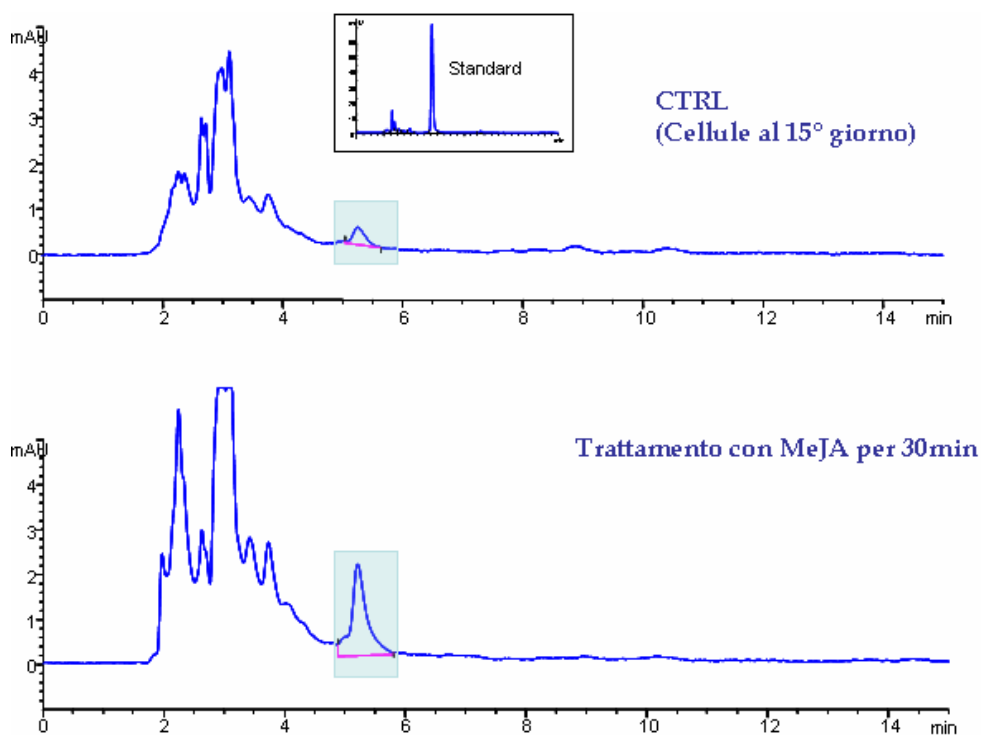


Fig. 23. Profili cromatografici dei campioni di cellule in sospensione G6 di *A. annua* trattate con metil jasmonato 22 μM e cellule controllo al 15° giorno di subcoltura.

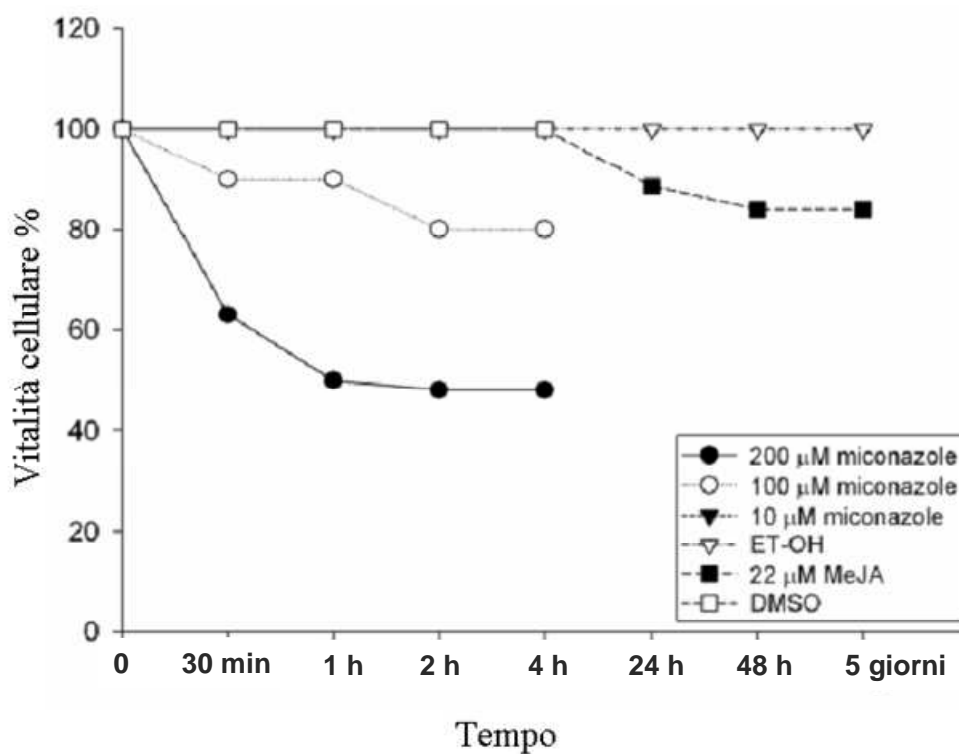


Fig. 24. Vitalità cellulare delle cellule in sospensione di *A. annua* trattate con metil jasmonato e miconazolo, valutata mediante saggio con fluoresceina diacetato. La deviazione standard non superava il 10%.

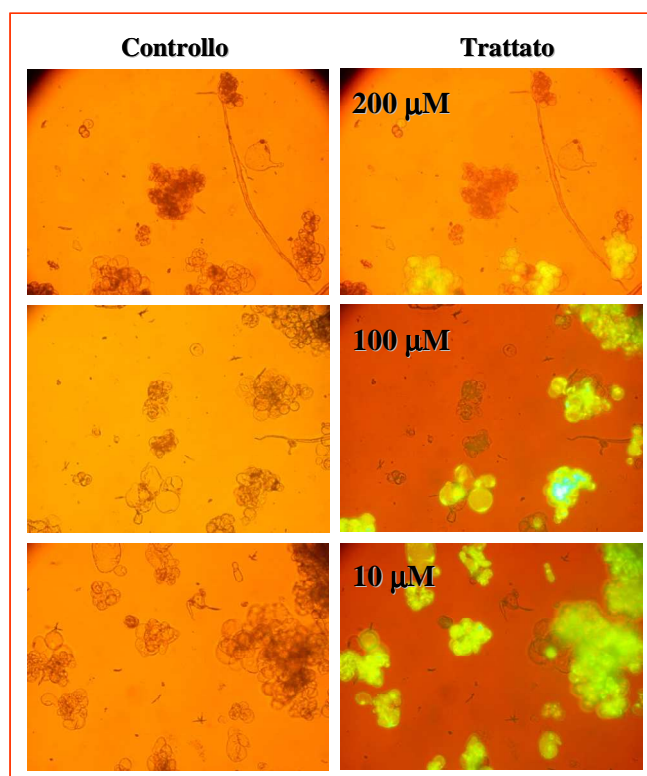


Fig. 25. Foto al microscopio ottico di cellule in sospensione di *Artemisia annua* L. trattate con miconazolo a diverse concentrazioni per valutare la vitalità cellulare. Nella colonna di

sinistra troviamo le cellule non trattate e in quella di destra le cellule trattate con miconazolo 200, 100 e 10 μM . La vitalità è stata valutata mediante saggio con fluoresceina diacetato.

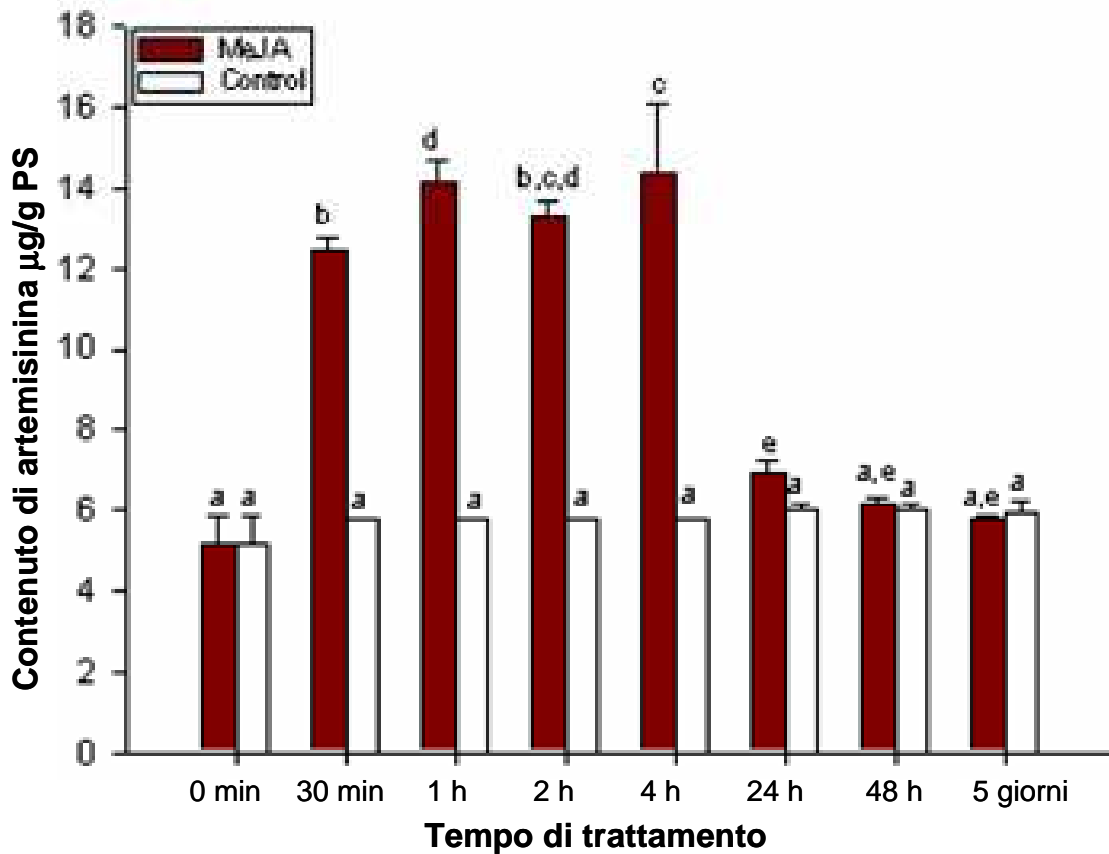


Fig. 26. Effetto del metil jasmonato (MeJA) sulla produzione di artemisinina in cellule in sospensione di *A. annua*. Il controllo è rappresentato da cellule trattate con etanolo al 95%. I valori ottenuti sono la media di tre esperimenti indipendenti, \pm deviazione standard. Le lettere indicano la differenza statistica a $P < 0.05$.

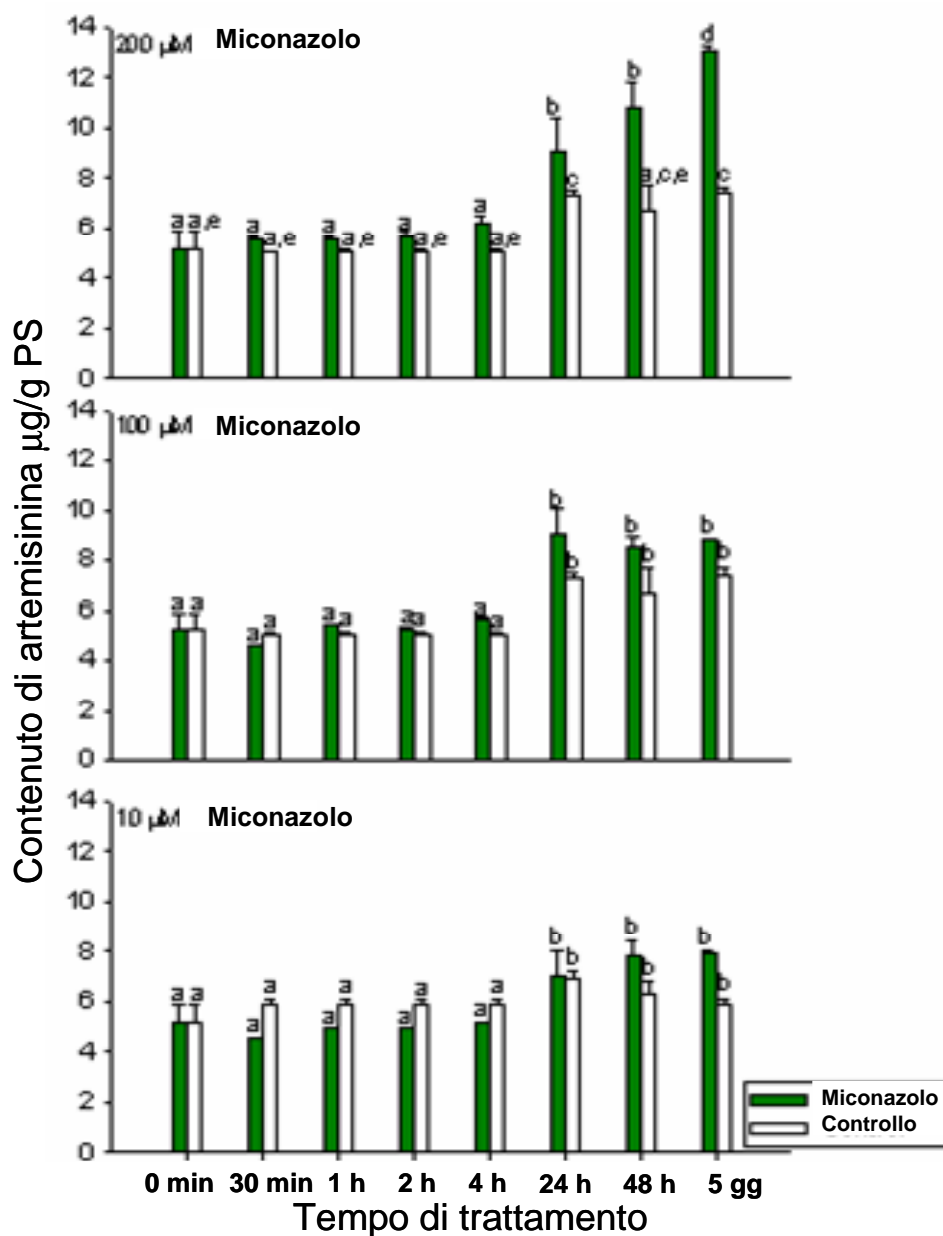


Fig. 27. Effetto del miconazolo 200 µM, 100 µM, 10 µM, sulla produzione di artemisinina in cellule in sospensione di *A. annua*. Il controllo è rappresentato da cellule trattate con DMSO. I valori ottenuti sono la media di tre esperimenti indipendenti, ± deviazione standard. Le lettere indicano la differenza statistica a $P < 0.05$.

TRATTAMENTO CON ESTRATTI FUNGINI

Per individuare possibili elicitori biotici dell'artemisinina sono state selezionate diverse specie di funghi, che avevano caratteristiche molto diverse tra loro, quali: *Alternaria radicina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium acimunatum*, *Alternaria alternata*, *Verticillium*

dahliae, *Penicillium verrucosum*. Cellule in sospensione di *Artemisia annua* al 15° giorno di subcoltura sono state elicitate con i diversi estratti fungini alla concentrazione di 1%, 5%, 10%, per diversi tempi: 5 e 9 giorni. Al termine di ogni trattamento è stato analizzato il contenuto di artemisinina intracellulare ed extracellulare.

Nel trattamento delle sospensioni cellulari con *Penicillium verrucosum* si è riscontrato un aumento del 31% di artemisinina extracellulare quando le cellule venivano trattate per 5 giorni alla concentrazione di 1%, rispetto alle cellule controllo in cui è stata aggiunta acqua sterile milli Q in volume equivalente all'estratto. Quando le cellule venivano trattate con *P. verrucosum* alla concentrazione di 5% per 5 giorni di trattamento l'aumento era del 16% (Fig. 28).

Diversamente, nei trattamenti con gli altri estratti fungini il contenuto dell'artemisinina nelle cellule e nel mezzo non mostrava differenze significative rispetto al controllo trattato con sola acqua (dati non mostrati).

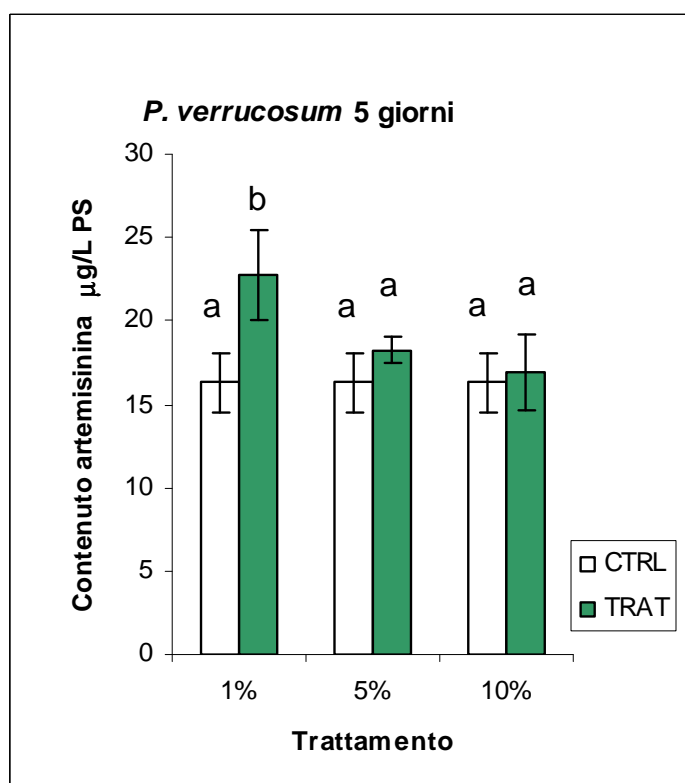


Fig. 28. Trattamento con *Penicillium verrucosum* delle cellule in sospensione al 15° giorno di sucoltura per 5 giorni a diverse concentrazioni (1%, 5% e 10 %). Il controllo è rappresentato da cellule trattate con acqua MilliQ sterile. I valori ottenuti sono la media di tre esperimenti indipendenti, \pm deviazione standard. Le lettere indicano la differenza statistica a $P < 0.05$.

ALTERAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA

Analisi semi-quantitativa *Reverse Transcription-PCR*

Nelle cellule in sospensione trattate con Metil Jasmonato per 30 min, 1h, 2h, 4h, 24h, 48h e 5 giorni e Miconazolo per 30 min, 1h, 2h, 4h, 24h, 48h e 5 giorni è stato estratto l'RNA da cui è stato ottenuto il cDNA. Sono stati disegnati primer specifici per i geni *CYP71AV1* (citocromo P450 monoossigenasi), *CPR* (citocromo P450 riduttasi) e *Dbr2* (aldeide artemisinica $\Delta 11(13)$ riduttasi) e come gene costitutivo è stata utilizzata l'*ubiquitina* (*UBQ*) (Tab. 7). L'espressione dei questi geni è stata analizzata mediante *Reverse Transcription-PCR* semi-quantitativa e i risultati sono mostrati in figura 29. Nel trattamento con MeJA il gene *CPR* veniva espresso in tutte le condizioni al contrario il gene *CYP71AV1* ha mostrato un aumento di espressione dopo 30 minuti fino alle 4 ore di trattamento. Per quanto riguarda il trattamento con miconazolo 200 μ M i geni *Dbr2* e *CPR* sono stati indotti rispettivamente dopo 30 minuti e 4 ore di trattamento; mentre il gene *CYP71AV1* non ha subito variazioni di espressione significative.

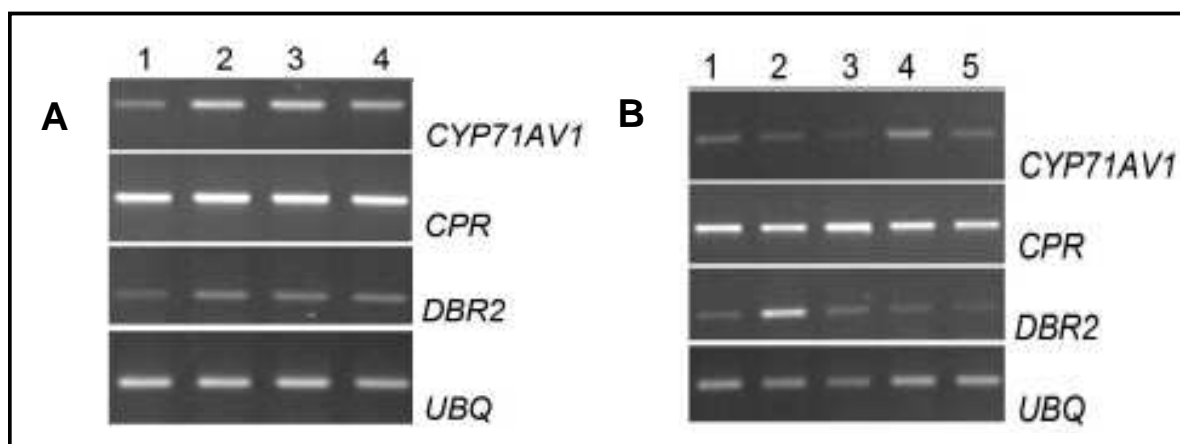


Fig. 29. Analisi *Reverse Transcription-PCR* semi-quantitativa dei geni della via biosintetica dell'artemisinina: *CYP71AV1*, *CPR* e *Dbr2* in sospensioni cellulari di *Artemisia annua* L., il gene *Ubiquitina* è il gene costitutivo. A. Cellule in sospensioni trattate con metil jasmonato 22 μ M per 0 (colonna 1), 30 min (colonna 2), 4h (colonna 3) e 24 h (colonna 4). B. Cellule in sospensioni trattate con miconazolo 200 μ M per 0 (colonna 1), 30 min (colonna 2), 4h (colonna 3), 24 h (colonna 4) e 5 giorni (colonna 5).

Analisi quantitativa *Real Time PCR*

Per confermare e quantificare le variazioni dell'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi di artemisinina in cellule in sospensione di *Artemisia annua* dopo trattamento con metil jasmonato e miconazolo è stata anche utilizzata la metodica *Real Time* quantitativa relativa. Il metodo permette di quantificare il trascritto specifico con un parametro numerico (C_T). I risultati così ottenuti sono stati analizzati applicando un metodo comparativo (metodo $\Delta\Delta C_T$). Le quantità sono espresse in relazione ad un campione calibratore, che rappresenta la quantità unitaria del gene di interesse, tutti gli altri campioni sono espressi come n -volte il calibratore.

Sono stati analizzati i geni: *amorfa diene sintasi (ADS)*, *citocromo P450 monoossigenasi (CYP71AV1)*, *citocromo P450 reduttasi (CPR)*, *aldeide artemisinica $\Delta 11(13)$ reduttasi (Dbr2)* (Tab. 8). L'*ubiquitina (UBQ)* è il gene costitutivo utilizzato per la normalizzazione dello stampo nella reazione PCR.

Quando le cellule sono state trattate con MeJA è stato evidenziato un aumento dell'espressione di *CYP71AV1* di circa 7 volte, subito dopo 30 min, rispetto al controllo non trattato. *CPR* e *Dbr2* non hanno mostrato significative variazioni di espressione (Fig. 30).

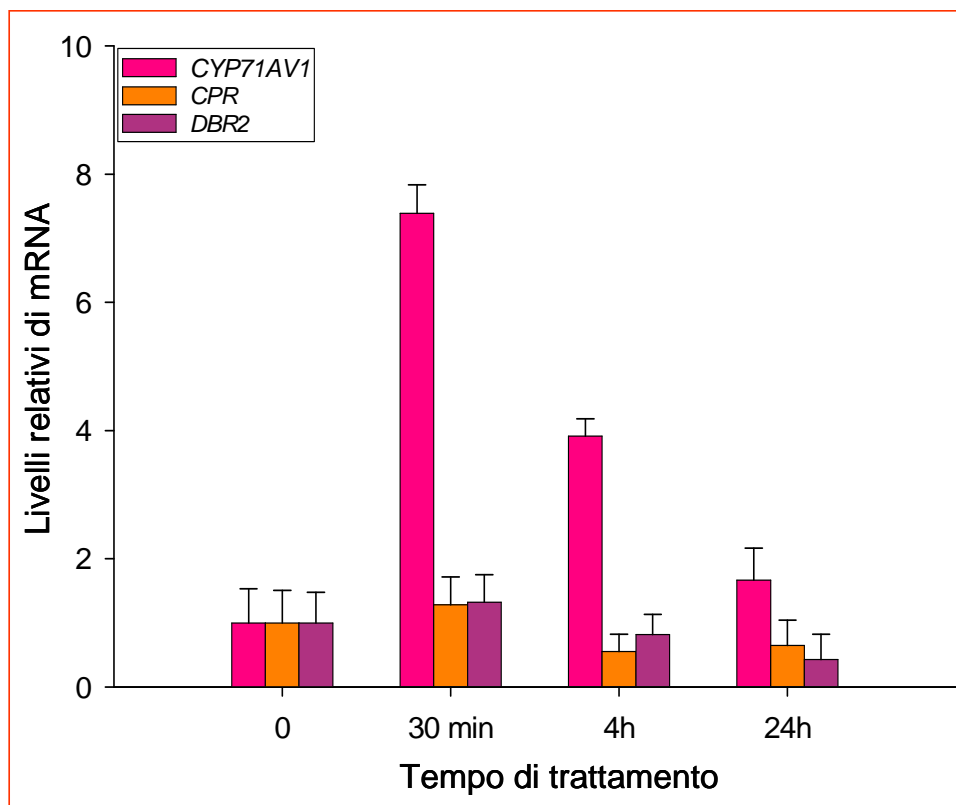


Fig. 30. Effetto del metil jasmonato sull'espressione dei geni della via biosintetica dell'artemisinina in sospensioni cellulari di *A. annua*, \pm deviazione standard.

Nelle cellule trattate con miconazolo 200 μM dopo 30 min e 4 ore di trattamento si è evidenziato un forte aumento dell'espressione del gene *Dbr2*, rispettivamente di 4 e 3 volte rispetto alle cellule controllo. L'espressione di *CPR* dopo 4 ore di trattamento con miconazolo 200 μM ha subito un aumento di tre volte. Al contrario l'espressione del gene *CYP71AV1* non mostrava variazioni rispetto ai campioni non trattati (Fig. 31).

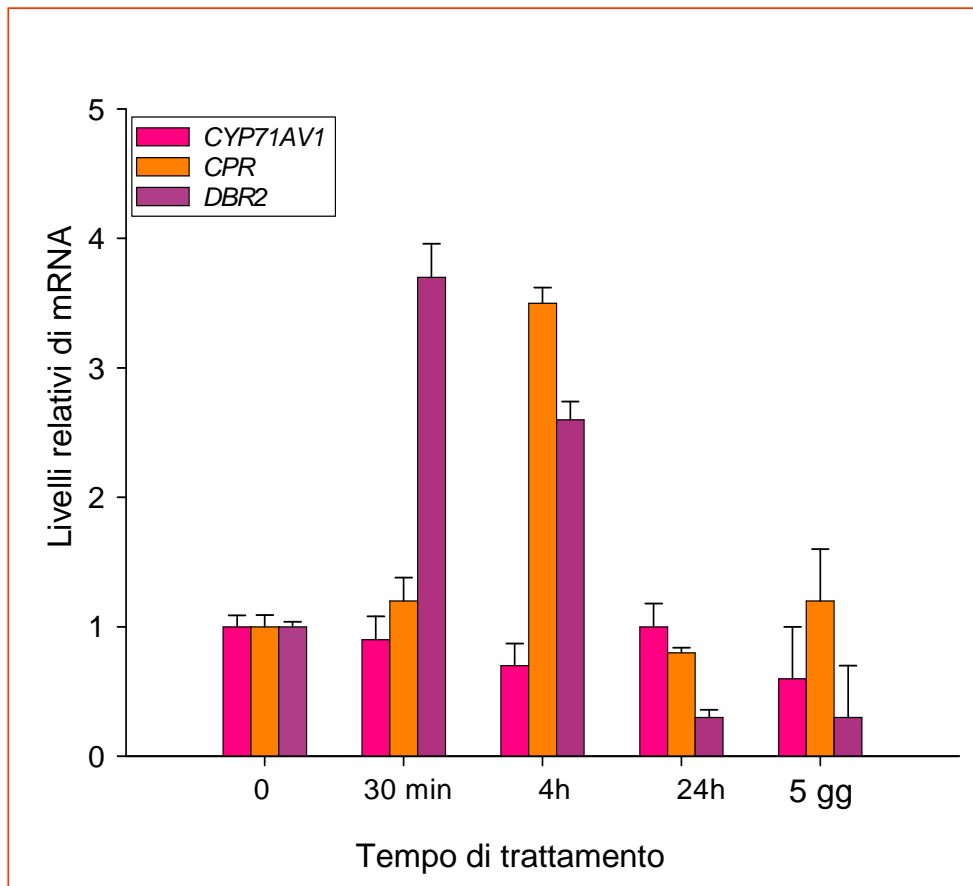


Fig. 31. Effetto del miconazolo 200 μM sull'espressione dei geni della via biosintetica dell'artemisinina in sospensioni cellulari di *A. annua*, \pm deviazione standard.

Per quanto riguarda il gene *ADS* non è stato possibile rilevare la sua espressione in campioni di cDNA ottenuto da cellule in sospensione di *Artemisia annua* L., nonostante i numerosi tentativi, utilizzando la tecnica *Reverse Transcription-PCR* e *Real Time PCR* quantitativa, con differenti temperature di annealing e diversi primer. Al contrario prodotti di amplificazione sono stati ottenuti da cDNA utilizzando campioni di foglie di *A. annua* ma anche da DNA genomico isolato da cellule in sospensione di *A. annua*. Questi prodotti di amplificazione sono stati clonati e sequenziati ed è stato confermato che si trattava del gene *ADS* (dati non mostrati).

CARATTERIZZAZIONE DEI DOMINI SUBCELLULARI IN CELLULE DI *A. ANNUA*

Non sono disponibili in letteratura protocolli di ottenimento di protoplasti di *Artemisia annua*. In questo lavoro di tesi, a partire da cellule in sospensione e da piantine micropropagate di *A. annua* è stato possibile isolare protoplasti da utilizzare in esperimenti di trasformazione. Sono stati trasformati transientemente protoplasti ottenuti sia da foglie che da cellule in sospensione di artemisia G6, al 15° giorno; con un'efficienza di trasformazione del 40-50 % del tutto comparabile con la trasformazione di protoplasti di altra origine.

In una fase preparatoria a questo tipo di indagine, sono stati ricercati e testati alcuni marcatori proteici caratteristici per i diversi distretti endomembranosi della cellula. I geni ricombinanti di queste proteine marcatrici sono derivati dalla fusione della sequenza GFP (Haseloff *et al.*, 1997), YFP (Miyawaki *et al.*, 1997) o anche RFP (Campbell *et al.*, 2002) con vari peptidi segnale e proteine del sistema di secrezione. Le diverse caratteristiche ottiche con spettri di emissione ben distinti ha anche permesso di co-localizzare contemporaneamente RFP con GFP o YFP, dando un quadro più esauriente del *pattern* fluorescente osservato.

Sono stati condotti diversi esperimenti per visualizzare tutte le parti essenziali del sistema di secrezione: il RE (reticolo endoplasmico) usando RFP-KDEL (De Domenico *et al.*, in preparazione), i dittiosomi del Golgi con ERD2-YFP (Brandizzi *et al.*, 2002; Rehman *et al.*, 2008), il vacuolo litico ed i PVC (compartimenti provacuolari) con Aleu-GFP (Di Sansebastiano *et al.*, 2001), il vacuolo neutro con GFP-Chi (Di Sansebastiano *et al.*, 1998; Fluckiger *et al.*, 2003) e il tonoplasto con KCO1-GFP (Verweij *et al.*, 2008).

All'osservazione al microscopio confocale, il marcatore RFP-KDEL si distribuiva perfettamente nel reticolo endoplasmatico (RE) ed era ben visibile nell'anello rappresentato dall'involucro intorno al nucleo. Confrontando le immagini dei protoplasti ottenuti sia da foglie che da cellule in sospensione si notava che nei protoplasti da colture in sospensione vi erano delle irregolarità del reticolo endoplasmatico (Fig. 32). Dal momento che si distribuisce nell'intera cellula, ovunque abbia sede il RE, questo marcatore è stato utilizzato come riferimento per gli altri marcatori. Sono stati quindi compiuti degli esperimenti di co-trasformazione in cui RFP-KDEL è stata co-espressa alternativamente con ERD2-YFP, GFP-Chi e Aleu-GFP. I *pattern* osservati durante la co-espressione non

differivano, per nessuno dei marcatori, da quelli osservati durante le trasformazioni con il costrutto singolo.

Il costrutto ERD2-YFP marca i dittiosomi del Golgi: nei protoplasti ottenuti da sospensioni cellulari di artemisia si notava che i dittiosomi non sono così dinamici come precedentemente osservato in altri sistemi ad esempio i protoplasti di tabacco. Nel caso della cotrasformazione con RFP-KDEL, ERD2-YFP marcava non solo i dittiosomi ma anche porzioni del reticolo endoplasmatico; questa osservazione non sorprende affatto, essendo ERD2 il recettore del segnale KDEL (Fig. 33). Il costrutto GFP-Chi marca il vacuolo neutro. Questo marcatore è trasportato dal reticolo endoplasmatico al vacuolo con bassa efficienza. In protoplasti di *A. annua* si sono osservati casi di colocalizzazione in cui GFP-Chi e RFP-KDEL si ritrovano entrambi nel reticolo endoplasmatico (Fig. 34, A e B). In altri casi però si poteva osservare che la GFP era esportata completamente dal RE per accumularsi nel vacuolo centrale e la sovrapposizione dei due *pattern* era ridotta o del tutto assente (Fig. 34 C).

Il vacuolo litico è evidenziato dal costrutto Aleu-GFP che differisce dal precedente marcatore del vacuolo nel meccanismo di trasporto. A differenza di GFP-Chi, Aleu-GFP è trasportato velocemente dal RE al vacuolo grazie ad una specifica interazione segnale-recettore e infatti non sono stati mai osservati casi di sovrapposizione tra la distribuzione di Aleu-GFP e di RFP-KDEL. Il vacuolo litico nei protoplasti da sospensioni cellulari si evidenziava come un unico vacuolo di forma lobata e, pur occupando la maggior parte del volume cellulare, aveva un volume percentualmente minore rispetto a quello dei vacuoli ritrovati nei protoplasti ottenuti da foglia (Fig. 35).

Il costrutto KCO1-GFP marca il tonoplasto, seguendo i contorni del vacuolo. Nei protoplasti ottenuti da cellule in sospensione e da foglie di *Artemisia annua* non sono stati evidenziati cambiamenti in termini di setti di separazione e frammentazione (Fig. 36).

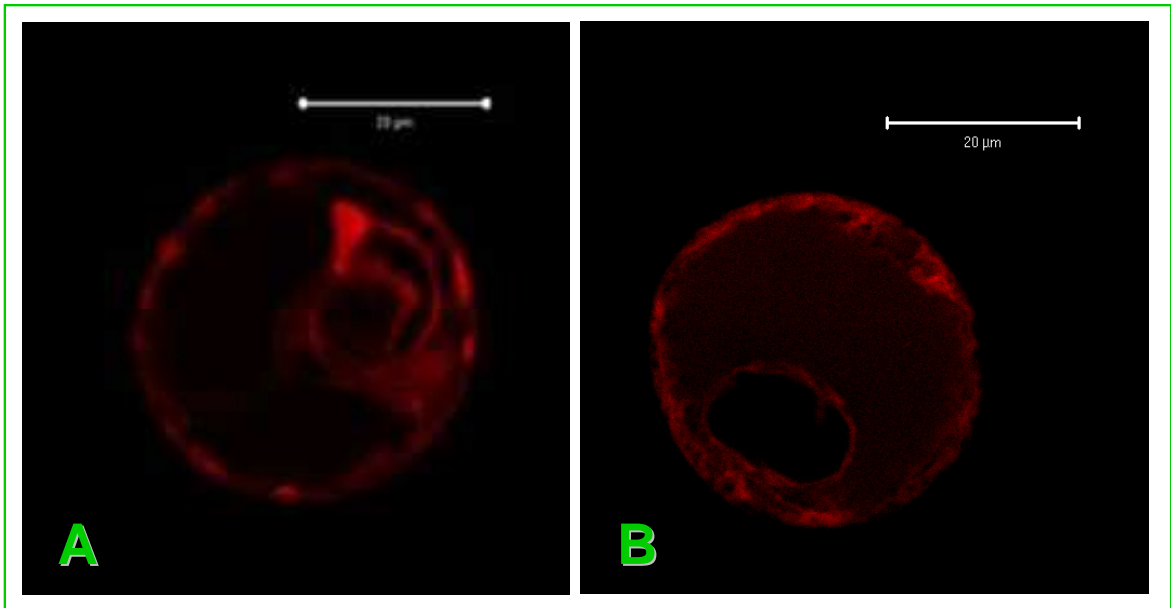


Fig. 32. Confronto tra protoplasti di *A. annua* ottenuti da cellule in sospensione (A) o da foglie (B) trasformati con il costrutto RFP-KDEL, barra= 20 µm.

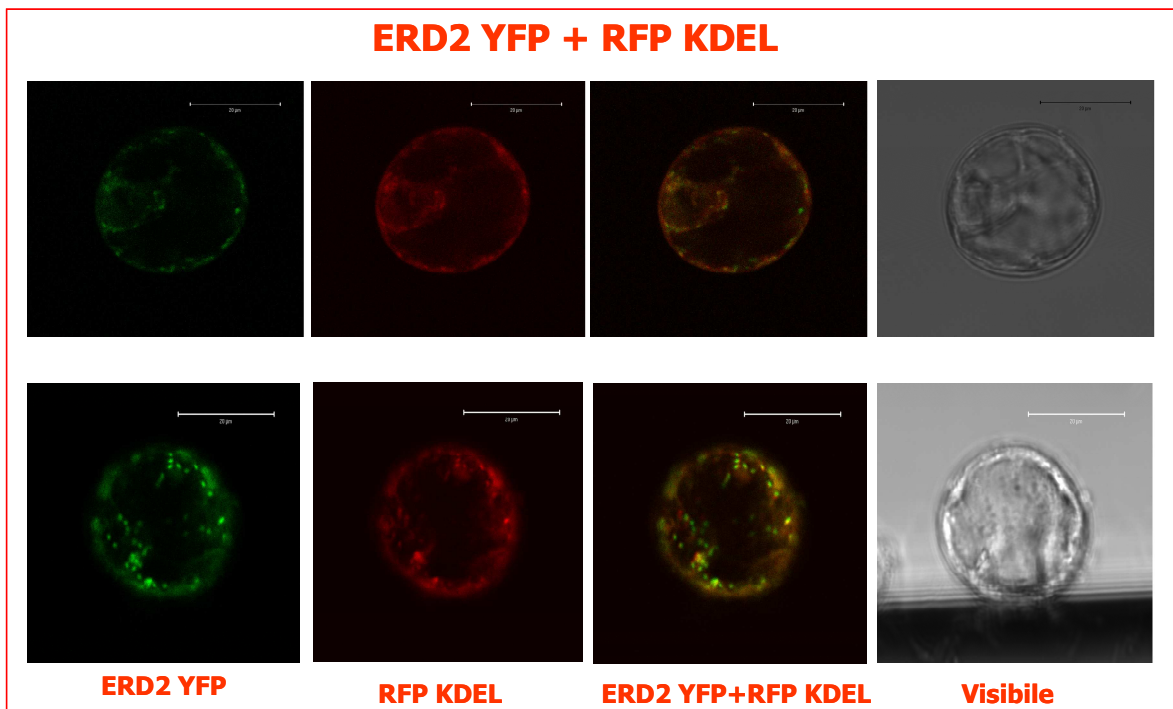


Fig. 33. Sezione confocale di protoplasti di *Artemisia annua* L., trasformati con i costrutti ERD2-YFP e RFP-KDEL, barra= 20 µm.

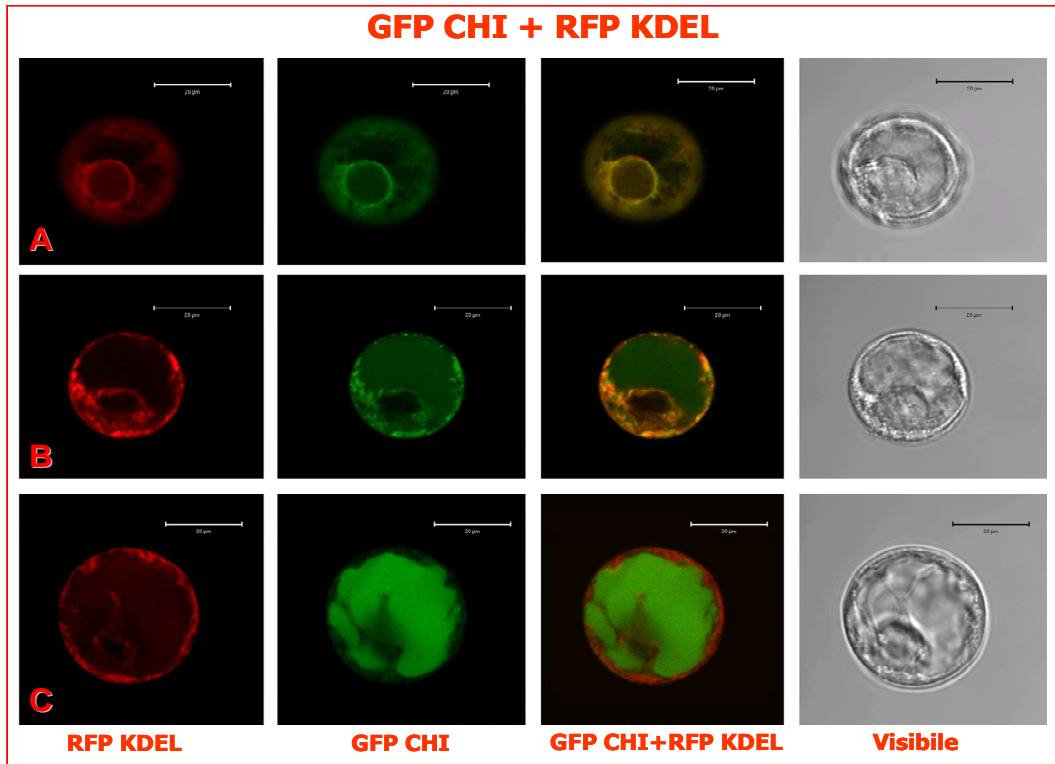


Fig. 34. Sezione confocale di protoplasti di *Artemisia annua* L., trasformati con i costrutti GFP CHI e RFP KDEL, barra= 20 µm.

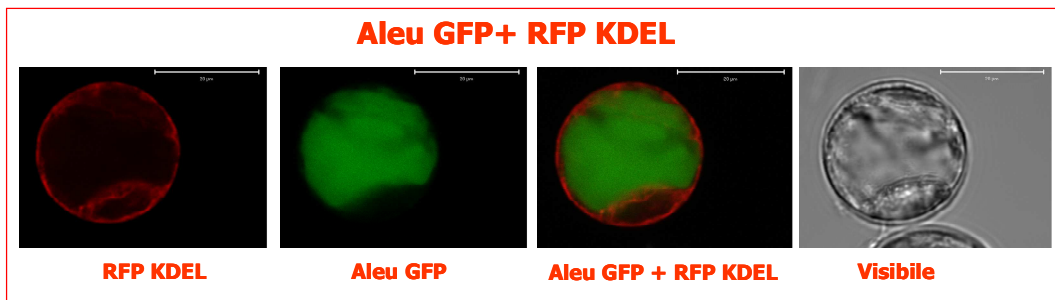


Fig. 35 Sezione confocale di protoplasti di *Artemisia annua* L., trasformati con i costrutti Aleu-GFP e RFP KDEL, barra= 20 µm.

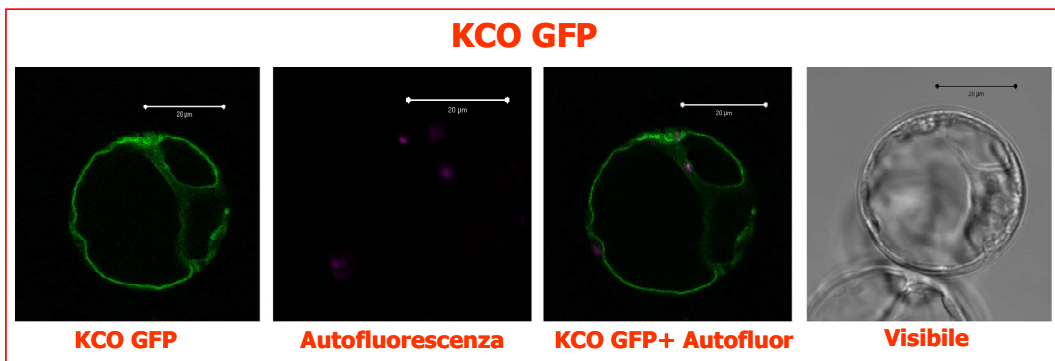


Fig. 36. Sezione confocale di protoplasti di *Artemisia annua* L., trasformati con il costrutto KCO1-GFP, in viola l'autofluorescenza dei cloroplasti; barra= 20 µm.

FATTORI DI TRASCRIZIONE WRKY

In questo lavoro sono stati condotti esperimenti per identificare geni codificanti fattori di trascrizione di tipo WRKY in *Artemisia annua*.

È stata disegnata una coppia di primer degenerati sulla base delle sequenze amminoacidiche conservate del fattore di trascrizione di cotone *GaWRKY1* (Xu *et al.*, 2004). È stato selezionato un primer nel dominio *leucine-zipper* e uno nella regione WRKY. I primer sono stati utilizzati per amplificare la regione corrispondente in campioni di cDNA ottenuti a partire da RNA estratto da foglie di *A. annua*. È stato ottenuto un prodotto di PCR di 340 bp, che è stato clonato nel vettore plasmidico PGEM T-easy e quindi utilizzato per la trasformazione batterica. Sono state analizzate le sequenze dei vettori ricombinanti e l'omologia di sequenza utilizzando il programma BLAST. L'analisi ha confermato che si trattava di un possibile gene WRKY di *Artemisia annua*, sul quale sono state disegnate coppie di primer specifici.

I risultati hanno permesso di identificare un prodotto di amplificazione di 850 bp mediante la tecnica *Race 3'* e un frammento di 450 bp mediante *Race 5'* che sono stati isolati, clonati in un plasmide e analizzati a livello di sequenza nucleotidica. Il confronto con le sequenze disponibili in banche dati ha evidenziato in maniera inequivocabile che il prodotto di amplificazione isolato corrispondeva ad un cDNA WRKY di 1278 nucleotidi e 324 aminoacidi. La sequenza denominata *AaWRKY3* conteneva un dominio WRKY, un dominio *zing-finger* e uno *leucine zipper*.

La sequenza di *AaWRKY3* è stata utilizzata per creare un costrutto chimerico con *tag* fluorescente: WRKY-GFP. Il costrutto WRKY-GFP è stato ottenuto fondendo la sequenza WRKY con l'estremità N-terminale di GFP sotto il controllo del promotore forte 35S. Come già descritto nella sezione precedente, protoplasti di cellule in sospensione sono stati trasformati transientemente con il nuovo costrutto, da solo o in co-espressione con il marcatore del RE, RFP-KDEL.

Il costrutto WRKY-GFP si localizzava specificamente nel nucleo, così come tutti i fattori di trascrizione (Fig. 37 B e C). Come controllo è stata utilizzata la GFP citosolica che marca il citosol così come il nucleo senza distinzione (Fig. 37 A).

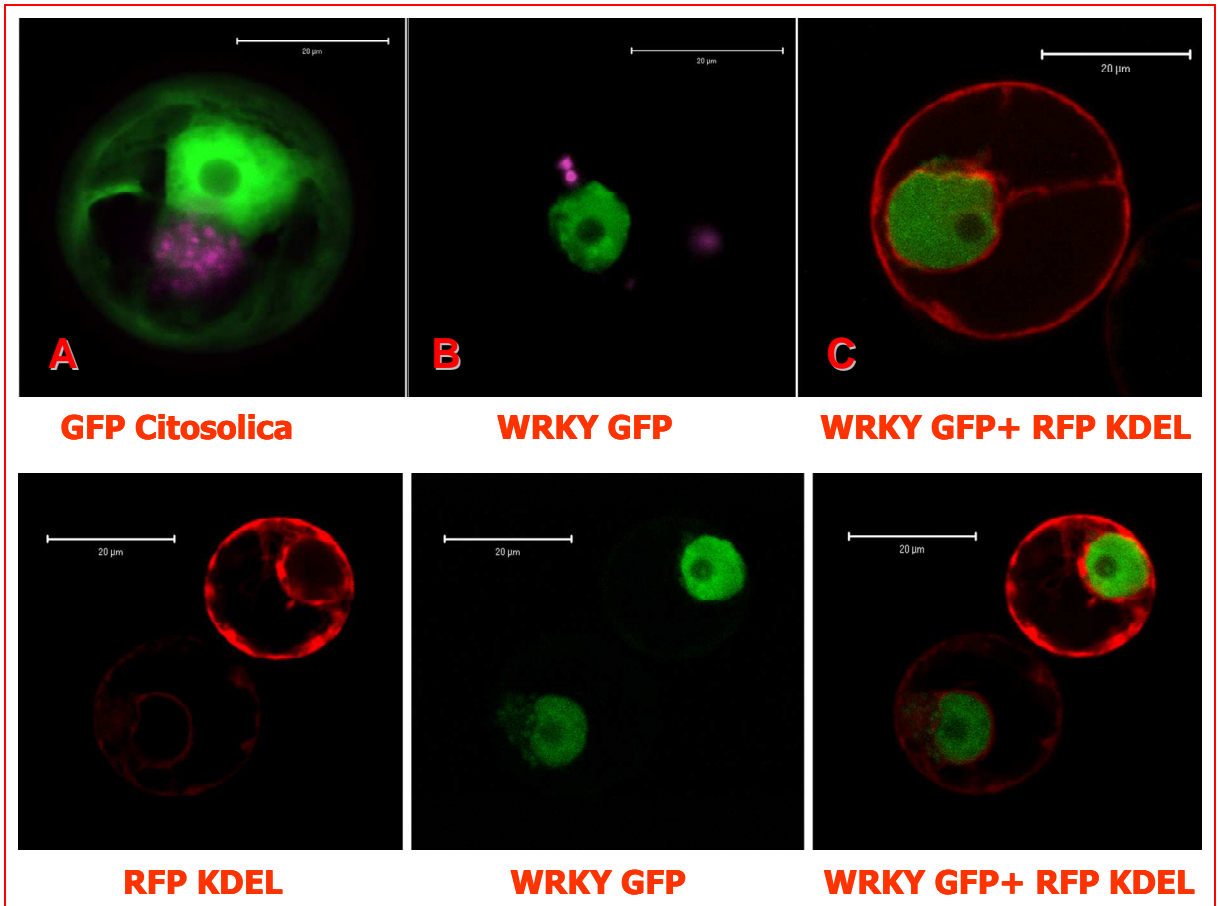


Fig. 37. Osservazione al microscopio confocale del costrutto WRKY-GFP (B) e della cotrasformazione con WRKY-GFP e RFP-KDEL (C). IL costrutto GFP citosolico è utilizzata come controllo (A), in viola l'autofluorescenza dei cloroplasti; barra= 20 µm.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La malaria è una malattia febbrile acuta causata da quattro specie diverse di un protozoo del genere *Plasmodium*. In particolare il *Plasmodium falciparum*, è la specie che provoca la forma più grave di malaria, responsabile del maggior numero di decessi. Per più di 350 anni questa malattia è stata trattata con chinino e farmaci chinino-derivati. Negli anni alcuni ceppi di *P. falciparum* hanno sviluppato una farmaco-resistenza al chinino. E' risultato, quindi, necessario sviluppare nuovi farmaci più efficaci da utilizzare nella terapia antimalarica. Un trattamento alternativo, efficace e sicuro, contro la malaria è rappresentato dall'artemisinina, un principio attivo estratto da una pianta medicinale cinese, *Artemisia annua* L.

L'artemisinina attualmente disponibile non riesce però a soddisfare la richiesta del mercato internazionale poiché la principale fonte di questo composto sono le piante in campo, che sono soggette a variazioni stagionali e infestazioni di patogeni. La produzione di artemisinina risulta perciò ancora notevolmente costosa, vista la scarsa quantità di molecola presente nella pianta e il periodo piuttosto limitato della sua presenza nella pianta stessa. Inoltre l'estrazione richiede un'attenta separazione cromatografica dagli altri costituenti dell'estratto vegetale. D'altra parte la sintesi chimica di artemisinina, a causa della sua complessa struttura, risulta difficile da ottenere, con costi elevati e resa bassa. Per tutti questi motivi molte risorse vengono investite per aumentare la produzione di artemisinina *in planta* attraverso le biotecnologie.

Le colture *in vitro* offrono la possibilità di utilizzare le cellule vegetali come "bio-fabbriche", per la produzione industriale di metaboliti vegetali, risolvendo non solo il limite delle basse rese, ma anche quello dovuto alla stagionabilità delle piante. Inoltre le colture *in vitro* permettono di studiare il metabolismo cellulare in condizioni controllate.

La produzione di artemisinina in colture *in vitro* di *Artemisia annua* L. potrebbe rappresentare una valida alternativa alla produzione di questo principio attivo in piante coltivate anche se attualmente risulta ancora un sistema economicamente poco vantaggioso (Covello, 2008).

In questo lavoro sono state messe a punto colture *in vitro* di *Artemisia annua* L., quali calli cresciuti su terreni con diverse combinazioni ormonali e diverse linee di cellule in sospensione. Una linea cellulare in particolare si è rilevata in grado di produrre

artemisinina sia a livello intracellulare che extracellulare. La produzione di artemisinina extracellulare potrebbe essere dovuto alla lisi cellulare, che in misura limitata avviene naturalmente nelle cellule cresciute in beute e la conseguente dispersione dei metaboliti nel mezzo di coltura. D'altra parte la produzione extracellulare potrebbe esser dovuta a un rilascio attivo di artemisinina dalle cellule nel mezzo di coltura; a conferma di questa ipotesi i livelli di artemisinina extracellulare aumentavano durante il ciclo di subcoltura parallelamente all'aumento della biomassa. Ulteriori indagini saranno necessarie per chiarire definitivamente l'origine dell'artemisinina nel mezzo. È interessante notare che la produzione di artemisinina intracellulare nelle sospensioni cellulari, espressa come $\mu\text{g/L}$, mostrava un aumento graduale durante il ciclo di subcoltura, al contrario, il contenuto di artemisinina intracellulare, espresso come $\mu\text{g/g PS}$ non ha mostrato variazioni significative. Questi risultati indicano che la capacità biosintetica di queste cellule non subiva variazioni significative durante il ciclo di subcoltura. Proprio la capacità biosintetica costante rendeva queste colture *in vitro* di *Artemisia annua* uno strumento particolarmente idoneo per valutare i diversi effetti provocati dagli elicitori sulla produzione di artemisinina.

Gli elicitori sono sostanze che aggiunte in piccole concentrazioni alle colture *in vitro* aumentano la biosintesi di specifici metaboliti secondari. L'acido jasmonico e il suo metile, metil jasmonato, aggiunti alle sospensioni cellulari stimolano la produzione di numerosi metaboliti secondari in pianta (Pauwels *et al.*, 2008).

Il miconazolo è un antifungino, che inibisce la via di sintesi degli steroli e indirizza il flusso del carbonio verso il *pathway* dei terpenoidi (Kudakasseril *et al.*, 1987). Towler ha riportato che il trattamento con miconazolo induceva un aumento significativo della produzione di artemisinina in piantine di *A. annua* (Towler e Weathers, 2007). In questo lavoro le cellule in sospensione sono state utilizzate per studiare gli effetti degli elicitori biotici e abiotici sulla produzione di artemisinina e per chiarire l'effetto degli elicitori abiotici sull'espressione dei geni coinvolti nel *pathway* di espressione dell'artemisinina.

Il metil jasmonato stimola la produzione di numerosi metaboliti secondari a basso peso molecolare che sono coinvolti in numerose risposte nella pianta. Molti esperimenti *in planta* mostrano che l'aggiunta esogena di metil jasmonato (MeJA) aumenta l'espressione di geni di svariati *pathway* biosintetici (Pauwels *et al.*, 2008). Nelle sospensioni cellulari di *Artemisia annua* allestite in questo lavoro, è stato osservato che l'aggiunta di MeJA provocava un aumento dei livelli di artemisinina subito dopo l'inizio del trattamento, indicando una risposta positiva delle cellule a questo elicitore. Effetti simili sono stati

riportati in colture *hairy roots* di *A. annua* trattate con acido jasmonico (Putalun *et al.*, 2007). Nel nostro sistema, parallelamente all'incremento dei livelli di artemisinina in cellule in sospensione, si è notato un aumento di espressione del gene *CYP71AV1* (*citocromo P450 monoossigenasi*) in risposta al trattamento con MeJA. Questo gene, che codifica per una *monoossigenasi*, catalizza l'ossidazione in tre step *dall'amorfa 4,11 diene* ad acido artemisinico (Teoh *et al.*, 2006). Il *time course* della produzione di artemisinina aveva lo stesso andamento del profilo d'espressione del gene *CYP71AV1*. Questo suggerisce che l'effetto di elicitazione del MeJA sulla produzione potrebbe esser dovuto alla sovraespressione di questo gene. D'altra parte i geni *Dbr2* (*aldeide artemisinica Δ11(13) reduttasi*) e *CPR* (*citocromo P450 reduttasi*), non hanno subito variazione d'espressione durante il trattamento con MeJA. Quindi il gene *CYP71AV1*, essendo regolato a livello trascrizionale dal MeJA, potrebbe essere il candidato ideale nelle strategie di ingegneria metabolica per aumentare i livelli di artemisinina (Caretto *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda il trattamento con miconazolo, le sospensioni cellulari elicitate con miconazolo 200 μM hanno mostrato un aumento graduale di artemisinina. Bisogna osservare che tale trattamento ha però avuto effetti negativi sulla vitalità cellulare. D'altra parte concentrazioni più basse e quindi meno tossiche di miconazolo hanno indotto soltanto un leggero aumento di artemisinina, che potrebbe esser dovuto all'effetto del solvente DMSO. L'incremento di artemisinina indotto dal DMSO è stato riportato anche da Towler e Weathers (2007).

L'analisi di espressione ha mostrato che il trattamento con miconazolo 200 μM non aveva effetto sul gene *CYP71AV1*, mentre i geni *Dbr2* e *CPR* subivano un aumento di espressione rispettivamente dopo 30 min e 4 ore (Fig. 31). Dal momento che la regolazione dei geni non sembrava correlata con l'aumento di artemisinina osservato dopo lunghi trattamenti, si può ritenere che il miconazolo induca un aumento di artemisinina che potrebbe essere indipendente dall'attivazione trascrizionale dei geni della via biosintetica (Caretto *et al.*, 2009). Letteratura recente indica che gli ultimi passaggi della via biosintetica dall'acido artemisinico all'artemisinina siano dovuti ad una autossidazione spontanea indipendente da catalisi enzimatica (Brown e Sy, 2004). Condizioni di stress che coinvolgono la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), potrebbero aumentare questa trasformazione spontanea (Pu *et al.*, 2009). Il trattamento con miconazolo inducendo danni cellulari che aumentano i livelli di ROS nelle cellule potrebbe favorire questa trasformazione spontanea (Kobayashi *et al.*, 2002). Sarebbe interessante valutare il

ruolo dei ROS in colture in sospensioni di *A. annua* per individuare nuove delle strategie per aumentare la produzione di artemisinina.

Nelle colture cellulari in sospensione non è stato possibile osservare l'espressione del gene *ADS*, primo gene della via biosintetica, nonostante diversi tentativi, forse a causa del basso livello di espressione del gene stesso in cellule in sospensione. D'altra parte Wallaart nel 2001 ha riportato l'impossibilità di trovare l'espressione del gene *ADS* in piantine di *Artemisia annua* che non avevano subito nessuno stress. Sembra quindi necessario fare ulteriore chiarezza sul ruolo del gene *ADS* nelle colture in sospensione di *Artemisia annua*. Alcuni elicitori, definiti biotici, come i funghi, aumentano la produzione di metaboliti secondari quando somministrati alle sospensioni cellulari. Nel nostro sistema tra i diversi estratti fungini testati, l'estratto di *Penicillium verrucosum* ha indotto un aumento di artemisinina nelle cellule in sospensione di *Artemisia annua*. Sarebbe interessante valutare le eventuali variazioni dell'espressione dei geni della via biosintetica indotte dal trattamento con l'estratto fungino.

La produzione di terpenoidi risulta difficile da visualizzare in cellule in sospensione, con tecniche di osservazione diretta. Nel corso di questa tesi è stato messo a punto un metodo di colorazione con il reagente NADI, che colora di blu-violetto i terpeni e quindi può evidenziare la presenza di artemisinina. Tale colorazione, benché potenzialmente utile, è comunque relativamente imprecisa e non dà conto della reale identità delle strutture evidenziate.

Allo scopo di disporre di un sistema cellulare pienamente manipolabile con le più recenti tecniche di studio "in vivo", in questo lavoro di tesi è stato messo a punto un protocollo di isolamento e trasformazione di protoplasti sia da cellule in sospensione sia da piantine micropropagate di *Artemisia annua*. I protoplasti hanno il vantaggio, rispetto alle cellule in sospensione, di non avere la parete cellulare e quindi di poter essere agevolmente trasformati con geni esogeni o colorati con numerosi marcatori vitali, per consentire una migliore visualizzazione al microscopio permettendo una puntuale analisi citologica durante le fasi di elicitazione dei processi di interesse. In prospettiva, sarebbe interessante indagare sui legami possibili tra biosintesi e trasporto/accumulo di artemisinina, monitorando i cambiamenti subcellulari delle endomembrane nelle cellule in coltura quando elicitate per l'induzione dell'artemisinina. I risultati raggiunti in questa tesi forniscono le basi per questi esperimenti. Prima di tutto è stato verificato la possibilità di effettuare l'analisi subcellulare delle endomembrane e dei compartimenti delle colture in sospensione ed in secondo luogo è stata verificata la possibilità di esprimere fattori di

trascrizione con una corretta localizzazione nucleare, coinvolti nel *pathway* dell'artemisinina. Sono state visualizzate tutte le parti essenziali del sistema di secrezione: il reticolo endoplasmatico i ditirosomi del Golgi, il vacuolo litico ed i compartimenti provacuolari, il vacuolo neutro e il tonoplasto. I marcatori con GFP hanno mostrato il *pattern* atteso anche nel caso di colocalizzazione tra i diversi costrutti ed il marcatore del reticolo endoplasmatico ottenuto con RFP (Hanton e Brandizzi 2006, Uemura *et al.*, 2004). Un altro aspetto della ricerca è stato quello di identificare geni codificanti fattori di trascrizione in grado di influenzare la biosintesi di terpenoidi e nello specifico dell'artemisinina. In particolare l'attenzione è stata focalizzata sulla famiglia di fattori di trascrizione WRKY. I fattori di trascrizione WRKY (così chiamati per la presenza di una sequenza amminoacidica wrky) hanno la capacità di regolare l'espressione di molti geni coinvolti nelle risposte delle piante a diversi stimoli o stress ambientali (Eulgem *et al.*, 2000); inoltre, sono in grado di influenzare diversi geni coinvolti in processi fisiologici delle piante come lo sviluppo dei tricomi e la senescenza (Johnson *et al.*, 2002). Nel 2004 è stato isolato in cotone un fattore di trascrizione WRKY (*GaWRKY1*) che mostrava di avere un ruolo nella regolazione di una *sesquiterpene ciclasi* (Xu *et al.*, 2004). Recentemente Ma e collaboratori hanno isolato in *Artemisia annua* il primo fattore di trascrizione WRKY (*AaWRKY1*) e hanno suggerito come questo fattore di trascrizione regoli la via biosintetica dell'artemisinina riuscendo a modulare il promotore del gene *amorfa diene sintasi*. Gli stessi autori hanno isolato un altro fattore di trascrizione WRKY in *Artemisia annua* *AaWRKY2* (Ma *et al.*, 2009). In questo lavoro è stato identificato e caratterizzato un nuovo fattore di trascrizione WRKY in *Artemisia annua*, denominato *AaWRKY3*, che potrebbe avere un ruolo nella regolazione della biosintesi dell'artemisinina. Per indagare sull'espressione di *AaWRKY3*, il gene è stato utilizzato per creare un costrutto chimerico con *tag* fluorescente: WRKY:GFP. L'analisi confocale dei protoplasti trasformati con il costrutto WRKY:GFP ha confermato la sua identità di fattore di trascrizione mostrando la corretta localizzazione specifica all'interno del nucleo. Sarebbe interessante valutare l'effetto della sua espressione sulla produzione di artemisinina in colture cellulari in sospensione di *A. annua*.

Il connubio tra la trasformazione dei protoplasti e l'uso di proteine con *tag* fluorescenti apre prospettive incoraggianti per lo studio, anche in cellule di artemisia, della distribuzione degli enzimi coinvolti nella sintesi del principio attivo artemisinina e delle proteine coinvolte nel processo di accumulo.

Concludendo, i risultati presentati in questo lavoro indicano che le colture in sospensione di *Artemisia annua* rappresentano un sistema particolarmente utile per studiare gli effetti di elicitori chimici e biotici sulla modulazione della produzione di artemisinina e per studiare la regolazione della via biosintetica di questo importante antimalarico.

BIBLIOGRAFIA

Abdin M.Z., Israr M., Rehman R.U., Jsin S.K. (2003). "Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production". *Planta Med* 69: 289-299.

Acton N., Klayman D.L. (1985). "Artemisitene, a new sesquiterpene lactone endoperoxide from *Artemisia annua*". *Planta Med* 5: 441 – 442.

Bertea C.M., Freije J.R., Van der Woude H. (2005). "Identification of intermediates and enzymes involved in the early steps of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*". *Planta Med* 71: 40-47.

Bisoffi Z., Marocco S., Monteiro G. (2006). "Malaria". In Scaglia M., Gatti S., Rondanelli E.G., (eds), *Parassiti e parassitosi umane. Dalla clinica al laboratorio*". *Selecta medica, IT*; 23-58.

Bouwmeester H.J., Wallaart T.E., Janssen M.H., van Loo B., Jansen B.J., Posthumus M.A., Schmidt C.O., de Kraker J.W., Konig W.A., Franssen M.C. (1999). "*Amorpha-4,11-diene synthase* catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis". *Phytochemistry* 52: 843-854.

Brandizzi F., Fricker M., Hawes C. (2002). "A greener world: the revolution in plant bioimaging". *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 520-530.

Brown G.D., Sy L.K. (2004). "In vivo transformations of dihydroartemisinic acid in *Artemisia annua* L. plants". *Tetrahedron* 60: 1139-1159.

Butler D., Maurice J., O'Brien C. (1997). "Time to put malaria control on the global agenda". *Nature* 386: 535-540.

Campbell R.E., Tour O., Palmer A.E., Steinbach P.A., Baird G.S., Zacharias, D.A., Tsien R.Y. (2002). "A monomeric red fluorescent protein". P. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 7877-7882.

Caretto S., Quarta A., Durante M., Nisi R., De Paolis A., Blando F., Mita G. (2009). "Methyl jasmonate and miconazole differently affect artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua* suspension cultures". Plant Biology in press.

Castilho P.C., Gouveia I.S.C., Rodrigues A.I. (2008). "Quantification of Artemisinin in *Artemisia annua* extracts by ¹H-NMR". Phytochemical Analysis 19: 321-334.

Charles D.J., Simon J.E., Wood K.V., Heinstein P. (1990). "Germplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extracts". J Nat Prod 53: 157-160.

Cheng Y.Q, Chen H.L, Fan L.Y, Chen X.G, Hu Z.D. (2004). "On line conversion and determination of artemisinin and its kinetic parameters using orthogonal design by coupling of flow injection with capillary electroforesis". Analitica Chimica Acta 525: 239-245.

Covello P.S. (2008). "Making artemisinin". Phytochemistry 69: 2881-2885.

Covello P.S., Teoh K.H., Polichuck D.R., Reed D.W., Nowak G. (2007). "Functional genomics and biosynthesis of artemisinin". Phytochemistry 68: 1864-71.

David R., Carde J.P. (1964). "Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif NADI". Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 258: 1338-1340.

De Domenico S., Bonsegna S., Di Sansebastiano G.P., Santino A. (2009). "Localisation of seed oil bodies proteins in tobacco protoplasts reveals specific mechanisms of protein targeting to leaf lipid bodies". In preparazione.

De Kraker J.W., Scurink M., Franssen M.C.R., König W.A., de Groot A., Bouwmeester H.J. (2003). "Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots". *Tetrahedron* 59: 409-418.

Delabays N., Simonnet X., Gaudin M. (2001). "The genetics of artemisinin content in *Artemisia annua* L and the breeding of high yielding cultivars". *Curr Med Chem* 8: 1795-1801.

Di Sansebastiano G.P., Paris N., Marc-Martin S., Neuhaus J.M., (2001). "Regeneration of a lytic central vacuole and of neutral peripheral vacuoles can be visualized by green fluorescent proteins targeted to either type of vacuoles". *Plant Physiol* 126: 78-86.

Di Sansebastiano G.P., Paris N., Marc-Martin S., Neuhaus J.M. (1998). "Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway". *Plant J* 15: 449-57.

Dondorp A., Nosten F., Stepniewska K., Day N., White N. (2006). "Artesunate versus quinine for treatment of severe *falciparum* malaria: a randomised trial". *Lancet* 9487: 717-725.

Duke M.V., Paul R.N., ElSohly H.N., Sturtz G., Duke S.O. (1994). "Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L.". *Int J Plant Sci* 155: 365-372.

Duke S.O., Paul R.N. (1993). "Development and fine structure of glandular trichomes of *Artemisia annua* L.". *Int J Plant Sci* 154: 107-118.

Efferth T. (2006) "Molecular pharmacology and pharmacogenomics of artemisinin and its derivatives in cancer cells". *Curr Drug Targets* 7: 407-421.

Eulgem T., Rushton P.J., Robatzek S., Somssich I.E., (2000). "The WRKY superfamily of plant transcription factors". *Trends Plant Sci.* 5: 199-206.

Ferreira J.F.S., Janick J. (1995). "Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes". *Int J Plant Sci* 156: 807-815.

Ferreira J.F.S., Laughlin J.C., Delabays N., de Magalhaes P.M. (2005). "Cultivation and genetics of *Artemisia annua* L. for the increased production of the antimalarial artemisinin." *Plant Genetic Resources* 3: 206-229.

Fluckiger R., De Caroli M., Piro G., Dalessandro G., Neuhaus J.M., Di Sansebastiano G.P.(2003). "Vacuolar system distribution in Arabidopsis tissues, visualized using GFP fusion proteins". *J Exp Bot* 54: 1-8.

Geng S, Ma M, Ye HC, Liu BY, Li GF, Kang C (2001). "Effect of ipt gene expression on the physiological and chemical characteristics of *Artemisia annua* L". *Plant Sci* 160: 691-698.

Han J.L., Liu B.Y., Ye H.C., Wang H., Li Z.Q., Li G.F. (2006) "Effect of overexpression of the endogenous farnesyl diphosphate synthase on the artemisinin content in *Artemisia annua*". *J Integr Plant Biol* 48 :482-487.

Han J.L., Wang H., Ye H.C., Liu Y., Li Z., Zhang Y., Zhang Y., Yan F., Li G., (2005). "High efficiency of genetic transformation and regeneration of *Artemisia annua* L. via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated procedure". *Plant Sci* 168: 73-80.

Hanton S.L, Brandizzi F.(2006). "Fluorescent proteins as markers in the plant secretory pathway". *Microsc Res Tech* 69: 152-159.

Haseloff J., Siemering R.K., Prasher D.C., Hodge S. (1997). "Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly". *P Natl Acad Sci USA* 94: 2122-2127.

Haynes R.K., Vonwiller S.C. (1991). "The development of new peroxidic antimalarials". *Chem Aust* 64-67.

Jaziri M., Diallo B., Vanhaelen M., Homès J., Yoshimatsu K., Shimonura K. (1993). "Immunodetection of artemisinin in *Artemisia annua* cultivated in hydroponic conditions". *Phytochemistry* 33: 821-826.

Johnson C.S., Kolevski B, Smyth D.R. (2002). "TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of Arabidopsis, encodes a WRKY transcription factor". *Plant Cell* 14: 1359- 1375.

Kamchonwongpaisan S., Vanitcharoen N., Yuthavong Y. (1992) "The mechanism of action of artemisinin (qinghaosu)". In: Ong A.S.H, Packer L. (eds), *Lipids-soluble antioxidants: biochemistry and clinical applications*, Basel, Birkhauser; 363 – 372.

Klayman D.L. (1985) "Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China". *Science* 228: 1049-1055.

Klayman D.L. (1993). "*Artemisia annua*: from weed to respectable antimalarial plant". In: Kinghorn A.D., Balandri M.F. (eds), *Human Medicinal Agents from plants*. American Chemical Society, Washington, DC; 242-255.

Kobayashi D., Kondo K., Uehara N., Otokozawa S., Tsuji N., Yagihashi A., Watanabe N. (2002). "Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect." *Antimicrob Agent Ch* 46: 3113-3117.

Kudakasseril G.J., Lam L., Staba E.J. (1987). "Effect of sterol inhibitors on the incorporation of ¹⁴C isopentenyl pyrophosphate into artemisinin by a cell-free system from *Artemisia annua* tissue cultures and plants". *Planta Med* 53: 280-284.

Liu B.Y., Ye H.C., Li G.F. (1998). "Studies on dynamic of growth and artemisinin biosynthesis of hairy root of *Artemisia annua* L.". *Chin J Biotechnol* 14: 401-404.

Liu C.Z., Guo C., Wang Y.C., Ouyang F. (2002). "Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L". *Process Biochem* 38: 581-585.

Liu J.M., Ni M.Y., Fan J.F., Tu Y.Y., Wu Z.H., Wu Y.L., Chou W.S. (1979). "Structure and reaction of arteannuin". *Acta Chim Sinica* 37: 129-143.

Lommen W.J., Schenk E., Bouwmeester H.J., Verstappen F.W. (2005). "Trichome dynamics and artemisinin accumulation during development and senescence of *Artemisia annua* leaves". *Planta Med* 72: 336-345.

Luo X.D., Shen C.C., (1987). "The chemistry, pharmacology, and clinical applications of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives". *Med Res Rev* 7: 29-52.

Ma D., Pu G., Lei C., Ma L., Wang H., Guo Y., Chen J., Du Z., Wang H., Li G., Ye H., Liu B. (2009). "Isolation and characterization of AaWRKY1, an *Artemisia annua* transcription factor that regulates the amorpha-4,11-diene synthase gene, a key gene of artemisinin biosynthesis". *Plant Cell Physiol.* 50: 1-16.

Martin V.J.J., Pitera D.J., Withers S.T., Newman J.D., Keasling J.D. (2003). "Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids". *Nat Biotechnol* 21: 796-802.

Meshnick S.R. (1994). "The mode of action of antimalarial endoperoxides". *T Roy Soc Trop Med H* 88 (Suppl 1): 31-32.

Miyawaki A., Llopis J., Heim R., McCaffery J.M., Adams J.A. (1997). "Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin". *Nature* 388: 882-87.

Murashige T., Skoog F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture". *Physiol Plantarum* 15: 473-497.

Paniego N.B., Giulietti A.M. (1996). "Artemisinin production by *Artemisia annua* L. transformed organ cultures". *Enzyme Microb Tech* 18: 526-530.

Panossian L.A., Garga N.I., Pelletier D. (2005). "Toxic brainstem encephalopathy after artemisinin treatment for breast cancer". *Annals Neurol* 58: 812-813.

Pauwels L., Morreel K., De Witte E., Lammertyn F., Van Montagu M., Boerjan W., Inzé D., Goossens A. (2008). “Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells”. *PNAS* 105: 1380-1385.

Posner G., Oh C.H. (1992). “A regioselectively oxygen-18 labelled 1,2,4-Trioxane: a simple chemical model system to probe the mechanisms for the antimalarial activity of artemisinin (Qinghaosu)”. *J Am Chem Soc* 114: 8328 – 8329.

Pu Gb., Ma D.M., Chen J.L., Ma L.Q., Wang H., Li G.F., Ye H.C., Liu B.Y. (2009). “Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L”. *Plant Cell Rep* 28: 1127-1135.

Putalun W, Luealon W, De-Eknamkul W, Tanaka H, Shoyama Y. (2007). “Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L”. *Biotechnol Lett* 29: 1143-1146.

Ranashige A., Sweatlock J.D., Cooks R.G. (1993). “A rapid screening method for artemisinin and its congeners using MS/MS: search for new analogues in *Artemisia annua* L.”. *J Nat Prod* 56: 552- 563.

Rehman R.U., Stigliano E., Lycett G.W., Sticher L., Sbrana F., Faraco M., Dalessandro G., Di Sansebastiano G.P. (2008). “Tomato rab11a characterization evidenced a difference between SYP121-dependent and SYP122-dependent exocytosis”. *Plant cell physiol* 49: 751-766.

Ro D.K., Paradise E.M., Ouellet M., Fisher K.J., Newman K.L., Ndungu J.M., Ho K.A., Eachus R.A., Ham T.S., Kirby J., Chang M.C.Y., Withers S.T., Shiba Y., Sarpong R., Keasling J.D. (2006). “Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast”. *Nature* 440: 940-943.

Sa, Mi, He-Chun, Ben-ye, GuoFeng-Kang (2001) “Effects of *ipt* gene expression on the physiologic and chemical characteristics of *Artemisia annua* L.”. *Plant Sci* 4: 691-698.

Scarpa G.M., Fusco B.M., Barbina G.G., D'Onofrio G., Costagiu M., Kriaa D. (2009). "Utilizzo delle colture *in vitro* per la produzione di metaboliti secondari". *Italus Hortus* 16: 184-188.

Schimid G., Hofheinz W. (1983). "Total synthesis of qinghaosu". *J Am Chem Soc* 105: 624.

Singh N.P., Lai H.C. (2004). "Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells". *Anticancer Res* 24: 2277-2280.

Smetanska I. (2008). "Production of secondary metabolites using plant cell cultures". *Adv Biochem Eng Biotechnol* 111: 187-228.

Smith T.C, Wheaters P.J, Cheethman R.D. (1997). "Effect of gibberellic acid on hairy root culture of *Artemisia annua*: growth and artemisinin production". *In vitro Cell Dev B* 33: 75-79.

Souret F.F., Kim Y., Wyslouzil B., Wobbe K.K., Weathers P.J. (2003). "Scale- Up of *Artemisia annua* L. hairy Root Cultures Produces Complex Patterns of Terpenoid Gene Expression". *Biotechnol Bioeng* 83: 653-667.

Teoh K.H., Polichuk D.R., Reed D.W., Nowak G., Covello P.S. (2006). "*Artemisia annua* L. (*Asteraceae*) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin". *Febs Lett* 580: 1411-1416.

Towler M.J., Weathers P.J. (2007). "Evidence of artemisinin production from IPP stemming from both the mevalonate and non mevalonate pathways". *Plant Cell Rep* 26: 2129-2136.

Uemura T., Ueda T., Ohniwa R.L., Nakano A., Takeyasu K., Sato M.H. (2004). "Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the post-Golgi network in plant cells". *Cell Struct Funct* 29: 49-65.

Vasil V., Hildebrandt A.C. (1965). "Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures". *Science* 150: 889-892.

Vennerstrom J.L., Arbe-Barnes S., Brun R., Charman S.A., Chiu F.C.K., Chollet J., Dong Y., Dorn A., Hunziker D., Matile H., McIntosh K., Padmanilayan M., Tomas J.S., Sheurer C., Scorneaux B., Tang Y., Urwyler H., Wittlin S., Charman W.N. (2004). "Identification of an antimalarial synthetic triloxane drug development candidate". *Nature* 430: 900-904.

Verweij W., Spelt C., Di Sansebastiano G.P., Vermeer J., Reale L., Ferranti F., Koes R., Quattrocchio F., (2008). "An H⁺ P-ATPase on the tonoplast determines vacuolar pH and flower colour". *Nat Cell Biol* 10: 1456-1562.

Wallaart T.E., Van Uden W., Lubberik H.G.M. (1999). "Isolation and identification of dihydroartemisinic acid from *Artemisia annua* L. and its possible role in biosynthesis of artemisinin". *J Nat Prod* 62: 430-433.

Wang C.W. (1961). "The forest of China, with a survey of grassland and desert vegetations". Harvard University Maria Moors Cabot Foundation Harvard University Cambridge, MA; 5: 171- 187.

Wang H., Ye H.C., Chong K., Liu B.Y., Li G.F. (2004). "Studies on the effects of *fpfl* gene on *Artemisia annua* flowering time and on the linkage between flowering and artemisinin biosynthesis". *Planta Med* 70: 347-352.

Wang Y.C, Zhang H.X, Zhao B., Yuan X.F. (2001). "Improved growth of *Artemisia annua* L. hairy roots and artemisinin production under red light conditions". *Biotechnol Lett* 23: 1971-1973.

Wang Y.P., Weathers P.J. (2007). "Sugar proportionately affect artemisinin production". *Plant Cell Rep* 26: 1073-1081.

Weathers P.J, Bunk G., Mccoy M.C. (2005). “The effect of phytohormones on growth and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots”. *In Vitro Cell Dev Pl* 41:47-53.

Weathers P.J., DeJesus-Gonzalez L., Kim Y.J., Souret F.F., Towler M.J. (2004). “Alteration of biomass and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by media sterilization method and sugars”. *Plant Cell Rep* 23: 414-418.

Whipkey A., Simon J.E., Charles D.J., Janick J. (1992). “*In vitro* production of artemisinin from *Artemisia annua* L”. *Phytother Res* 1: 15-25.

White N.J. (2008). “*Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite”. *Clin Infect Diseases* 46: 172-173.

Wildholm J.M. (1972). “The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cell”. *Stain Technol* 47: 189-194.

Withers S.T., Keasling J.D. (2007). “Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules”. *Appl Microbiol Biot* 73: 980-990.

Woerdenbag H.J., Luers J.F.J., Van Uden W., Pras N., Malingré T.M., Alfermann A.W. (1993). “Production of the new antimalarial drug in shoot cultures of *Artemisia annua* L.”. *Plant Cell Tiss Org* 32: 247-257.

World Health Organization (1996). “Investing in health research for development. Report of the Ad hoc Committee on Health Research Relating to Future Intervention Options”. Geneva: The Organization. Report No.:TDR/Gen/96.1.

World Health Organization (2005). “Roll back malaria. World malaria report: section III global financing, commodities and services delivery”. World Health Organization: Geneva. Available at: <http://www.rbm.who.int/wmr2005/htm>.

Xu Y.H., Wang J.W., Wang S., Wang J.Y., Chen X.Y. (2004). “Characterization of *GaWRKY1*, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)-delta-cadinene synthase-A”. *Plant Physiol* 135: 507-515.

Zhang Y., Teoh K.H., Reed D.W., Maes L., Goossens A., Olson D.J., Ross A.R., Covello P.S. (2008). “The molecular cloning of *artemisinic aldehyde $\Delta 11(13)$ reductase* and its role in glandular trichome-dependent biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*”. *J Biol Chem* 283: 21501-21508.

Zhao K.C., Liu C.X., Liang X.T., Yi M.G., Song Z.Y. (1986) “Development of radioimmunoassay for determination of artesunate, a derivative of the antimalarial qinghaosu”. *Proc Chin Acad Med Sci Peking Union Med Coll* 1: 213-217.

RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare tutto il gruppo di ricerca del “Progetto Artemisia” del CNR ISPA di Lecce: Dr. Giovanni Mita, Dr. Federica Blando, Dr. Angelo De Paolis, Dr. Miriana Durante e Dr. Angela Quarta perchè sono stati sempre disponibili a dirimere i miei dubbi durante la stesura di questo lavoro e in particolare la Dr. Sofia Caretto per i preziosi insegnamenti durante i tre anni di dottorato. Inoltre, ringrazio sentitamente il prof. Andrea Fabbri per avermi permesso di svolgere l’attività di ricerca per questa tesi di dottorato presso il CNR ISPA di Lecce. Intendo poi ringraziare i due collaboratori tecnici Leone D’Amico e Gianni Colella e anche la Dr. Antonella Leone, sottolineando la particolare disponibilità.

Un ringraziamento particolare al Dr. Gian Pietro Di Sansebastiano per la proficua collaborazione durante l’ultimo anno di dottorato.

I miei ringraziamenti vanno anche al Dr. Maurizio Lambardi, per la fiducia data e l’opportunità di dimostrare le mie capacità lavorative in tutti questi anni universitari.

Inoltre, vorrei esprimere la mia sincera gratitudine alle mie colleghe di Parma Emanuela e Deborah e ai colleghi di Lecce: Stefania D., Mariana, Stefania B., Rosanna, Simona, Paola, Daniela, Cristiano, Lucia M., Valentina, Maria, Pina, Lucia L. e Susi per i numerosi consigli durante la ricerca.

Infine, desidero ringraziare con affetto la mia famiglia e Antonio per il sostegno ed il grande aiuto che mi hanno dato e per essermi stati vicini ogni momento durante questi anni di lavoro.