

System Biology: Un ulteriore strumento per le biotecnologie

La letteratura scientifica è ampia, spesso di difficile lettura ed interpretazione. Ogni articolo deve essere analizzato in dettaglio: la sua introduzione, la sezione dei materiali e metodi, i risultati, l'interpretazione di questi e le conclusioni che gli autori traggono, così come la bibliografia a cui l'articolo fa riferimento. Le considerazioni poi, che ognuno legittimamente può fare, devono essere ben ponderate onde evitare di cadere in facili semplificazioni che spesso vengono riprese ed amplificate dalla stampa e dalla TV. Può capitare ad esempio che un lavoro scientifico, interessante e ben fatto a prima vista, si riveli avere numerose mancanze metodologiche e concettuali se analizzato in maniera più approfondita. In data 10 Luglio 2015, viene pubblicato sulla rivista *Agricultural Sciences*, un lavoro scientifico a firma di V. A. Shiva Ayyadurai e Prabhakar Deonikar ed intitolato: *Do GMOs Accumulate Formaldehyde and Disrupt Molecular Systems Equilibria? Systems Biology May Provide Answers [1]*. In questo lavoro, facendo uso della system biology computerizzata, gli autori sollevano il dubbio sulla possibilità che, una varietà di soia geneticamente modificata (MSOY 7575 RR) per resistere al diserbante Roundup[®], possa presentare livelli alterati di GSH e formaldeide rispetto alla sua isogenica (MSOY 7501). Secondo gli autori tale evidenza sarebbe sufficiente per rivedere le regole che sono alla base del principio di “sostanziale equivalenza” in vigore negli Stati Uniti ed utilizzato dall'FDA americana per autorizzare gli eventi GM. Prima di passare all'analisi del lavoro, è il caso di spendere due parole su quest'ultimo punto. Il principio di equivalenza sostanziale è stato enunciato nel 1991 dall'OCSE e rielaborato nel 1996 dalla FAO e dall'OMS definendolo come quella condizione in cui, uno specifico alimento e quello da esso derivato, presentano le stesse caratteristiche. Nel caso degli organismi geneticamente modificati: *“I livelli e le variazioni delle caratteristiche dell'organismo transgenico devono essere all'interno delle variazioni delle stesse caratteristiche dell'organismo di paragone”*. Tale definizione, ribadita nel regolamento CE 258/97, serviva tra le altre cose a normare olii, amidi ecc, in cui DNA e proteine sono virtualmente assenti. In questo caso infatti, tra un prodotto tradizionale ed uno ottenuto da organismi geneticamente modificati, non poteva essere stabilita una differenza sostanziale qualora tutte le altre caratteristiche: trigliceridi, acidi grassi, metaboliti secondari come i polifenoli (ad es. nel caso dell'olio) fossero state simili. Gli organismi viventi però, ivi compresi quelli geneticamente modificati, sono sistemi molto complessi e in virtù di questa complessità non ha molto senso parlare di sostanziale equivalenza: un organismo è equivalente ad un altro fino a quando non emerge una differenza non evidenziata precedentemente. Proprio in virtù di questa considerazione nel successivo regolamento CE 1829/2003, al punto 6 dei *considerata* troviamo: *“Il regolamento (CE) n. 258/97 istituisce anche una procedura di notifica per i nuovi prodotti alimentari sostanzialmente equivalenti a quelli che già esistono. Se l'equivalenza sostanziale rappresenta un elemento cardine del processo di valutazione della sicurezza degli alimenti geneticamente modificati, essa non costituisce di per sé una valutazione della sicurezza. Al fine di garantire chiarezza, trasparenza e un contesto armonizzato per l'autorizzazione degli alimenti geneticamente modificati, tale procedura di notifica dovrebbe essere abbandonata con riferimento agli alimenti geneticamente modificati”*. Ancora al punto 21: *“L'etichettatura dovrebbe contenere informazioni oggettive indicanti se un alimento o mangime contiene OGM o è costituito o prodotto a partire da OGM. Un'etichettatura chiara, indipendentemente dall'individuabilità del DNA o di proteine risultanti da una modificazione genetica nel prodotto finale, risponde alle richieste espresse in numerosi sondaggi dalla stragrande maggioranza dei consumatori, facilita l'adozione di scelte consapevoli e impedisce che i consumatori siano tratti in inganno per quanto riguarda i metodi di fabbricazione o produzione”*. Da questo punto di vista dunque le due normative, quella europea e quella statunitense, sono molto diverse l'una dall'altra.

Passando all'analisi del lavoro dobbiamo fare una premessa su cosa sia la system biology. Tradotta con biologia di sistema, la system biology si occupa di studiare gli organismi viventi nel complesso dell'interazione dinamica delle parti di cui sono composti. Questa modalità di studio che fino a poco

tempo fa non era possibile, è oggi realizzabile grazie a tecniche definite high-throughput (genomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica) in cui si può studiare l'organismo vivente tenendo in considerazione il complesso dei geni che lo definiscono o l'insieme delle interazioni tra le vie metaboliche. Con l'aiuto delle moderne tecniche informatiche poi, avendo a disposizione informazioni sufficienti e modelli matematico-informatici affidabili, è possibile ricostruire interi pathway *in silico* e prevedere il comportamento di questi al variare di condizioni interne ed esterne.

Nel lavoro di cui sopra si è tentato di fare proprio questo passo. Gli autori, utilizzando un sistema *in silico* (CytoSolve) e cercando in letteratura pubblicazioni che potessero fornire dati su alterazioni molecolari tra due tipi di soia (la varietà GM MSOY 7575 RR e l'isogenica MSOY 7501) [2], sono andati alla ricerca di alterazioni difficili da scoprire sperimentalmente (*in vivo*). Gli autori hanno inserito nel software, i dati alterati di alcuni enzimi come la Superossido Dismutasi (SOD), la Catalasi o la Ascorbato Perossidasi (APX), enzimi coinvolti nella risposta allo stress ossidativo e trovati alterati nella soia GM [2]. Questi enzimi hanno il compito di combattere lo stress ossidativo detossificando la cellula dai radicali liberi ed influenzano indirettamente il rapporto GSH/GSSG. Il GSH (Glutathione in forma ridotta), è una molecola che funziona come scavenger dei ROS e dei radicali liberi, combatte i danni provocati da accumulo di metalli pesanti come Cadmio e Arsenico ed in generale funziona come tampone redox all'interno degli organismi (non solo piante). Oltre a queste funzioni, il GSH svolge anche un ruolo nella detossificazione della formaldeide all'interno del pathway C1 (<http://www.mcarmenmartinez.com/en/projectline2.html>). La formaldeide complessa con il GSH per formare Idrossi-Metil-Glutathione (HM-GSH) che viene poi convertito in Formil-GSH ed infine in acido formico (HCOOH). Quello che ci si può aspettare è che se i livelli di GSH per qualche motivo dovessero scendere, quelli della formaldeide potrebbero salire. Nel lavoro gli autori, hanno ricostruito *in silico* il pathway C1 ed inserendo le informazioni a loro disposizione hanno cercato di simulare il comportamento dei livelli di GSH e quindi di formaldeide in funzione del tempo. Nelle figure 3 e 4 del lavoro sono riportati i risultati sulla soia non GM in condizioni di stress (figura 4) e di non stress (figura 3). In condizioni di controllo ed in funzione del tempo, i livelli di GSH rimangono costanti nel tempo considerato ($800000 \text{ s} = 9 \text{ giorni circa}$). Contemporaneamente i livelli di formaldeide già bassi in partenza ($6 \cdot 10^{-7} \text{ nM}$) calano repentinamente a zero. In condizioni di stress invece, sono i livelli di GSH a crollare molto rapidamente fino ad arrivare a zero. I livelli di formaldeide al contrario, in queste condizioni, iniziano ad aumentare poco tempo dopo che quelli di GSH sono stati completamente depleti fino a toccare i 13 nM (circa 0,3 ppb) di concentrazione. Le stesse simulazioni si ripetono per la soia GM. In questo caso però, dal momento che la condizione GM genera per se stessa uno stress ossidativo, abbiamo il calo vertiginoso dei livelli di GSH fino allo zero e successivamente a questo, un aumento dei livelli di formaldeide che arrivano a valori di 25-30 nM (circa 0,6-0,7 ppb) (figura 15b-16b). La situazione diventa più estrema se si aggiunge ulteriore stress ossidativo arrivando a valori di formaldeide di 160 nM (circa 3,6 ppb) (figura 14a-b).

Come si accennava precedentemente l'analisi svolta dagli autori è un'analisi *in silico*. Questo implica non soltanto conoscere qualitativamente i fenomeni per poterli tradurre in un algoritmo informatico ma anche stimare con la massima precisione i parametri da inserire nelle equazioni. Sbagliare uno o più parametri, oppure non prendere in considerazione uno o più rami di un pathway può inficiare pesantemente i risultati di una simulazione.

Proprio per questo, nelle migliori pubblicazioni di system biology computerizzata, il lavoro informatico procede di pari passo con le analisi sperimentali, volte non soltanto a stimare in modo preciso i parametri ma a confermare ciò che proviene dalle simulazioni. Grazie a questa interazione tra analisi informatiche e lavoro sperimentale, è possibile raffinare continuamente il modello in modo che rispecchi il più fedelmente possibile la realtà. Un ottimo esempio è questo paper pubblicato su Nature da una delle massime autorità in fatto di sviluppo radicale: "*Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth*" [3]. Sulla base di ciò, si devono evidenziare quelli che sono, a mio avviso, punti deboli del lavoro presentato da V. A. Shiva

Ayyadurai e Prabhakar Deonikar. Il pathway preso in considerazione dal modello informatico per la gestione dei livelli di GSH, è il pathway dell'ascorbato; sembrerebbe dunque mancare la partecipazione dei pathway della cisteina e del glutammato che anche concorrono nel determinare i livelli di GSH intracellulari. Questo si traduce in un buffo risultato in cui i controlli in condizioni di stress, mostrano livelli di GSH anomali. In particolare i livelli di GSH tendono a zero molto velocemente quando nella realtà, né in cellule vegetali né in quelle animali, si è mai registrato un andamento simile [4-5]. I livelli di GSH in seguito a stress ossidativo si abbassano anche in maniera consistente ma mai arrivando ad annullarsi completamente; inoltre tendono a risalire dopo poche ore grazie ad un macchinario molecolare che si attiva per sintetizzare nuovo GSH proprio a partire dai pathway precedentemente menzionati. Questa incongruenza con i dati sperimentali farebbe pensare ad una modellizzazione informatica grossolana e molto lontana dalla realtà che ovviamente si ripercuote su tutte le simulazioni effettuate. Oltre a questo, mancano nel lavoro, proprio quei controlli a cui si faceva riferimento prima che avrebbero non soltanto verificato il modello ma dato elementi in più per raffinarlo. Dati i numeri riportati nel lavoro, credo sia estremamente complicata la misurazione sperimentale dei livelli di formaldeide (max 3,6 ppb) essendo al limite della sensibilità strumentale (forse si sarebbe potuto risolvere con traccianti radioattivi) ma di certo, la misura sperimentale dei livelli di GSH sarebbe stata non solo possibile ma auspicabile. Alcune di queste limitazioni sono note agli autori che nella discussione ammettono:

- 1) All the reactions used in the models discussed occur in a single cell and at the cell surface;
- 2) The cell was assumed to be a well-mixed reactor with uniform concentration of a given biomolecular species in the volume of the cell;
- 3) All the simulations were performed over a continuous time period without considering the effect of environmental factors such as solar cycle, temperature, and soil condition, for example;
- 4) The results predict the temporal dynamics of formaldehyde and glutathione in the non-GMO and GMO of soybean, but not the exact quantitative behavior as may be observed in subsequent *in vitro* and *in vivo* experiments;
- 5) Most importantly, the results from this study are dependent on kinetic parameters and initial conditions of biomolecular species, information of which is based on the existing scientific literature.

Sebbene carente in alcuni punti, l'articolo pone l'accento su questioni importanti ma soprattutto mette in evidenza come le tecniche e le possibilità di analisi continuino ad evolvere velocemente permettendo considerazioni che fino a poco tempo fa non erano possibili. Grazie a questi modelli informatici, se ben caratterizzati e strutturati, si possono osservare e prevedere fenomeni altrimenti difficilmente rilevabili.

In definitiva, queste nuove tecniche informatiche, insieme alle moderne tecniche di ingegneria genetica (ZFN, TALEN, CRISPR) e a quelle di biologia molecolare (high-throughput), trasportano il futuro della ricerca e delle sue applicazioni in un tempo in cui la precisione e la consapevolezza con cui si opera non hanno precedenti nella storia.

BIBLIOGRAFIA:

- [1] V. A. Shiva Ayyadurai e Prabhakar Deonikar **(2015)** Do GMOs Accumulate Formaldehyde and Disrupt Molecular Systems Equilibria? Systems Biology May Provide Answers. **Agricultural Sciences**, **6:630-662**
- [2] Herbert S. Barbosa, Sandra C. C. Arruda, Ricardo A. Azevedo and Marco A. Z. Arruda **(2012)** New insights on proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential expressions of enzymes and proteins. **Anal Bioanal Chem**, **402:299-314**
- [3] Veronica A. Grieneisen, Jian Xu, Athanasius F. M. Maree, Paulien Hogeweg and Ben Scheres **(2007)** Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. **Nature**, **449:1008-1013**
- [4] Chengbin Xiang and David J. Oliver **(1998)** Glutathione Metabolic Genes Coordinately Respond to Heavy Metals and Jasmonic Acid in Arabidopsis. **The Plant Cell**, **10:1539-1550**
- [5] Alessandra Masci, Roberto Mattioli, Paolo Costantino, Simona Baima, Giorgio Morelli, Pasqualina Punzi, Cesare Giordano, Alessandro Pinto, Lorenzo Maria Donini, Maria d'Erme and Luciana Mosca **(2015)** Neuroprotective Effect of Brassica oleracea Sprouts Crude Juice in a Cellular Model of Alzheimer's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, **Article ID 781938**