



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI
VITERBO**

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA ED AGROCHIMICA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

IN BIOTECNOLOGIE VEGETALI - XVIII CICLO.

***Immunomodulazione dell'infezione virale da CMV in
piante transgeniche di pomodoro***

S.S.D. BIO 04

Coordinatore: Prof. Domenico Lafiandra

Tutor: Dott. Eugenio Benvenuto

Dottoranda: Maria Elena Villani

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 STRATEGIE DI DIFESA DELLE PIANTE DALL'ATTACCO DEI PATOGENI

1.2 LA RISPOSTA DI DIFESA DELLA PIANTA DALL'ATTACCO DI PATOGENI

1.3 GENI DI RESISTENZA

1.4 RISPOSTA SISTEMICA ACQUISITA ED ALTRI SISTEMI DI DIFESA

1.5 NUOVE STRATEGIE DI DIFESA

1.5.1 Resistenza derivata dal patogeno

1.5.2 Trasferimento di geni di resistenza naturali

1.5.3 Espressione di proteine eterologhe

1.6 VIRUS VEGETALI

1.6.1 Aspetti generali dei virus vegetali

1.6.2 Movimento dei virus vegetali

A. Movimento cellula-cellula

B. Movimento a lunga distanza

1.7 VIRUS DEL MOSAICO DEL CETRIOLO (CMV)

1.7.1 Struttura delle particelle

1.7.2 Struttura del genoma

1.7.3 Funzione delle proteine

1.7.4 Movimento virale

A. Movimento cellula-cellula

B. Movimento a lunga distanza

C. Movimento pianta-pianta

1.7.5 Resistenza e risposta dell'ospite

1.8 ANTICORPI RICOMBINANTI

1.8.1 Immunoglobuline

1.8.2 Aspetti generali sugli anticorpi ricombinanti

1.8.3 Frammenti anticorpali a singola catena (scFv)

1.9 REPERTORI MOLECOLARI: LE LIBRERIE "PHAGE DISPLAY".

1.9.1 Repertori molecolari

1.9.2 il principio del “phage display”

1.9.3 Repertori di anticorpi sintetici

1.10 GLI ANTICORPI INTRACELLULARI (‘INTRABODIES’)

1.10.1 Espressione di anticorpi all’interno della cellula

1.10.2 ‘Intrabodies’ ottenuti

1.11 LA LIBRERIA DI ‘INTRABODIES’ F8

1.11.1 Caratterizzazione termodinamica e biochimica dell’scFv(F8)

1.11.2 Il scFv(F8) come ‘scaffold’ per la costruzione di anticorpi a singola specificità

1.11.3 Repertorio molecolare ‘F8 library’

1.11.4 Caratteristiche biochimiche degli scFv selezionati dalla ‘library F8’

1.12 INTERFERENZA MOLECOLARE MEDIATA DAGLI ANTICORPI

2.SCOPO DELLA TESI

2.1 LA TECNOLOGIA DEGLI ANTICORPI RICOMBINANTI

2.2 IL PIANO SPERIMENTALE

3. MATERIALI E METODI

3.1 CMV E ANTICORPI POLICLONALI

3.2 CEPPI BATTERICI E DI LIEVITO

3.3 SELEZIONE DI scFv DALLA ‘LIBRERIA F8’

3.3.1 Immobilizzazione dell’antigene e cicli di selezione

3.3.2 Analisi dei cloni

3.4 ELISA

3.5 PURIFICAZIONE scFv MEDIANTE CROMATOGRAFIA DI AFFINITA’

3.6 ELETTROFORESI DI PROTEINE SU GEL DENATURANTE DI POLIACRILAMMIDE (SDS-PAGE) E WESTERN BLOTTING

3.6.1 SDS-PAGE

3.6.2 Colorazione con nitrato d’argento

3.6.3 *Trasferimento delle proteine (Western blotting)*

3.7 CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE

3.8 CALCOLO DELL’AFFINITA’ E MAPPATURA DELL’EPITOPO MEDIANTE RISONANZA PLASMONICA DI SUPERFICIE (SPR)

3.8.1 *Calcolo dell’affinità mediante SPR*

3.8.2 *Mappatura dell’epitopo*

3.9 CLONAGGI

3.9.1 *Restrizioni*

3.9.2 *Amplificazione mediante PCR*

3.9.3 *Sintesi degli oligonucleotidi*

3.9.4 *Gel di agarosio*

3.9.5 *Estrazione e purificazione del DNA dal gel di agarosio*

3.9.6 *Reazione di ligazione*

3.9.7 *Preparazione cellule competenti per elettroporazione*

3.9.8 *Elettroporazione*

3.9.9 *Caratterizzazione dei ricombinanti batterici mediante PCR*

3.9.10 *Minipreparazione di DNA plasmidico*

3.9.1 *Sequenziamento*

3.10 SISTEMA DOPPIO IBRIDO IN LIEVITO PER L’ANALISI DELL’INTERAZIONE ANTIGENE/ANTICORPO *IN VIVO*

3.10.1 *Clonaggio nei vettori per l’espressione delle proteine di fusione in lievito*

3.10.2 *Analisi dell’interazione*

3.11 INFEZIONE DI PIANTE DI *NICOTIANA BENTHAMIANA* CON PVX

3.12 TRASCRIZIONE INVERSA ED AMPLIFICAZIONE DEL cDNA (RT-PCR)

3.12.1 *Estrazione di RNA da tessuti vegetali*

3.12.2 *RT-PCR*

3.13 ESTRAZIONE ED ANALISI DI PROTEINE VEGETALI

3.13.1 *Estrazione di proteine totali da tessuti vegetali*

3.13.2 *Quantificazione delle proteine con il metodo Bradford*

3.14 TRASFORMAZIONE CON scFv DI PIANTE DI POMODORO MEDIATA DA AGROBATTERIO

3.15 INFEZIONE DI PIANTE DI POMODORO CON CMV

3.16 TEST DI RECUPERO DEL VIRUS

4. RISULTATI

4.1 SELEZIONE DI scFv ANTI-CMV DALLA ‘LIBRERIA F8’

4.2 CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA DEGLI ANTICORPI SELEZIONATI

4.2.1 Western blot e co-immunoprecipitazione

4.2.2 Risonanza plasmonica di superficie

4.3 ANALISI DELL’INTERAZIONE scFv/CMV IN VIVO PER MEZZO DEL SISTEMA DOPPIO IBRIDO IN LIEVITO

4.4 ESPRESSIONE TRANSIENTE IN NICOTIANA BENTHAMIANA DEGLI ANTICORPI scFvB4 E scFvG4 MEDIANTE IL VETTORE PVX

4.4.1 Clonaggio dei geni scFvG4 e scFvB4 nel vettore di espressione transiente pPVX201

4.4.2 Infezione di piante di Nicotiana benthamiana con PVXscFv(G4/B4)

4.5 ESPRESSIONE MEDIATA DA AGROBATTERIO DI scFvG4 E scFvB4 IN POMODORO

4.5.1 Clonaggio dei geni scFvG4 e scFvB4 nel vettore di pBI121

4.5.2 Infezione delle piante di pomodoro transgenico con Virus del Mosaico del Cetriolo (CMV): piante resistenti all’infezione virale

4.5.3 Co-immunoprecipitazione del complesso scFvG4/CMV dalle foglie inoculate della linea transgenica T3 resistente G4.8-R.

5. DISCUSSIONE

6. BIBLIOGRAFIA

7. ALLEGATO

Pubblicazione Villani *et al.*, (2005) “Immunomodulation of a plant virus infection by intrabodies selected in vitro from a stable single-framework phage display library”. *Plant Mol Biol.*, **58** (3):305-316.

1. INTRODUZIONE

1.1 STRATEGIE DI DIFESA DELLE PIANTE DALL'ATTACCO DEI PATOGENI

Le malattie che colpiscono le coltivazioni costituiscono una seria minaccia alle rese dei raccolti provocando ingenti danni economici. Da quando l'uomo ha iniziato a coltivare le piante infatti, una parte del raccolto veniva perso a causa di ruggini, muffe, virosi, batteriosi ecc. La rapida diffusione di un determinato patogeno può avere effetti economici e sociopolitici devastanti portando come peggiore conseguenza alla carestia (Agrios, 1997). E' stato stimato che circa il 10-15% della produzione agricola mondiale viene annualmente persa al momento della raccolta a causa della diffusione e degli effetti di microorganismi patogeni (Rangaswami, 1983). Un approccio tradizionale al controllo delle malattie prevede una combinazione di diverse tecniche quali il controllo dei vettori, la rotazione delle colture, la solarizzazione, la produzione di semi certificati privi di patogeni, il controllo chimico ecc.

La protezione delle piante dall'attacco dei patogeni può essere ottenuta attraverso programmi di miglioramento genetico per la selezione di varietà resistenti. Il miglioramento genetico ha permesso di raggiungere buoni risultati, la maggior parte delle varietà attualmente coltivate infatti hanno introdotta una forma di resistenza genetica (Crute & Pink, 1996); anch'esso tuttavia presenta degli svantaggi: da una parte i lunghi tempi necessari per introdurre una nuova resistenza, dall'altra le resistenze ottenute non sono durature nel tempo ma vengono spesso 'superate' dal patogeno. Una strategia alternativa è rappresentata dalla trasformazione genetica delle piante per l'ottenimento di varietà resistenti. I principali vantaggi di tale strategia sono i tempi ridotti (possono infatti essere prodotte linee di piante resistenti in pochi mesi), la possibilità di trasferire i 'geni di resistenza' da specie distanti o addirittura da organismi diversi, ed infine l'estrema adattabilità (possono essere introdotti contemporaneamente più geni di resistenza). Ad oggi vi sono molti esempi di piante geneticamente trasformate resistenti ad un'ampia gamma di patogeni (virus, batteri, funghi ed invertebrati). In molti casi sono state impiegate strategie diverse che comprendono:

- il trasferimento e l'espressione di geni naturali di resistenza derivati da piante in colture suscettibili;
- l'espressione di geni derivati dal patogeno che danno una resistenza 'derivata dal patogeno';

- l'espressione di proteine di resistenza eterologhe derivate da batteri, funghi e animali.

1.2 LA RISPOSTA DI DIFESA DELLA PIANTA DALL'ATTACCO DI PATOGENI

Il fenomeno della resistenza delle piante ai patogeni è noto da moltissimo tempo. Circa un secolo fa Farrel dimostrò come alcune varietà di grano erano resistenti alla *Puccinia graminis* f. sp. tritici, provando che la resistenza alla ruggine gialla era geneticamente determinata e seguiva le leggi di Mendel.

Solo molto tempo dopo però Flor e Oort descrissero le interrelazioni genetiche tra ospite e patogeno elaborando la teoria oggi nota come l' "ipotesi del gene-per-gene". Per ogni gene di resistenza (*R*) posseduto da una pianta vi è un corrispondente gene di avirulenza (*avr*) posseduto dal patogeno; per avere un'interazione "incompatibile" pianta-patogeno, i geni devono essere contemporaneamente espressi. Nel caso in cui i due geni non siano contemporaneamente espressi l'interazione è di tipo "compatibile" e la pianta risulta suscettibile all'infezione (Flor, 1971).

In generale le risposte di difesa si inducono sempre in caso di infezione, ma nel caso delle interazioni di tipo incompatibile queste sono molto più mirate e si attivano molto più velocemente che nelle interazioni di tipo compatibile. Un patogeno di tipo compatibile riesce a 'nascondere' la sua presenza e ad inattivare molto rapidamente le risposte di difesa della pianta, un patogeno di tipo incompatibile invece, viene immediatamente "percepito" quando è presente nei tessuti vegetali, a volte direttamente, altre volte attraverso i prodotti della sua attività (Baron & Zambryski, 1995; Dixon *et al.*, 1994).

Il tipo di percezione diretta è proprio quella descritta nella teoria del gene-per-gene. La pianta ha dei recettori in grado di legare proteine, peptidi, o altre sostanze prodotte dal patogeno; in seguito a questo riconoscimento scatena una risposta ipersensibile (HR) che causa una necrosi localizzata intorno al focolaio di infezione e induce talvolta una resistenza sistemica acquisita (SAR- Systemic Acquired Resistance); quest'ultima può considerarsi una sorta di 'immunità fisiologica' che

partendo dal sito di infezione primario si estende a tutta la pianta (Jones, 1996; Baker. *et al.*, 1997; Dangl & Jones, 2001).

Il tipo di percezione indiretta è legato non tanto alla presenza del patogeno stesso, quanto ad esempio a frammenti di parete cellulare prodotti dagli enzimi degradativi secreti dal patogeno. Anche in questo caso si ha induzione della SAR, che è una risposta legata non ad uno specifico agente eziologico, ma di tipo generico, in grado di garantire una difesa ad ampio spettro (Delaney, 1997).

Nelle figure 1 e 2 sono riportati schemi nei quali sono esemplificate le possibili risposte di difesa della pianta in seguito all'attacco di un patogeno. Nella figura 2 sono riportate anche le lesioni necrotiche tipiche di una risposta ipersensibile.

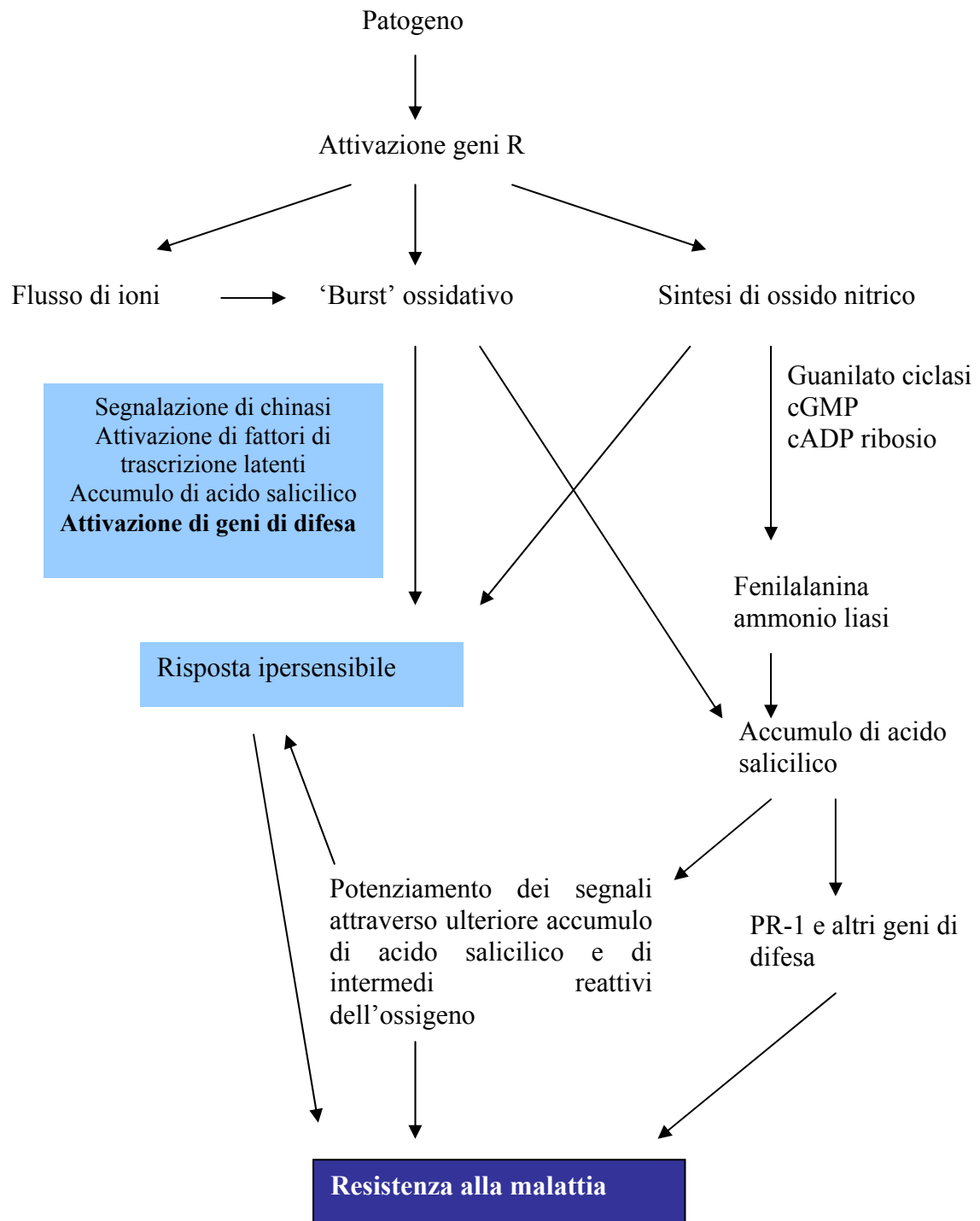


Figura 1 Schema generale delle possibili risposte di difesa della pianta. (Figura ripresa ed adattata da Sticher *et al.*, 1997).

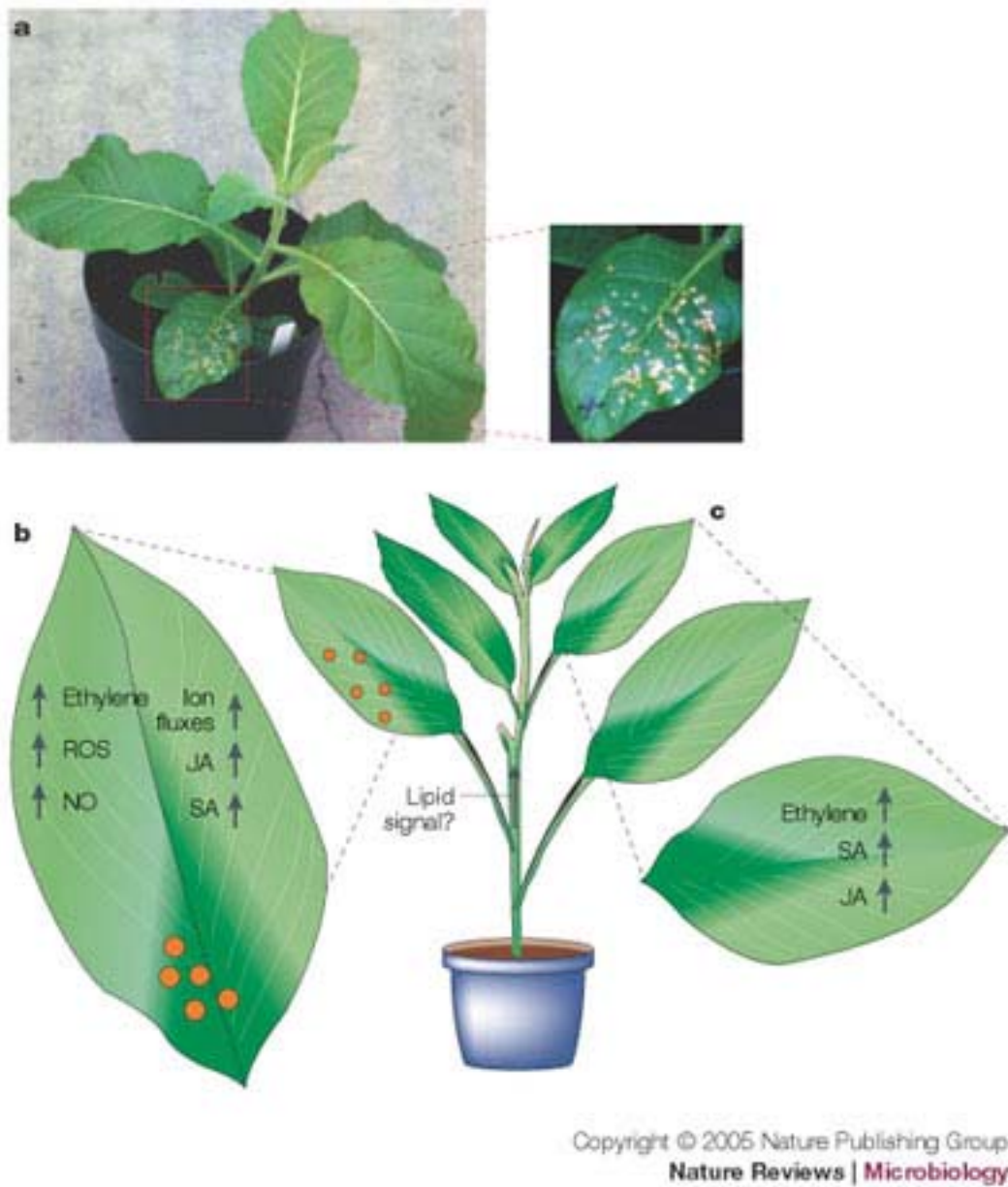


Figura 2 Resistenze locale e sistemica mediata dai geni di resistenza (R). (a) Figura di lesioni necrotiche tipiche di una risposta HR in seguito ad infezione con il virus del mosaico del tabacco. Le foglie superiori sono prive di sintomi e non contengono virus. (b) In seguito ad infezione numerose molecole segnale sono localmente indotte. (c) In seguito ad HR la risposta sistemica acquisita è indotta nei tessuti distali non infettati. Il segnale sistemico al momento è ancora sconosciuto, ma si pensa che sia un derivato dei lipidi. JA, acido jasmonico; NO, ossido nitrico; SA, acido salicilico; ROS, specie reattive dell'ossigeno (Figura da Soosaar *et al.*, 2005).

1.3 GENI DI RESISTENZA

Affinchè possa scatenarsi una risposta ipersensibile (HR) è necessario che i prodotti dei geni di resistenza svolgano il loro ruolo di recettori, percependo la presenza del patogeno. I geni di resistenza, pur riconoscendo molecole molto diverse tra loro, presentano notevoli omologie strutturali che permettono di suddividerli in cinque classi principali:

- proteine chinasi senza ripetizioni ricche di leucina (LRR, Leucine Rich Repeats) (ad esempio *Pto*, *Fen*);
- proteine chinasi con LRR (ad esempio *Xa21*, gene di resistenza a *Xanthomonas oryzae*);
- recettori con LRR extracitoplasmatiche (ad esempio *Cf*, gene di resistenza a *Cladosporium fulvum*);
- recettori con LRR citoplasmatiche (NBS-LRR Nucleotide Binding Site - LRR);
- la nuova classe di recettori *RPW8* che presentano domini citoplasmatici di tipo ‘coiled-coil’ ed un dominio N-terminale di ancoraggio alla membrana (Xiao, *et al.*, 2001)

1.4 RISPOSTA SISTEMICA ACQUISITA ED ALTRI SISTEMI DI DIFESA

A seguito di un’ interazione di tipo ‘incompatibile’ tra pianta e patogeno che scatena la risposta ipersensibile(HR), la pianta acquisisce la capacità di difendersi da attacchi successivi da parte di un’ ampia gamma di patogeni (virus, batteri, funghi), fenomeno noto come resistenza sistemica acquisita (SAR). Normalmente la SAR persiste per alcune settimane dopo il primo evento di infezione. L’induzione della SAR è correlata con l’espressione sistemica di diversi geni, alcuni dei quali appartengono ad una famiglia di almeno 5 geni correlati alla patogenesi (‘pathogen-related, PR’) (Ward., *et al.*, 1991). E’ stato osservato che alcune proteine PR sono in grado di inibire la crescita dei patogeni *in vitro* (Vigers, *et al.*, 1991), mentre esperimenti di espressione costitutiva in piante transgeniche dimostrano la loro

capacita' di conferire una parziale resistenza alle infezioni fungine anche *in vivo* (Alexander *et al.*, 1993).

Sono state identificate diverse molecole segnale ritenute responsabili dell'attivazione della SAR, come ad esempio l'acido salicilico. Applicazioni esogene di acido salicilico, o di un suo derivato (acido acetilsalicilico) inducono l'espressione delle proteine PR e rendono le piante di tabacco meno suscettibili all'attacco del virus del mosaico del tabacco (Ward. *et al.*, 1991). In piante di tabacco in cui è stato inserito il gene batterico *nahG*, che codifica per una salicilato idrolasi, un enzima che trasforma l'acido salicilico in catecolo, la SAR è bloccata (Gaffney. *et al.*, 1993).

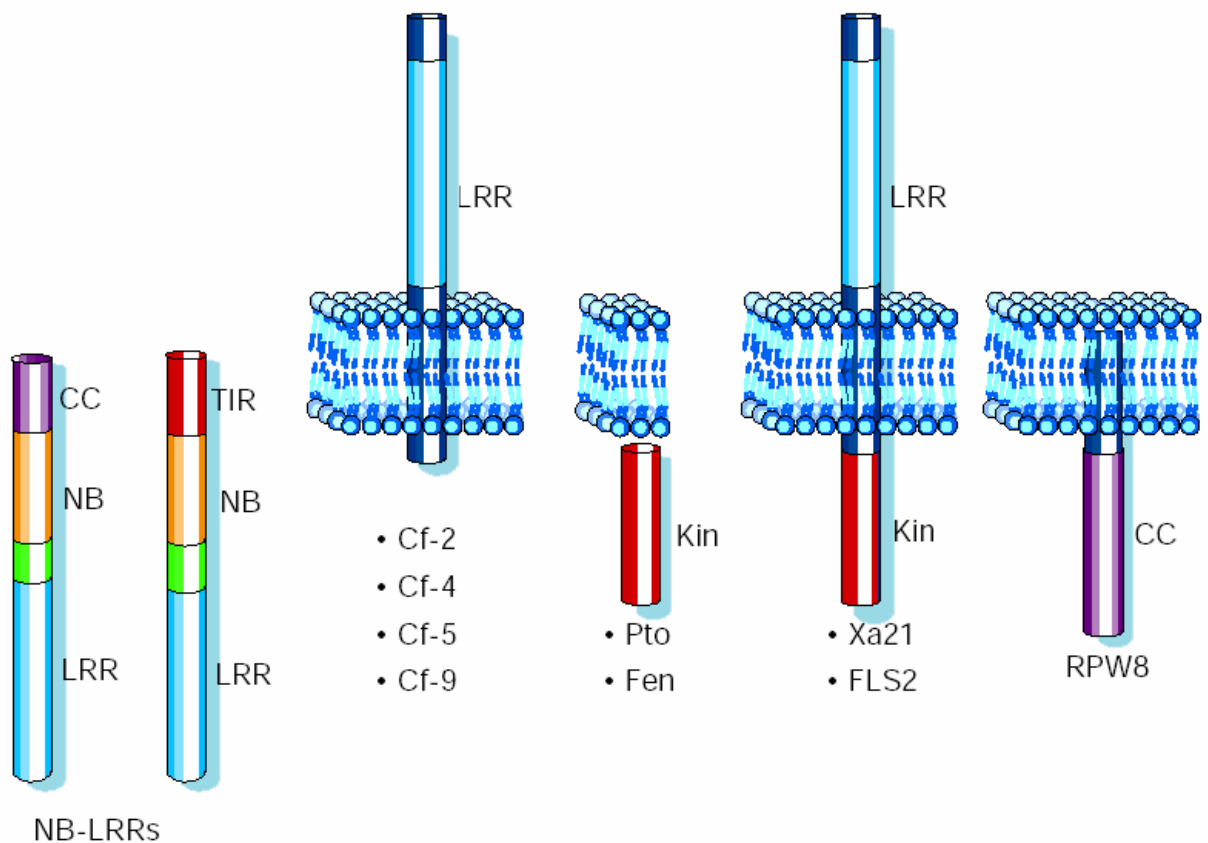


Figura 3 Rappresentazione schematica dei prodotti proteici delle cinque principali classi di geni di resistenza (Figura tratta da Dangl J.L., *et al.*, 2001).

- KIN = dominio con attivita' di protein chinasi
- NBS = sito di legame di nucleotidi (o Nucleotide Binding Site)
- LRR = ripetizioni ricche di leucina
- TIR = regione omologa a Toll ed al recettore dell'interleuchina 1 (o Toll-IL 1R homology region)
- CC = dominio citoplasmatico di tipo 'coiled-coil'

Un'altra ipotetica molecola segnale è l'acido abscissico. Quest'ormone sembra svolgere un ruolo importante nell'induzione degli inibitori delle proteasi nei tessuti di fagiolo danneggiati da *Colletotrichum lindemuthianum* (Dunn *et al.*, 1990).

E' stato inoltre osservato che trattamenti con etilene attivano l'espressione di molti geni PR, compresi quelli codificanti per le β -1-3-glucanasi e le chitinasi (Brederode *et al.*, 1991), e quelli per gli enzimi della via biosintetica dei fenilpropanoidi (Ecker & Davis, 1987). I livelli di etilene endogeno aumentano in risposta alle ferite e all'attacco dei patogeni e la sintesi di etilene è uno dei primi eventi osservati durante una IR.

L'acido jasmonico ed il suo derivato volatile il metiljasmonato, inducono invece la sintesi degli inibitori delle proteasi (Farmer & Ryan, 1990) e possono essere a loro volta indotti in risposta ad elicitori derivati dalle pareti cellulari fungine (Gundlach *et al.*, 1992).

Ulteriori sistemi di difesa della pianta possono essere:

- il rafforzamento delle strutture della parete cellulare intorno al sito di infezione. Questo si traduce in deposizione di lignina o callosio attraverso la stimolazione di callosio sintasi sulla membrana plasmatica, deposizione di glicoproteine ricche di idrossiprolina a partire da precursori solubili e stimolazione dell'attività perossidasi necessaria per la formazione di legami crociati tra le proteine della parete.
- La produzione di sostanze tossiche come le fitoalessine.
- La produzione di enzimi litici, che hanno il doppio scopo di danneggiare l'ospite e di creare molecole con attività elicitoria in grado di amplificare ulteriormente le risposte di difesa. Ne sono un esempio le β -1-3-glucanasi e le chitinasi i cui substrati sono rispettivamente il β -glucano e la chitina, componenti della parete cellulare dei funghi. Gli oligomeri di chitina che si generano durante l'infezione, sono percepiti da recettori della pianta che risponde attivando i geni di difesa.
- La sintesi di inibitori degli enzimi del patogeno, che hanno di nuovo la doppia funzione di rallentare l'attività degradatrice e di creare ancora una

volta molecole elicitorie che segnalino la presenza di un'infezione in corso. Appartengono a questa categoria gli inibitori delle proteasi fungine e gli inibitori proteici delle poligalatturonasi o PGIP.

1.5 NUOVE STRATEGIE DI DIFESA

Lo sviluppo di varietà resistenti alle malattie necessita di una conoscenza approfondita dell'interazione del patogeno con la pianta stessa, come ad esempio la via utilizzata per l'infezione e le modalità di replicazione/riconoscimento. La conoscenza dei diversi aspetti dell'interazione pianta-patogeno è fondamentale per lo sviluppo di una efficace strategia di protezione in piante geneticamente modificate. Come già accennato esistono tre principali strategie di interferenza con l'infezione da parte del patogeno:

- L'espressione di DNA, RNA o proteine derivati dal patogeno o da un organismo strettamente imparentato può interferire con la replicazione del patogeno stesso (resistenza derivata dal patogeno, PDR).
- La naturale risposta di difesa da parte della pianta può essere modificata, potenziata e trasferita a specie diverse.
- Proteine eterologhe, derivate da organismi diversi (mammiferi, microorganismi, insetti), possono interferire con diversi stadi del ciclo vitale del patogeno.

1.5.1 Resistenza derivata dal patogeno

Il concetto di resistenza derivata dal patogeno deriva da un fenomeno ben noto chiamato di protezione 'crociata', per il quale una pianta infettata con un virus che provoca sintomi attenuati diviene resistente all'infezione di virus correlati che normalmente causano sintomi più severi (Fulton, 1986).

Il primo approccio è stato quello di esprimere in pianta singole proteine virali in modo da ottenere varietà resistenti al virus stesso (resistenza mediata dalle proteine). La prima dimostrazione è stata ottenuta esprimendo la proteina del rivestimento del virus del mosaico del tabacco (TMV) in piante di tabacco transgeniche che risultavano protette dall'attacco virale (Powell-Abel *et al.*, 1986). Una strategia simile è stata applicata esprimendo proteine virali non funzionali, come ad esempio

una versione troncata della replicasi virale del virus X della patata (PVX) (Longstaff *et al.*, 1993).

Un aspetto molto interessante dell'espressione di geni virali in pianta e' quello emerso dallo studio di sequenze geniche virali modificate in modo da renderle non traducibili, che inserite in piante transgeniche mostravano comunque elevati livelli di protezione (Lindbo & Dougherty, 1992). L'espressione di sequenze virali non traducibili portava infatti al fenomeno del silenziamento post-trascrizionale ('post transcriptional gene silencing', PTGS) del gene virale corrispondente. Nelle piante il PTGS agisce come una naturale difesa contro i virus, riconoscendo come aberranti gli RNA a doppio filamento intermedi di replicazione; questo meccanismo di difesa può essere attivato nelle piante virtualmente contro qualsiasi virus. Le basi molecolari di questa resistenza mediata dall'RNA consistono nella degradazione sequenza-specifica dei trascritti virali causata dalla presenza di piccole molecole di RNA interferente (siRNA) omologhe al gene silenziato (Hammond *et al.*, 2001). Lo stesso effetto e' stato osservato per l'espressione di RNA (Bourque, 1995) e RNA satelliti (Baulcombe *et al.*, 1986; Harrison *et al.*, 1987). Nella figura 4 è riportato un modello di come la PTGS agisca nella resistenza ai virus e come questa possa essere innescata dall'espressione di un transgene (Goldbach *et al.*, 2003). In particolare, l'RNA a singolo filamento (ssRNA) espresso dal transgene è copiato in un corto RNA a doppio filamento (dsRNA) per mezzo di una RNA polimerasi RNA dipendente (RdRP) dell'ospite. Il dsRNA prodotto attiva i componenti necessari per una degradazione sequenza-specifica dell'RNA transgenico, mentre i ssRNA bersaglio sono degradati da un complesso di nucleasi definito RISC, che funge anche da complesso bersaglio sequenza-specifico a causa della presenza di corti siRNA di 21-23 nucleotidi. Queste piccole molecole di siRNA hanno anche un ruolo nel segnale sistemico che è diffuso nella pianta (Goldbach *et al.*, 2003). Il PTGS è stato descritto anche nel mondo animale, per esempio in *C. elegans* e *Drosophila*, dove è coinvolto nella difesa del genoma da elementi trasponibili (Kennerdell & Carthew, 1998; Plasterk, 2002).

Nonostante i buoni risultati ottenuti dall'espressione di sequenze derivate dal patogeno, tale strategia di protezione presenta alcuni svantaggi. Mentre sono state ottenute resistenze contro numerosi patogeni virali, (Beachy, 1997; Beachy, 1999) nessun successo e' stato ottenuto per i patogeni di tipo cellulare (funghi, batteri, nematodi). Inoltre l'espressione in pianta di geni del patogeno può causare effetti indesiderati quali eventi di ricombinazione tra il transgene stesso ed il virus che

provoca l'infezione. Come conseguenza dell'evento di ricombinazione si possono creare nuovi ceppi virali con aumentata virulenza e diverso spettro d'ospite. (Borja *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 1999).

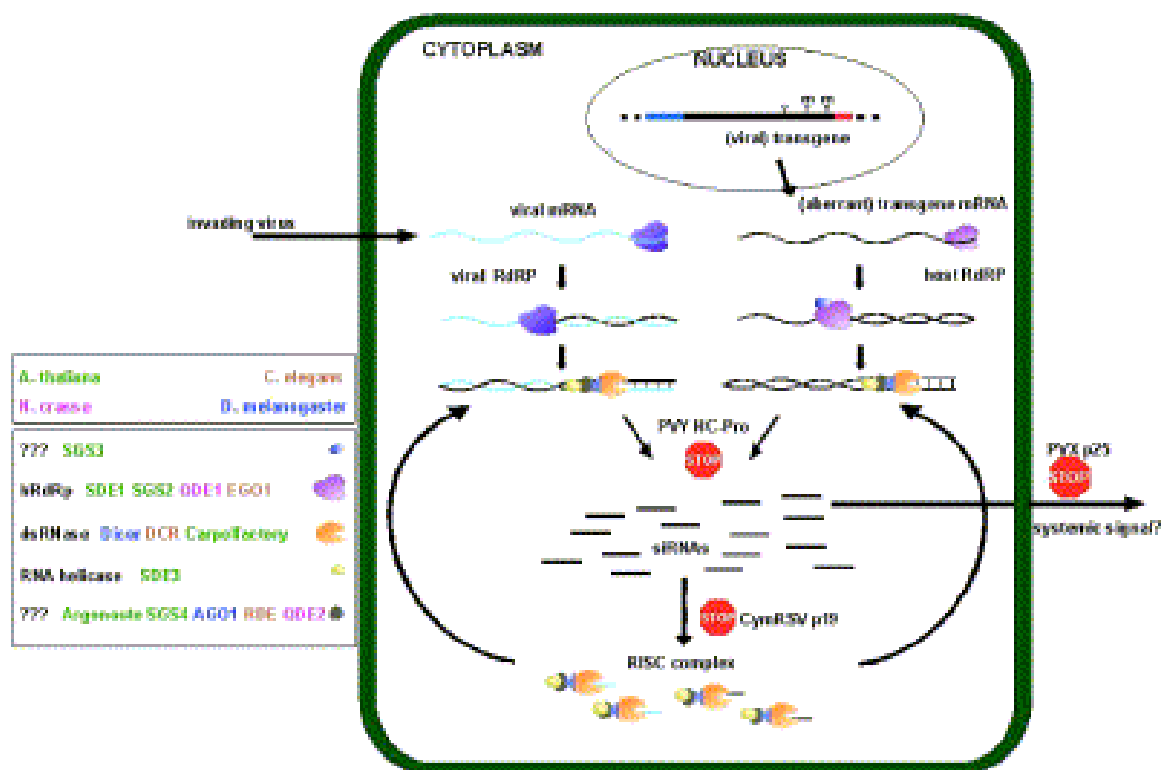


Figura 4. Modello generale che illustra il silenziamento genico nelle piante in seguito ad infezione virale o all'espressione di un transgene. I putativi geni coinvolti sono riportati nel riquadro con i loro omologhi in pianta, funghi, nematodi ed insetti (Figura ripresa da Goldbach *et al.*, 2003).

1.5.2 Trasferimento di geni di resistenza naturali

Vi sono diversi esempi di trasferimento mirato di geni di resistenza da una specie all'altra (Tab. 1). Ad esempio il gene di resistenza *N* del tabacco che conferisce resistenza al TMV e' stato trasferito nel pomodoro. (Whitham *et al.*, 1996). In altri casi sono state espresse proteine di inattivazione dei ribosomi che hanno mostrato una resistenza ad ampio spettro contro virus vegetali. (Moon *et al.*, 1997; Tumer *et al.*, 1997). Sono stati inoltre espressi geni naturali di resistenza modificati in modo da potenziarne l'attivita' e aumentarne lo spettro di difesa. Un esempio e' rappresentato dall'inibitore di cistein proteasi di riso (oryzacystatin), che espresso nel riso ha conferito resistenza dall'attacco da parte di nematodi (Vain *et al.*, 1998).

Recentemente sono stati ottenuti ottimi risultati esprimendo in tabacco e *Nicotiana benthamiana*, i geni di resistenza *RPW8* isolati da *Arabidopsis thaliana*. Essi sono in grado di conferire una resistenza ad ampio spettro contro gli agenti dell'oidio (Xiao. *et al.*, 2003). Lo svantaggio principale dell'espressione dei geni di resistenza naturali e' rappresentato dal fatto che questi conferiscono generalmente una resistenza a breve termine e limitata solo a pochi agenti patogeni.

Tabella 1 Esempi di piante transgeniche che esprimono diversi geni di resistenza verso patogeni batterici e fungini.

Pianta	Gene trasferito	Patogeno bersaglio
<i>Proteine PR</i>		
Tabacco	Chitinasi batterica da <i>Serratia marcescens</i>	<i>Alternaria longipes</i>
Tabacco	Gene di chitinasi da fagiolo	<i>Rhizoctonia solani</i>
Tabacco	Gene PR-1a	<i>Peronospora tabacina</i> ; <i>Phytophthora</i>

<i>parasitica</i>		
Tabacco	Chitinasi e β -1,3 glucanasi	<i>Cercospora nicotianae</i>
Pomodoro	Chitinasi e β -1,3 glucanasi	<i>Fusarium oxysporum</i>
Riso	Chitinasi	<i>Rhizoctonia solani</i>
Patata	PR-5	<i>Phytophthora infestans</i>
Patata	β -1,3 glucanasi	<i>Phytophthora infestans</i>

Proteine antimicrobiche

Tabacco	RIP di orzo	<i>Rhizoctonia solani</i>
Tabacco	Difensina Rs AFP2 di ravanello	<i>Alternaria longipes</i>
Tabacco	Cecropina	<i>Pseudomonas syringae</i>
Tabacco	β -tionina di orzo	<i>Pseudomonas syringae</i>
Riso	Cecropina	Patogeni batterici
Tabacco	Lisozima (HEL)	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizoctonia solanum</i>

Fitoalessine

Tabacco	Stilbene sintasi	<i>Botrytis cinerea</i>
Riso	Stilbene sintasi	<i>Pyricularia oryzae</i>

1.5.3 Espressione di proteine eterologhe

Sono state espresse in pianta diverse proteine eterologhe dotate di attività antivirale e antimicrobica. Tra queste ad esempio le ribonucleasi antivirali e le 2',5'oligoadenilato sintetasi derivate da mammifero (Watanabe *et al.*, 1995; Ogawa *et al.*, 1996) e per la resistenza a batteri e funghi il lisozima di origine umana (Nakajima *et al.*, 1997). Vi sono inoltre diversi esempi di espressione di molecole anticorpali dotate di specificità elevata verso fitopatogeni. Questa strategia di difesa, definita di 'immunoterapia', ha permesso di introdurre nuove resistenze soprattutto contro patogeni virali (Schillberg *et al.*, 2001). Una strategia innovativa prevede l'espressione di molecole peptidiche ad attività antimicrobica di origine vegetale e non (insetti, vertebrati, di cui tratta il capitolo seguente ecc.). La descrizione approfondita dell'espressione in pianta di anticorpi ricombinanti verrà trattata nel paragrafo 1.12.

1.6 VIRUS VEGETALI

1.6.1 Aspetti generali dei virus vegetali

I virus vegetali sono stati scoperti più di un secolo fa, quando nacque la scienza della virologia (review, Creager, 2002) e sono dei parassiti obbligati del loro ospite.

Durante il loro ciclo vitale, dall'accumulo al movimento intracellulare, locale e sistemico, i virus utilizzano le proteine vegetali normalmente implicate in funzioni specifiche della pianta. Nonostante la prima identificazione dell'interazione fra proteine dell'ospite e l'RNA virale risalgia a più di 25 anni fa, la vera complessità di queste interazioni che permettono l'accumulo ed il movimento del virus sta venendo alla luce solo negli ultimi anni (review in Waigmann *et al.*, 2004). Inoltre, le cellule vegetali hanno pareti attraverso le quali le connessioni sono ristrette e un virus per avere successo deve evolvere un meccanismo per muoversi sia attraverso la pianta stessa che da pianta a pianta.

La maggior parte dei virus vegetali sono ad RNA a singolo filamento con polarità positiva; c'è anche una piccola percentuale di virus a DNA e recentemente sono stati identificati parecchi pararetrovirus integrati nel genoma della pianta ospite (review in Roossinck, 2003). Sia per i virus a DNA che per quelli ad RNA l'accumulo della progenie implica sia la traduzione che la replicazione delle sequenze virali (Ishikawa & Okada, 2004); questi si basano sull'ospite per ottenere l'accumulo della loro

informazione genetica. In particolare i virus ad RNA a singolo filamento positivo utilizzano i fattori dell'ospite per il processamento dell'mRNA e per la traduzione (review in Thivierge *et al.*, 2005). Sono stati identificati circa 100 geni dell'ospite implicati nell'accumulo virale del TBSV (*tomato bushy stunt virus*) e del BMV (*brome mosaic virus*), ma solo 14 di questi sono comuni per i due virus. I geni comuni codificano per proteine che appartengono principalmente a tre gruppi funzionali: biosintesi delle proteine, metabolismo proteico e rimodellamento del DNA/trascrizione (Panavas *et al.*, 2005). Sorprendentemente, non si è osservata alcuna sovrapposizione per i geni implicati nel nel targeting proteico, nell'associazione alle membrane, nel trasporto vescicolare o nel metabolismo lipidico (Panavas *et al.*, 2005); questo suggerisce che esistono sostanziali differenze tra questi due virus per quanto riguarda il trasporto intracellulare ed il targeting delle membrane dell'ospite.

Con poche eccezioni, fra cui i comovirus (nei quali il capsido contiene due tipi di proteine), i capsidi dei virus delle piante sono costituiti da un' unica proteina di rivestimento. La più sorprendente caratteristica dei virus vegetali a RNA è il caso frequente dei genomi divisi; molti virus hanno un genoma costituito da più di una molecola di RNA, ciascuna racchiusa in un capsido proteico separato ma identico.

1.6.2 Movimento dei virus vegetali

A. Movimento cellula-cellula:

I virus vegetali si muovono cellula-cellula attraverso i plasmodesmi e nelle parti distali della pianta attraverso il sistema vascolare. I virus codificano per una o più proteine non-strutturali specifiche per il movimento all'interno dell'ospite. Una proteina di movimento virale (MP) viene definita per la sua capacità di incrementare il limite di esclusione di massa (SEL) dei plasmodesmi e per la sua abilità di muoversi da cellula a cellula (review in Boevink & Oparka, 2005). La replicazione del genoma dei virus ad RNA positivo, che rappresentano la maggior parte dei virus vegetali, avviene nel citoplasma, in stretta associazione con le membrane; la replicazione degli altri tipi di virus, ad esempio quelli a DNA a singolo filamento o alcuni ad RNA a polarità negativa, avviene invece nel nucleo. Le proteine di replicazione sono coinvolte nell'amplificazione del genoma virale che deve poi essere trasportato alle cellule adiacenti; queste possono influenzare la quantità ed il tempo di sintesi delle MP che indirettamente condizionano le funzioni del movimento cellula-cellula (Watanabe *et al.*, 1987; review in Carrington *et al.*, 1996). Nella figura 4 sono riassunte

schematicamente le possibili interazioni virus-ospite durante il movimento cellula-cellula. Per invadere le cellule i virus devono muoversi dal loro sito di replicazione verso i plasmodesmi, poi attraversare questi canali intercellulari per entrare nella cellula vicina. Il trasporto cellula-cellula nella maggior parte dei virus è mediato da proteine di movimento virali, anche se la maggioranza del macchinario di trasporto è della cellula ospite. Uno di questi apparati di trasporto dell'ospite è costituito dal citoscheletro; questo agisce insieme al sistema di trasporto endomembrana della cellula ospite. Specificamente, molte MP virali probabilmente sono trasportate verso i plasmodesmi attraverso il reticolo endoplasmatico (ER), mentre i filamenti di actina/miosina potrebbero regolare il flusso di proteine verso il reticolo endoplasmatico (Boevink & Oparka, 2005) (Figura 5).

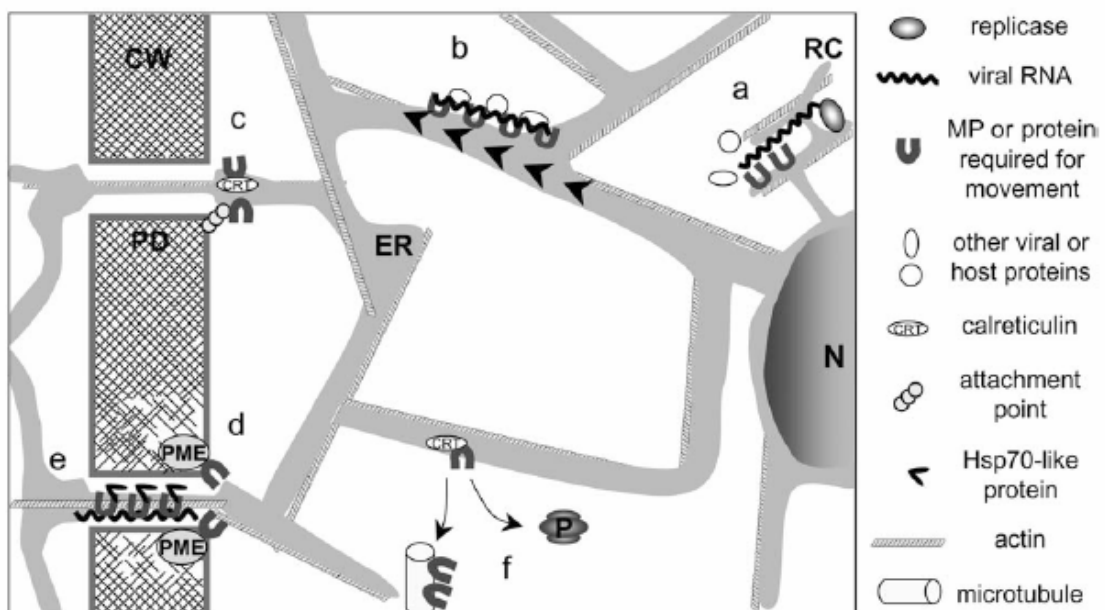


Figura 5 Schema di una possibile spiegazione delle interazioni proteine virus-ospite durante il movimento. Molti virus si replicano nei centri di replicazione (RC) ricchi in ER. L'RNA virale è legato da proteine coinvolte nel movimento ed il complesso di movimento (MC) è assemblato per mezzo di fattori virali e dell'ospite(a). Il MC poi si muove nelle membrane ER (indicato da frecce) (b). Le proteine virali potrebbero legarsi a marker periferici (c). Attraverso l'associazione con enzimi della parete, come ad esempio il PME, le proteine associate al movimento virale potrebbero allentare la struttura della parete cellulare (d), e le

proteine Hsp70-like potrebbero traslocare il complesso MP-RNA attraverso i pori (e). Alla fine dell'infezione, le proteine associate al movimento probabilmente vanno incontro a degradazione. Per il virus TMV, il calreticulino potrebbe avere un ruolo nel rimuovere le MP dall'ER affinché vengano degradate dal proteasoma (P), a causa dell'eccesso di legame con i microtubuli (f). N e CW indicano il nucleo e la parete cellulare, rispettivamente.

(Figura da Boevink & Oparka, 2005).

B. Movimento a lunga distanza:

Il movimento a lunga distanza (o floema-dipendente) richiede che il virus sia in grado di entrare ed uscire dal floema e dagli elementi vascolari. I plasmodesmi connettono anche le cellule dell'epiderma/mesofillo e le cellule del sistema vascolare, ma si pensa che il movimento a lunga distanza coinvolga fattori virali e dell'ospite differenti rispetto a quelli coinvolti nel movimento cellula-cellula; i plasmodesmi che connettono un vaso con la sua cellula compagna, infatti, posseggono una morfologia unica con un SEL notevolmente differente rispetto a quello osservato nei plasmodesmi tra le cellule del mesofillo (Kempers *et al.*, 1993).

Due momenti critici nel movimento a lunga distanza sono l'entrata e l'uscita dai vasi. Dal momento che in questi ultimi non avvengono attività come la sintesi proteica e la replicazione del genoma virale, il processo di entrata/uscita potrebbe coinvolgere diversi fattori sia dell'ospite che del virus (Carrington *et al.*, 1996). La deposizione del complesso di trasporto a lunga distanza nei vasi e il suo movimento presumibilmente passivo rimane però un processo ancora poco chiaro. L'entrata del complesso avviene attraverso i plasmodesmi con un meccanismo simile a quello utilizzato dalla pianta per caricare le proteine floematiche nei vasi. I plasmodesmi di questi sono ben adattati al trasporto di macromolecole solubili, permettendo che le proteine sintetizzate nelle cellule compagne di un determinato organo o tessuto siano trasportate a lunga distanza (Fisher *et al.*, 1992). Per quei virus nei quali è necessaria la formazione del virione completo per il trasporto a lunga distanza, il ruolo delle MP virali o dei fattori per il movimento a lunga distanza non è ancora ben chiarito. Se questi fattori sono trasportati, si possono muovere sia come proteine libere che come facenti parte del virione (Carrington *et al.*, 1996).

Nella figura 6 è riportato uno schema sul movimento cellula-cellula e sistemico.

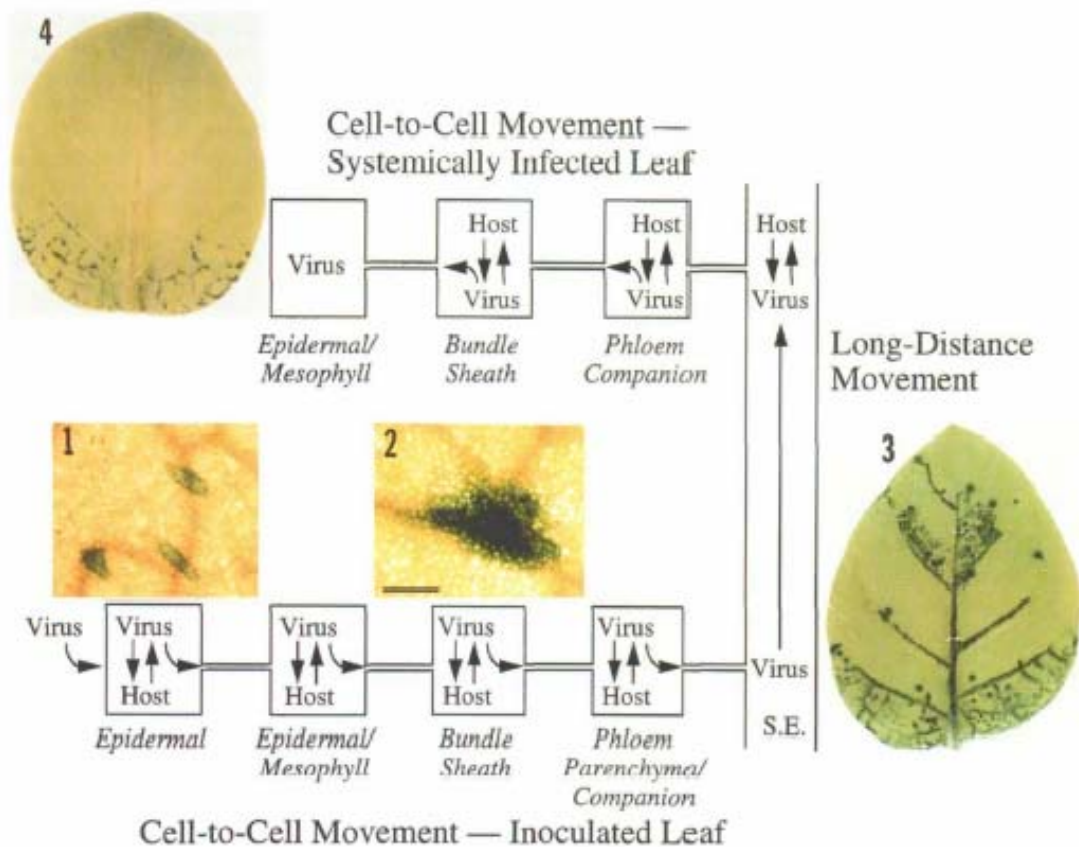


Figura 6 Movimento dei virus cellula-cellula e a lunga distanza nelle piante. Infezione con il virus TEV-GUS di Arabidopsis (1-2) o tabacco (3-4). Nelle fotografie da 1 a 3 è mostrato il movimento di TEV-GUS 24, 48 e 96 ore dopo l'inoculo (p.i.) rispettivamente nelle foglie inoculate. La fotografia 4 mostra, invece, il movimento a lunga distanza in una foglia apicale non inoculata, dove il virus si sta muovendo cellula-cellula dopo essere fuoriuscito dal sistema vascolare. Le interazioni tra il virus e l'ospite e la direzione del movimento del virus sono rappresentate da frecce nello schema. (Foto da Carrington *et al.*, 1996).

1.7 VIRUS DEL MOSAICO DEL CETRIOLO (CMV)

1.7.1 *Struttura delle particelle*

Il virus del mosaico del cetriolo (*'Cucumber mosaic virus'*) (CMV) appartiene al genere *Cucumovirus*, famiglia *Bromoviridae*. Le particelle di CMV hanno una forma icosaedrica e contengono un genoma tripartito, funzionalmente diviso, ad RNA positivo, chiamato RNA 1-3 (Palukaitis *et al.*, 1992). Gli RNA 1 e 2 sono incapsidati separatamente, mentre l'RNA 3 e l'RNA subgenomico 4 sono incapsidati nella stessa particella (Haibli & Francki, 1974; Lot & Kaper, 1976). Le particelle hanno un diametro di 29 nm, contengono 180 subunità di proteina di rivestimento (CP) e sono costituite per il 18% da RNA. Le particelle di CMV sono stabilizzate da interazioni RNA-proteina e particelle biologicamente attive possono essere riassemblate facilmente a partire da RNA e CP (Kaper, 1969). A differenza dei bromovirus, che sono costituiti da particelle simili e ben caratterizzate, i cucumovirus non formano particelle vuote *in vitro*, non si 'spacchettano' a pH 7.0 e sono stabili a pH 9.0 (Smith *et al.*, 2000). La struttura delle particelle di CMV è stata analizzata per cristallografia a raggi X ad alta risoluzione (Wikoff *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2000), con una risoluzione di 3,2 Å. La regione N-terminale di 22 amino acidi della CP ha una elevata densità di residui di arginina, una carica positiva di +7 e molto probabilmente interagisce con l'RNA; questa regione ricca in arginine è necessaria per la formazione delle particelle virali (Schmitz & Rao, 1998). Una regione del capsido (il loop H-I) è molto conservata tra i cucumovirus e potrebbe essere coinvolta in interazioni con i metalli (Smith *et al.*, 2000); questo loop, inoltre, è altamente antigenico ed è coinvolto nella trasmissione attraverso gli afidi.

1.7.2 *Struttura del genoma*

Il genoma del CMV è costituito da 3 RNA messaggeri positivi a singolo filamento, chiamati RNA 1, 2 e 3 in ordine di grandezza decrescente (Figura 8). Tutti e tre gli RNA virali (RNA 1, 2, 3) sono essenziali affinché l'infezione sistemica delle piante sia efficace (Rao & Francki, 1981; Palukaitis *et al.*, 1992)

L'RNA 1 è monocistronico e codifica per la proteina 1a in una singola *open reading frame* (ORF). L'RNA 2 è bicistronico e codifica per le proteine 2a e 2b in due differenti ORF, che in parte si sovrappongono (Figura 8). L'RNA 3 è anch'esso bicistronico e codifica per le proteine 3a (proteina di movimento) e 3b (proteina di

rivestimento) in due ORF non sovrapposte. Le proteine 1a, 2a e 3a sono tradotte dagli RNA genomici 1, 2 e 3 rispettivamente (Schwinghamer & Symons, 1977), mentre le proteine 2b e 3 b sono tradotte dagli RNA messaggeri subgenomici RNA4A ed RNA 4 rispettivamente (Figura 8) (Schwinghamer & Symons, 1975; Ding *et al.*, 1994).

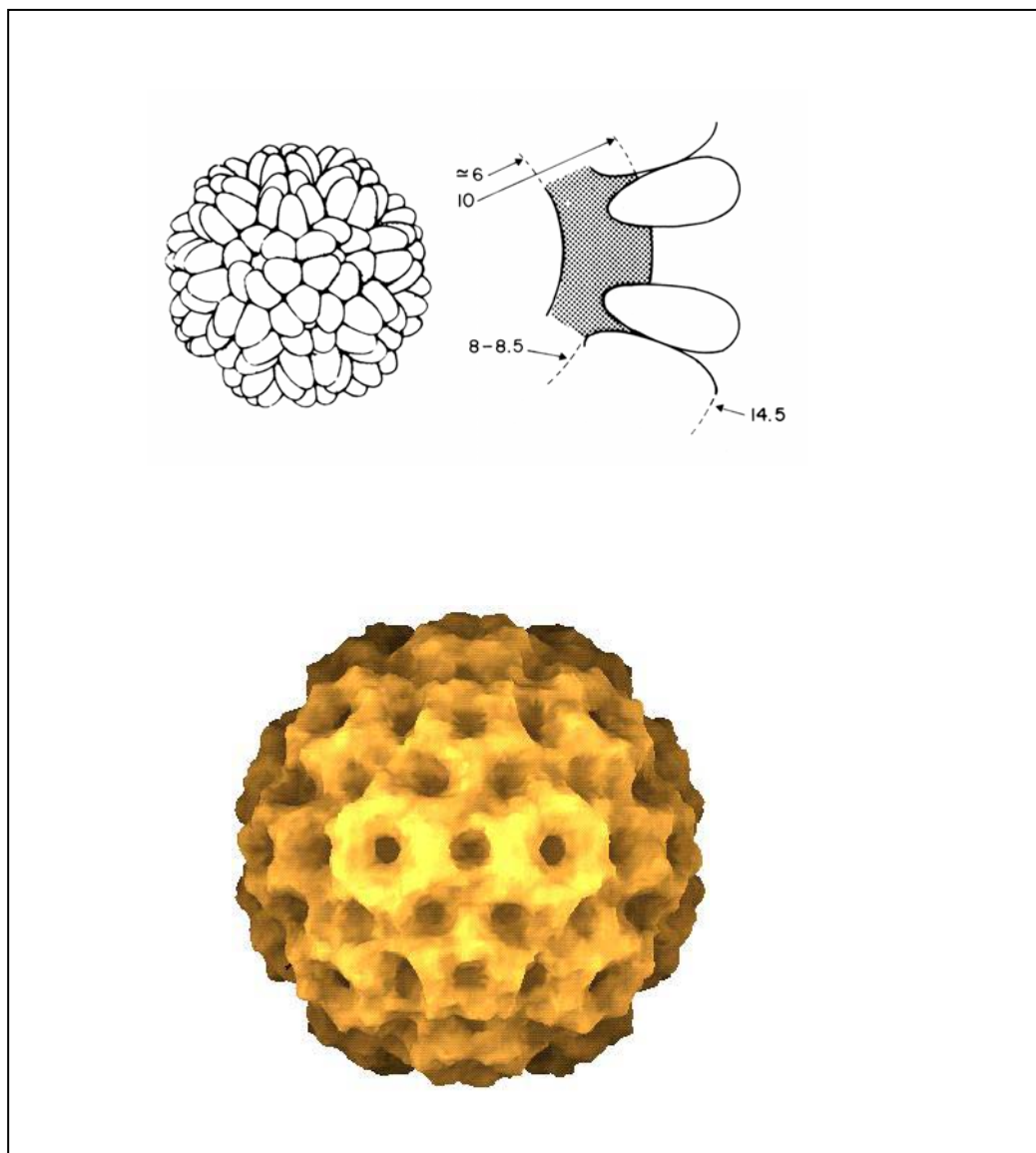


Figura 7 Struttura del virus del mosaico del cetriolo (CMV) (Figura ripresa da Smith *et al.*, 2000).

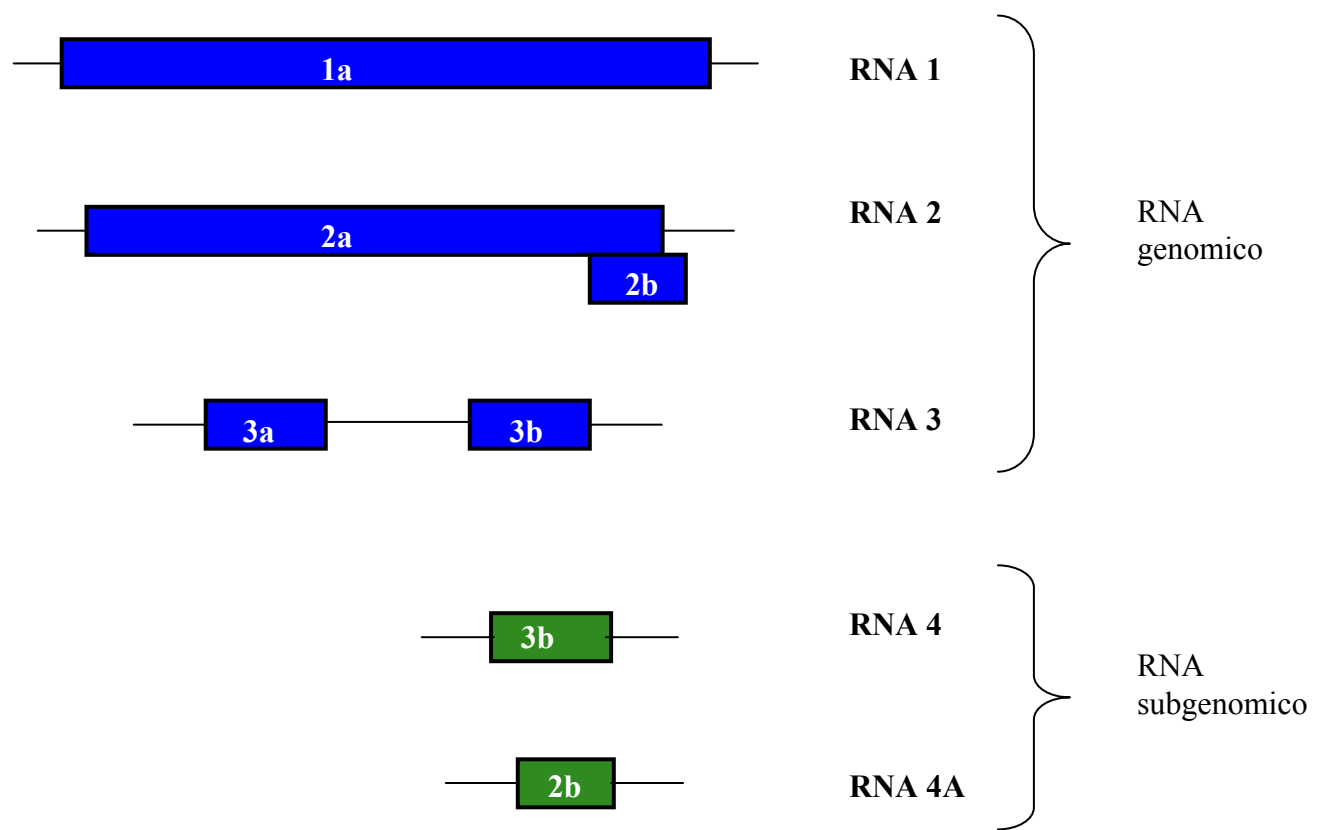


Figura 8 Organizzazione del genoma del CMV costituito da 3 RNA genomici (RNA 1-3) e 2 RNA subgenomici (RNA 4 e 4A). (Figura ripresa ed adattata da Palukaitis & Garcia-Arenal, 2003).

1.7.3 Funzione delle proteine

Le cinque proteine codificate dal CMV sono state analizzate per capire le loro funzioni. La maggior parte del lavoro è stato compiuto a livello genetico, ma alcuni studi sono stati condotti sulle proteine purificate.

Proteina 1a:

La proteina 1a è codificata dall'RNA 1, ed è una proteina coinvolta nella replicazione del genoma virale, in quanto è stato dimostrato essere una componente della replicasi isolata dal CMV ed è stata localizzata a livello della membrana vacuolare. L'RNA 1 contiene sequenze che sono conservate nelle metiltransferasi (Mi & Stollar, 1991; Rozanov *et al.*, 1996) e nelle elicasi (Hodgman, 1988; Gorbalenya *et al.*, 1989; Habili & Simons, 1989). La proteina 1a contiene due domini funzionali: un dominio N-terminale che è un putativo dominio di metiltransferasi coinvolto nella maturazione dell' RNA genomico e subgenomico ed un dominio C-terminale che è una putativa elicasi (Habili & Simons, 1989; Rozanov *et al.*, 1992). Questi due domini della proteina 1a interagiscono tra loro nel sistema doppio ibrido in lievito (O'Reilly *et al.*, 1998).

Proteina 2a:

La proteina 2a è codificata dall'RNA 2 ed è stata localizzata a livello del tonoplasto (Cillo *et al.*, 2002). Questa proteina contiene dei motivi tipici delle polimerasi RNA-dipendenti (RdRp) (Poch *et al.*, 1989). La replicasi attiva del CMV è costituita dalle polimerasi 1a e 2 a, oltre che da altri fattori. Questa RdRp partecipa alla sintesi sia dell'RNA a doppio filamento che di quello a singolo ed è stata isolata e purificata da tessuti infetti di tabacco (Hayes & Buck, 1990).

Proteina 2b:

La proteina 2b è anch'essa codificata dall'RNA 2, ma è espressa da un RNA subgenomico, detto RNA 4A (Ding *et al.*, 1994) ed è localizzata a livello nucleare. Questa proteina è coinvolta nella specificità d'ospite, nella soppressione del '*post transcriptional gene silencing*' (PTGS) e nella determinazione della virulenza (Lucy *et al.*, 2000). E' stato ipotizzato che la proteina 2b potrebbe inattivare il segnale mobile che induce il silenziamento sistemico (Guo & Ding, 2002). Inoltre sembra che la proteina 2b possa anche avere un ruolo diretto nel movimento virale (Shi *et al.*, 2002).

Proteina 3a:

La proteina 3a è codificata dall'RNA 3; questa proteina non è necessaria per la replicazione virale, ma è essenziale per il movimento del virus (Boccard &

Baulcombe, 1993; Canto *et al.*, 1997). Essa è stata localizzata a livello dei plasmodesmi di cellule infettate. Questa proteina, definita come proteina di movimento (MP), si lega ad acidi nucleici a singolo filamento *in vitro*, senza però specificità di sequenza (Li & Palukaitis, 1996; Vaquero *et al.*, 1997). La MP è necessaria sia per il movimento cellula-cellula, che per quello a lunga distanza (questo aspetto sarà trattato più approfonditamente nel paragrafo successivo, riguardante il movimento del CMV).

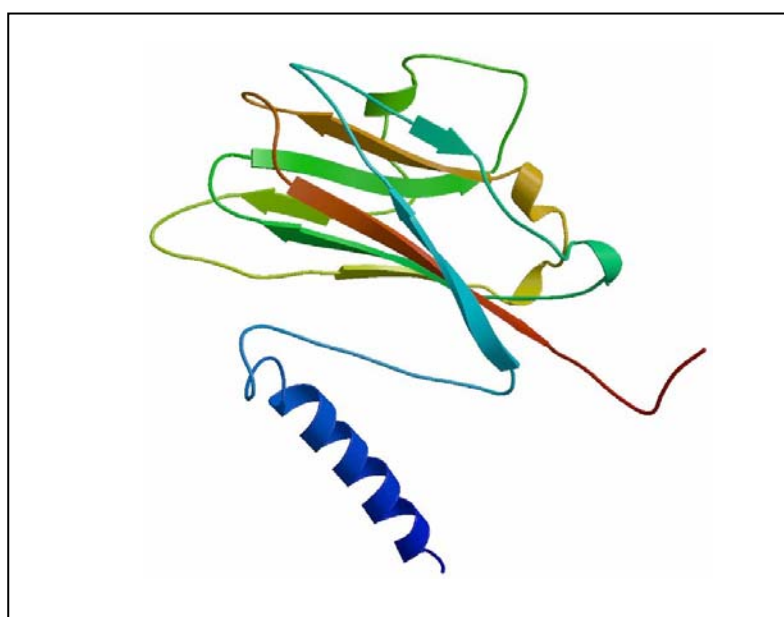


Figura 9 Struttura secondaria di una subunità della proteina di rivestimento del CMV (Figura ripresa da Smith *et al.*, 2000).

Proteina 3b:

La proteina 3b, o proteina di rivestimento (Figura 9), è codificata dall'RNA 3, ma è espressa dall'RNA subgenomico RNA 4 (Schwinghamer & Symons, 1975). Le proteine di rivestimento virali (CP) hanno un ruolo cruciale in molti aspetti del ciclo infettivo e riproduttivo. Queste sono definite proteine di rivestimento per la loro capacità di formare strutture ordinate che racchiudono l'acido nucleico virale, ma in

realità sono coinvolte praticamente in ogni aspetto della moltiplicazione virale, inclusa la replicazione degli acidi nucleici, nel movimento tra le cellule e tra gli organi e nel passaggio tra piante infette e non infette attraverso vettori biologici. Le CP sono definite per il loro ruolo nell'incapsidamento, che protegge l'informazione genetica dalla degradazione. In molti virus vegetali, però, la CP ha un ruolo essenziale anche nel movimento virale attraverso una pianta infettata; o nel movimento sistemico (foglia-foglia attraverso i vasi) o sia in quello sistemico che in quello cellula-cellula. La CP del *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) è una proteina multifunzionale di 24 KDa implicata nelle seguenti funzioni:

- Sintomatologia
- Movimento sia cellula-cellula che sistemico
- Formazione di capsidi
- Scelta dell'ospite
- Trasmissione attraverso gli afidi.

1.7.4 Movimento virale

A. Movimento cellula-cellula:

Affinchè l'infezione sia efficiente, il virus deve essere in grado di muoversi dalla cellula iniziale infettata alle cellule vicine attraverso i plasmodesmi (movimento cellula-cellula) fino a raggiungere il floema per invadere le parti distali della pianta (movimento a lunga distanza). Il movimento cellula-cellula richiede la presenza delle proteine di movimento virali (MPs), che mediano il trasporto dei genomi virali attraverso i plasmodesmi. In numerosi casi la proteina di movimento è sufficiente per il movimento cellula-cellula ed il virus si muove come un complesso ribonucleoproteico (ad esempio il virus del mosaico del tabacco, TMV). In altri casi, invece, la proteina di rivestimento (CP) è anch'essa necessaria per questo processo; si formano delle strutture tubulari che attraversano la parete cellulare attraverso dei plasmodesmi modificati (ad esempio i tospovirus, comovirus e nepovirus) e il virus si muove come particella virale integra (Carrington *et al.*, 1996; Lazarowitz & Beachy, 1999). Anche per i cucumovirus è necessaria la proteina di rivestimento (CP) per il movimento cellula-cellula, ma non si ha la formazione di particelle virali complete (Kaplan *et al.*, 1998). In realtà tutte le proteine codificate dal CMV sembrano implicate per il movimento cellula-cellula, ma la proteina 3a è considerata la proteina

di movimento principale. Questa si lega all'RNA virale per formare un complesso che probabilmente interagisce con le proteine dei plasmodesmi dell'ospite (Blackman *et al.*, 1998; Vaquero *et al.*, 1996). Questo complesso non entra però nei plasmodesmi, per cui si è ipotizzato che questo potrebbe essere implicato nel trasporto dell'RNA attraverso i plasmodesmi oppure nel facilitare il movimento dell'RNA (Nurkiyanova *et al.*, 2001). Differenti studi hanno dimostrato che la CP è necessaria per il movimento cellula-cellula, ma ancora non è stato chiarito come questa sia implicata. E' stato proposto un modello in cui si ipotizza che il ruolo della CP nel movimento cellula-cellula sia quello di indurre un cambiamento conformazionale nella proteina 3a, che implichi anche un cambiamento nella funzione della proteina di movimento. Il quadro che emerge è che la proteina 3a è direttamente implicata nel movimento cellula-cellula, mentre la CP non è direttamente implicata, ma condiziona indirettamente questo movimento (Palukaitis & Garcia-Arenal, 2003).

B. Movimento a lunga distanza:

Il movimento sistemico del CMV avviene esclusivamente attraverso il floema sotto forma di virione completo. E' stato proposto che l'RNA e la CP sono trasportate (dalla MP) nei elementi vascolari e lì assemblate in particelle virali (Blackman *et al.*, 1998; Palukaitis & Garcia-Arenal, 2003); queste particelle sono poi traslocate attraverso il sistema vascolare. Delezioni nella sequenza N-terminale della CP hanno un effetto sul movimento del virus indipendentemente dall'incapsidamento, in maniera ospite-specifica; questi dati indicano che la proteina di rivestimento è essa stessa, ma non il virione completo, essenziale per il movimento del CMV a lunga distanza (Schmitz & Rao, 1998).

C. Movimento pianta-pianta:

Anche se un virus è in grado di diffondersi all'interno di una pianta individuale, il suo successo biologico è limitato se non è in grado di essere trasportato in una nuova pianta non infetta. Il genoma virale è protetto dal capsido durante il suo 'viaggio' da una pianta all'altra. Il CMV è trasportato attraverso gli afidi, che fungono da vettore. Non sorprendentemente la CP ha un ruolo fondamentale anche nella determinazione della specificità della trasmissione da pianta a pianta. Il CMV è trasmesso in maniera non-persistente attraverso afidi, cioè il virus non è in grado di circolare o replicarsi all'interno del vettore. Il CMV è acquisito dal vettore semplicemente con il contatto con lo stiletto, rendendo il tempo di acquisizione e ritenzione abbastanza breve. In particolare, il virus interagisce con la porzione

anteriore del tratto alimentare dell'afide, dal quale può essere successivamente inoculato per 'egestione'; è proprio attraverso lo stiletto che avviene un'interazione specifica. A differenza di molti virus, il CMV non necessita di proteine 'helper' per la trasmissione, di conseguenza la sequenza di riconoscimento per l'afide deve risiedere sul capsido stesso; è infatti la CP del CMV che interagisce esclusivamente con il vettore e sono state identificate due regioni della CMV-CP importanti per la trasmissione attraverso gli afidi (Smith *et al.*, 2000).

1.7.5 Resistenza e risposta dell'ospite

A. Resistenza derivata dall'ospite:

La resistenza all'infezione da CMV è stata descritta per un elevato numero di specie vegetali. In molti casi, la resistenza osservata era multigenica e recessiva, ma non è mai stata caratterizzata particolarmente in dettaglio (Caranta *et al.*, 2002; Chaim *et al.*, 2001; Gruebe *et al.*, 2000). In altri casi, invece, il fenotipo osservato è stato caratterizzato maggiormente in dettaglio, anche se attualmente non si sa nulla di certo sulla genetica della resistenza al CMV (Celebi *et al.*, 1998; Dufour *et al.*, 1989; Gal-On *et al.*, 1994; Kobori *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000).

B. Resistenza derivata dal patogeno e mediata dal transgene:

Sono stati espressi in piante transgeniche numerosi geni e segmenti di geni virali che hanno conferito resistenza al CMV. Sono stati descritti numerosi esempi di resistenza mediata dalla proteina di rivestimento (CP) sia in tabacco che in altre specie. Il livello di resistenza ottenuto varia considerevolmente sia con costrutti differenti che in specie diverse. In alcuni casi non è stata ottenuta resistenza, in altri casi questa era specifica per i ceppi dello stesso serogruppo dal quale derivava il gene della CP. La resistenza ad ampio spettro verso ceppi di CMV appartenenti sia al serogruppo I che al serogruppo II è stata ottenuta solo in pochi casi (review Palukaitis & Garcia-Arenal, 2003).

La resistenza al CMV è stata ottenuta esprimendo in piante transgeniche la proteina di movimento 3a mutata nella porzione N-terminale (Zhang *et al.*, 1999), anche se ancora non è chiaro se questa resistenza sia ad ampio spettro o ai ceppi di CMV da cui deriva il transgene.

C. Risposte dell'ospite:

L'analisi delle risposte dell'ospite all'infezione del CMV può essere considerata sotto diversi aspetti: risposte di resistenza, risposte generali all'infezione e risposte specifiche ad un particolare gene virale.

L'infezione del tabacco da parte del CMV generalmente produce un mosaico nel quale le aree verde chiaro (o gialle) contengono il virus, e le 'isole' verde scuro contengono solo una piccola quantità di virus (Loebenstein *et al.*, 1997).

La resistenza all'infezione virale generalmente si manifesta con una risposta di ipersensibilità seguita da una resistenza sistemica acquisita verso un ampio spettro di patogeni mediata dall'acido salicilico (SA), come descritto nel paragrafo 1.4. Il pretrattamento del tabacco con SA non inibisce né la replicazione né il movimento cellula-cellula del CMV, ma ritarda solamente il movimento a lunga distanza (Murphy & Carr, 2002; Naylor *et al.*, 1998).

Sono stati compiuti studi sui cambiamenti dell'espressione genica in *A.thaliana* in seguito ad infezione con CMV per mezzo di ibridazione su microarray (Whitham *et al.*, 2003). Sono stati identificati 114 geni indotti in risposta all'infezione; la maggior parte dei geni indotti era coinvolti in uno di questi processi: metabolismo; trasduzione del segnale; trascrizione, organizzazione cellulare, difesa, morte o invecchiamento cellulare. Circa il 20% dei geni indotti, invece, non sono stati classificati. In generale, l'infezione da CMV ha mostrato l'induzione transiente di alcuni geni correlati alle risposte di difesa. La maggior parte di questi geni indotti 2 giorni dopo l'infezione non lo erano 3-5 giorni dopo l'inoculo (dpi), mentre un nuovo set di geni indotti 4 dpi erano sottoregolati di nuovo 5 dpi (Whitham *et al.*, 2003). Non è però chiaro come questi cambiamenti nei livelli di espressione genica siano correlati con la distribuzione spaziale del virus nel tempo nei tessuti infetti.

1.8 ANTICORPI RICOMBINANTI

1.8.1 Immunoglobuline

Le immunoglobuline (Ig) si dividono in cinque gruppi principali detti IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Le IgG sono le più abbondanti e sono costituite da una molecola a forma di Y (Figura 10) del peso molecolare di 150 Kda, la quale consta a sua volta di due catene pesanti H (*heavy chains*), e due leggere L (*light chains*). Come si osserva dalla figura, le due catene L occupano solo due braccia della Y, mentre le H occupano sia le braccia che il tronco. Le catene L sono unite alle H da due ponti disolfuro. Il sito di legame all'antigene sta a ciascuno dei due estremi delle braccia della Y e concorrono a formarlo sia la catena H che la L. Le IgG sono costituite sia da una regione variabile (evidenziata in celeste nella figura 10) che da una regione costante (evidenziata in violetto nella figura 10). All'interno della regione variabile vi sono poi delle regioni ipervariabili che costituiscono il 15-20 % del dominio variabile e che formano il sito di legame all'antigene dell'anticorpo. Queste regioni vengono anche definite come regioni determinanti la complementarità (*complementarity-determining regions, CDRs*) poichè il sito di legame all'antigene è complementare alla struttura dell'epitopo.

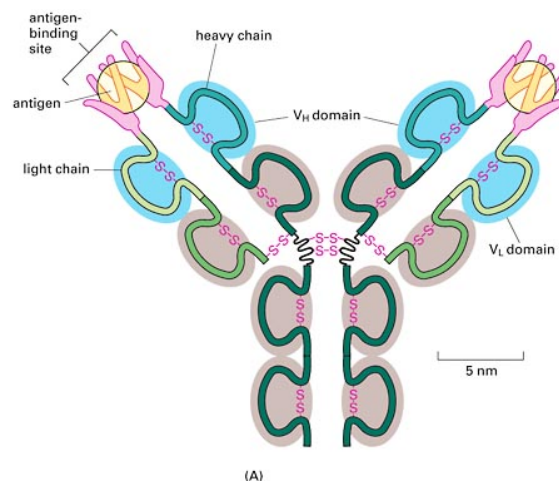


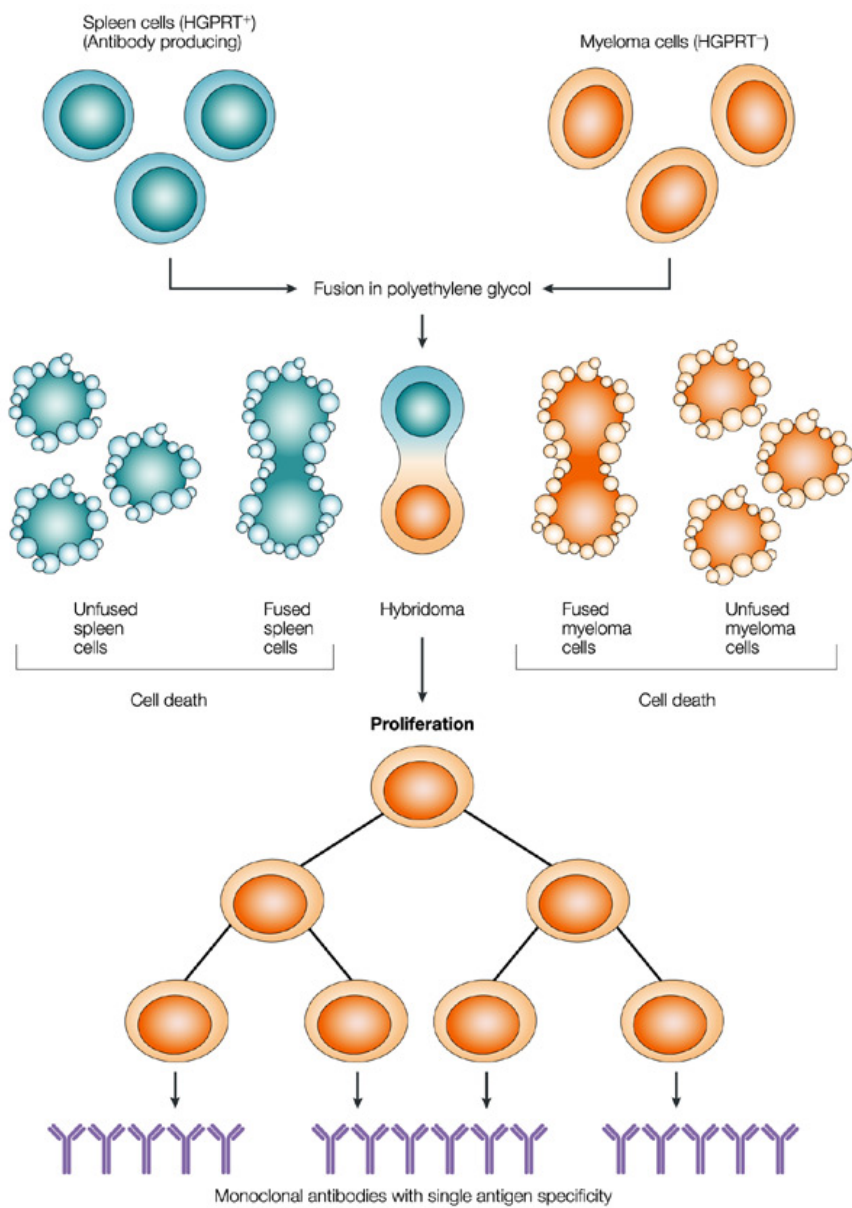
Figura 10 Struttura secondaria dell'immunoglobulina. Le regioni variabili sono ripiegate in domini, ognuno contenente circa 100-110 residui aminoacidici e un ponte disolfuro intracatena che forma un 'loop' di 60 aminoacidi. (Figura ripresa da Kuby, 1994).

1.8.2 Aspetti generali sugli anticorpi ricombinanti

Gli anticorpi, oltre alla loro importante funzione fisiologica, grazie alla capacità di legare l'antigene con alta specificità ed affinità, si sono dimostrati strumenti molecolari di enorme valore applicativo. Essi sono utilizzati in vari campi della ricerca soprattutto in quello medico-biologico. Vengono da tempo utilizzati in sistemi diagnostici per il rilevamento ed il dosaggio di varie sostanze, in sistemi cromatografici ad affinità e in campo terapeutico.

Una grande rivoluzione è stato l'avvento della tecnologia degli anticorpi monoclonali (Kohler e Milstein, 1975) che ha permesso di sviluppare sistemi per la produzione di anticorpi specifici in quantità adeguate per varie applicazioni. Tale tecnica permette, infatti, di selezionare e produrre molecole anticorpali specifiche in seguito alla fusione di linee di linfociti che producono anticorpi con linee tumorali (tecnologia degli ibridomi) (Figura 11). Il loro impiego, però, è limitato a causa della scarsa stabilità degli ibridomi (linee cellulari immortalizzate) e della derivazione delle molecole anticorpali, in parte, da linee tumorali. Pertanto l'uso di anticorpi monoclonali in terapia umana non manca di fattori di rischio legati alla possibile contaminazione con DNA o virus, derivando da organismi eterologhi (animali immunizzati), gli anticorpi da ibridomi potrebbero scatenare risposte immunogeniche quando impiegati sull'uomo. Le immunoglobuline, inoltre, sono di dimensioni relativamente grandi (150 KDa) e richiedono complessi meccanismi di ripiegamento e di assemblaggio all'interno della cellula per essere espresse in forma funzionale.

Allo scopo di superare problemi di carattere strutturale e di espressione in organismi eterologhi sono stati creati, mediante ingegneria proteica, molecole anticorpali o frammenti anticorpali ricombinanti. La particolare struttura a domini delle immunoglobuline ha permesso la costruzione di nuove molecole anticorpali in cui i domini responsabili del legame per l'antigene (Fv, Fab) e delle funzioni effettrici (Fc) possono essere separati o scambiati con quelli di altri anticorpi. In tal modo è stato possibile costruire anticorpi ricombinanti, o frammenti di questi, in grado di operare in ambienti diversi da quello di provenienza (Winter & Milstein, 1991) (Figura 12).



Nature Reviews | Immunology

Figura 11 Fusione cellulare e produzione di anticorpi monoclonali. Rappresentazione schematica della tecnologia dell'ibridoma (Figura ripresa da Alkan, 2004)

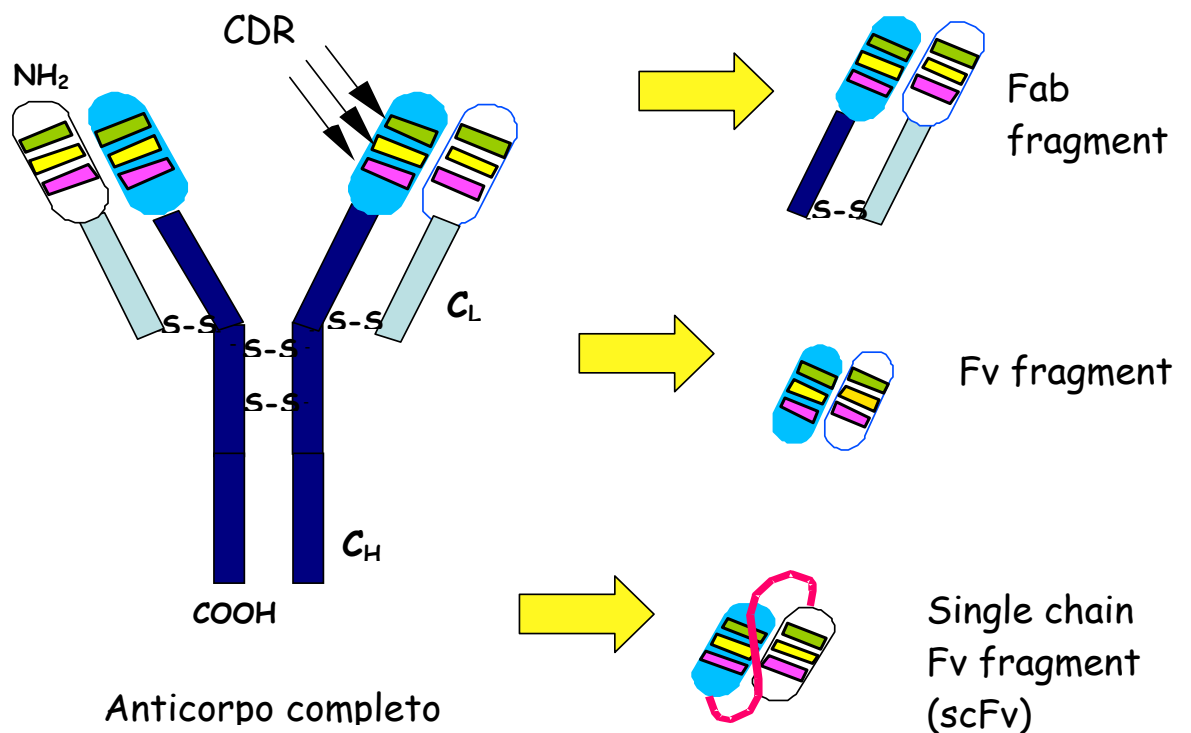


Figura 12 Rappresentazione schematica di una molecola di immunoglobulina e di alcune forme di frammenti anticorpali ricombinanti (frammento Fab, frammento variabile Fv, frammento variabile a singola catena, scFv).

La produzione di molecole anticorpali in sistemi procariotici (Skerra & Pluckthun, 1988) ha offerto innumerevoli vantaggi, come la rapidità di crescita (che ne permette una veloce ed economica produzione su larga scala) e la facilità di manipolazione del materiale genetico. Inoltre le tecniche di biologia molecolare consentono di studiare gli effetti di modifiche strutturali della molecola

anticorpale mediante mutagenesi e di costruire repertori sintetici di anticorpi da cui selezionare molecole con specificità desiderata (Pluckthun, 1991).

1.8.3 Frammenti anticorpali a singola catena (scFv)

Allo scopo di superare i problemi connessi all'espressione di molecole anticorpali intere in cellule eterologhe, sono stati creati frammenti anticorpali di più piccole dimensioni (12-50 KDa). In un anticorpo il sito di legame con il proprio antigene è composto da 6 'complementarity determining regions' (CDR), o regioni ipervariabili, tre nel dominio variabile della catena leggera (VL) e tre in quello della catena pesante (VH). Tra questi i frammenti Fv, costituiti dall'associazione dei domini V_H e V_L, sono le più piccole molecole derivate dagli anticorpi in grado di mantenere inalterate le capacità di legame dell'antigene. Pur tuttavia essi mostrano una bassa affinità di associazione dei domini V_H e V_L a causa delle ridotte dimensioni delle due molecole e dell'assenza di legami covalenti, provocando un'inevitabile perdita di stabilità della molecola. Per ovviare a questo inconveniente sono stati costruiti frammenti ricombinanti a singola catena ('single-chain Fv', scFv) che sono, invece, risultati particolarmente stabili. In una molecola scFv le regioni V_H e V_L, responsabili del riconoscimento dell'antigene, sono legate covalentemente tra loro mediante un peptide flessibile ('linker') che lega l'estremità C-terminale della V_H all'estremità N-terminale della V_L, o viceversa (Bird *et al.* 1988; Huston *et al.*, 1988; Glockshuber *et al.*, 1990) (Figura 12). Caratteristica importante di un buon "linker" è la capacità di permettere alla molecola anticorpale una certa flessibilità necessaria per un efficace adattamento dell'epitopo riconosciuto. Inoltre esso deve poter congiungere i due domini variabili senza interferire con il ripiegamento molecolare degli stessi e deve essere resistente alla degradazione proteolitica (Huston *et al.*, 1988). Sulla base di queste caratteristiche sono stati costruiti diversi "linker", ed il più stabile si è dimostrato quello costituito da un modulo di quattro glicine e una serina ripetuto tre volte (Gly₄Ser)₃ (Huston *et al.*, 1988), o da varianti con qualche sostituzione in questo motivo. La caratteristica essenziale deve essere quella di non contenere residui carichi allo scopo di rendere minime le interferenze con i residui della superficie dei domini V_H e V_L (Huston *et al.*, 1988). La maggior parte dei scFv non presenta particolari problemi di assemblaggio poichè, in alcuni casi, sono stati stabilmente

accumulati in sistemi di espressione batterica (Tavladoraky *et al.*, 1993; Biocca *et al.*, 1993; Mhashilkar *et al.*, 1995). Il formato scFv offre dei notevoli vantaggi rispetto agli anticorpi monoclonali, poiché oltre a mantenere una affinità di legame per l'antigene paragonabile a quella dell'anticorpo completo da cui deriva, non presenta problemi di assemblaggio e grazie alle piccole dimensioni della molecola (27-30 KDa) riesce a raggiungere bersagli inaccessibili a molecole più grandi. Inoltre la mancanza della regione costante, non necessaria per la maggior parte delle applicazioni, riduce il livello di interazioni aspecifiche.

Un ulteriore vantaggio dei frammenti scFv è dato dalla possibilità di ottenere l'espressione sulla superficie di virus batterici (fagi) come prodotto di fusione con il gene che codifica la normale proteina capsidica virale ('phage display'). Fagi che esprimono scFv con specificità diverse di legame costituiscono un repertorio molecolare.

1.9 REPERTORI MOLECOLARI: LE LIBRERIE “PHAGE DISPLAY”

1.9.1 Repertori molecolari

Nel sistema immunitario, per mezzo dell'assemblaggio in maniera combinatoriale dei segmenti codificati dalla linea germinale, si crea una vasta collezione di siti per il legame all'antigene. Questo produce un repertorio di linfociti B naive, ognuno che esprime sulla propria superficie un sito unico di legame. L'esposizione all'antigene fa sì che da questo repertorio vengano selezionati quei linfociti che producono anticorpi reattivi con l'antigene, e favorisce l'incorporazione delle mutazioni somatiche nei geni V, permettendo la successiva selezione di mutazioni che portano al miglioramento dell'affinità per l'antigene (Figura 13).

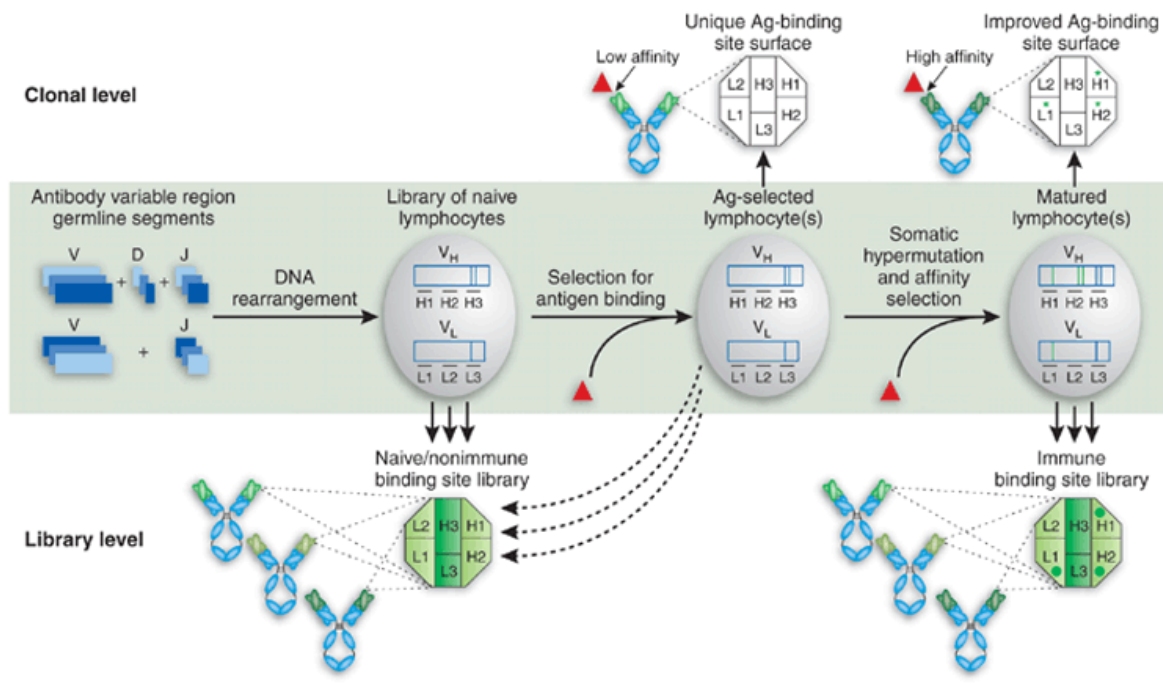


Figura 13 Generazione della diversità di siti di legame nel sistema immunitario. Segmenti codificati dalla linea germinale (V, D e J per la V_H, V e J per la V_L). Il processo di rimodellamento del DNA ha come bersaglio le due regioni CDR3, cuore del sito di legame, indicate come H3 ed L3. Le altre CDR (indicate come H1, H2, L1 ed L2) sono codificate da circa 100 diversi geni. (Figura da Hoogenboom, 2005).

Un repertorio molecolare è un insieme di differenti varianti molecolari di strutture proteiche o peptidiche. Una delle metodologie maggiormente usate nella costruzione dei repertori molecolari è basata sull'uso dei fagi filamentosi che infettano *Escherichia coli* (batteriofagi). E' infatti possibile inserire sequenze aminoacidiche in regioni "tolleranti" delle proteine strutturali di alcuni batteriofagi, senza alterare l'infettività virale. Il vantaggio che questo sistema sperimentale, detto del "phage display", offre è la possibilità di associare nella stessa particella fagica il fenotipo, rappresentato dalla proteina/peptide esposta sulla superficie virale, e il relativo genotipo, incluso nel genoma del fago. Ciò permette, una volta isolato un fago in virtù delle sue caratteristiche di legame, di risalire direttamente al genotipo, semplificando le procedure di clonaggio. Le molecole così selezionate possono poi essere espresse in forma solubile fuse con opportuni peptidi 'tag' che ne permettono una rapida identificazione e purificazione.

La tecnologia del 'phage display' ha portato alla costruzione di molti repertori molecolari interamente *in vitro* da cui sono stati selezionati anticorpi ad alta affinità. Alcuni di questi repertori sono stati costruiti fondendo oligopeptidi a sequenza casuale all'amino-terminale della proteina pVIII del capsido del batteriofago filamentoso f1 (Felici *et al.*, 1991), all'amino-terminale della proteina pVI del batteriofago filamentoso phi Lf (Hufton *et al.*, 1999) o al carbossi-terminale della proteina D del batteriofago lambda (Sternberg & Hoess, 1995). Attraverso una operazione di "setacciamento" ("biopanning"), che prevede una serie ripetuta di cicli di selezione, di eluizione e di amplificazione, è possibile isolare fagi che presentano sul capsido peptidi in grado di interagire con una specifica proteina bersaglio (anticorpo, recettore, enzima ecc.). Dal paragone delle sequenze aminoacidiche dei ligandi selezionati è quindi possibile individuare una sequenza "consensus" che può fornire informazioni sulla struttura del sito di legame della proteina bersaglio. Questa tecnologia è stata utilizzata anche per studiare le interazioni molecolari che sono alla base della trasduzione di segnali extracellulari (Dente *et al.*, 1997) per determinare la specificità di riconoscimento di domini proteici (Vaccaro *et al.*, 1997) e, più in generale, per isolare peptidi capaci di legare in modo specifico proteine ed acidi nucleici (Meth, 1993).

Una delle applicazioni di maggior successo del "phage display" è rappresentata dalla costruzione di repertori di anticorpi ricombinanti. Queste ampie collezioni di

varianti anticorpali (nell'ordine di complessità di 10^8 - 10^{10}) “mimano” la variabilità del sistema immunitario animale, fornendo la possibilità di selezionare molecole ad alta affinità e specificità in modo molto più semplice, economico ed eticamente accettabile rispetto al sistema classico di isolamento di immunoglobuline attraverso l'immunizzazione di animali (Marks *et al.*, 1992). L'esposizione sulla superficie di fagi filamentosi di frammenti di anticorpi (McCafferty *et al.*, 1990; Barbas *et al.*, 1991; Breitling *et al.*, 1991; Garrard *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991), grazie alla fusione della proteina minore di superficie (pIII) del fago M13, ha fornito un potente mezzo per selezionare anticorpi con predefinite specificità di legame da repertori molecolari di geni V, codificanti i domini variabili delle immunoglobuline (Winter *et al.*, 1994). Partendo da repertori derivati da geni V, provenienti da topi immunizzati e costituiti da combinazioni casuali catena pesante (V_H)-catena leggera (V_K), sono stati isolati frammenti anticorpali ad alta affinità di legame (Clackson *et al.*, 1991), ed anche con attività neutralizzante contro virus (Barbas *et al.*, 1992). Infatti la variabilità dei repertori anticorpali può essere aumentata mediante riarrangiamenti dei geni V *in vivo*, basata sull'assortimento casuale di geni V_H e V_K che favorisce la possibilità di isolare ligandi con buona affinità (Marks *et al.*, 1991). Una strategia alternativa *in vitro* permette di introdurre variabilità a livello delle CDR₃ (complementarity determining region 3) mediante mutagenesi casuale per PCR nei domini variabili sia delle catene pesanti che delle catene leggere (Hoogenboom e Winter, 1992). I repertori fagici presentano un particolare vantaggio quando si rendono necessari ligandi specifici difficili da ottenere attraverso l'immunizzazione, ad esempio contro antigeni “self” (Griffiths *et al.*, 1993; Marks *et al.*, 1993) o proteine del lumen del reticolo endoplasmatico (Nissim *et al.*, 1994). Anche anticorpi da “single pot libraries”, (repertori fondati su una singola sequenza usata come struttura di base a cui vengono modificati alcuni residui aminoacidici, generalmente nelle regioni CDR₃), si sono rivelati estremamente specifici e sono stati usati per “on-line detection” di antigeni in biosensori (Griffiths *et al.*, 1994), per Western blotting e mappatura di epitopi (Nissim *et al.*, 1994), e in applicazioni di “immunoblotting” (Nakayama *et al.*, 2001).

La tecnica del “phage display” ha trovato impiego anche nel miglioramento dell'affinità di legame ormone-recettore (ad esempio per l'ormone della crescita)

o come nuovo strumento industriale utilizzato da compagnie tecnologiche per lo sviluppo di nuovi farmaci basati sull'individuazione di nuove proteine, peptidi o anticorpi.

1.9.2 Il principio del 'phage display'

Molte differenti tipologie di ligandi (proteine, peptidi, frammenti anticorpali) possono essere clonati nel genoma fagico come fusione con il gene che codifica una proteina fagica di superficie (pIII, pVI, pVIII). La scelta della proteina capsidica è dettata principalmente dal numero di copie della proteina di interesse che si vogliono esporre su fago (circa 2700 copie per fago nel caso della pVIII contro le 5 copie per fago nel caso della pIII). La fusione con la proteina maggiore di rivestimento permette la selezione di proteine con basse affinità di legame (è questo il caso ad esempio di librerie peptidiche espresse su fago), mentre fusioni con la proteina pIII permettono di selezionare proteine dotate di elevate affinità di legame (ad esempio da librerie di esposizione di frammenti anticorpali) (Figura 14). Le proteine di fusione superficiali vengono incorporate nelle particelle fagiche che sono assemblate all'interno di batteri. Quindi l'espressione di questi prodotti di fusione nei fagi maturi fa sì che i ligandi attesi vengano esposti sulla superficie del fago. La connessione tra genotipo e fenotipo del ligando permette l'arricchimento in fagi specifici, mediante la selezione su bersagli molecolari immobilizzati su supporti adeguati (tubi di plastica, membrane, microsfele, ecc...) (Figura 15). E' possibile anche effettuare la selezione con l'antigene libero in soluzione ad esempio utilizzando l'antigene biotinilato. I fagi legati all'antigene possono essere recuperati mediante biglie magnetiche rivestite con streptavidina. Tale strategia permette di selezionare anticorpi che legano l'antigene in soluzione nella sua forma nativa. Solo i fagi che espongono ligandi con affinità per il bersaglio di interesse vengono trattenuti, mentre quelli aspecifici vengono eluiti attraverso lavaggi. I fagi leganti vengono recuperati ed utilizzati per reinfectare batteri che vengono fatti crescere per un ulteriore arricchimento ed eventualmente per un nuovo passaggio di selezione.

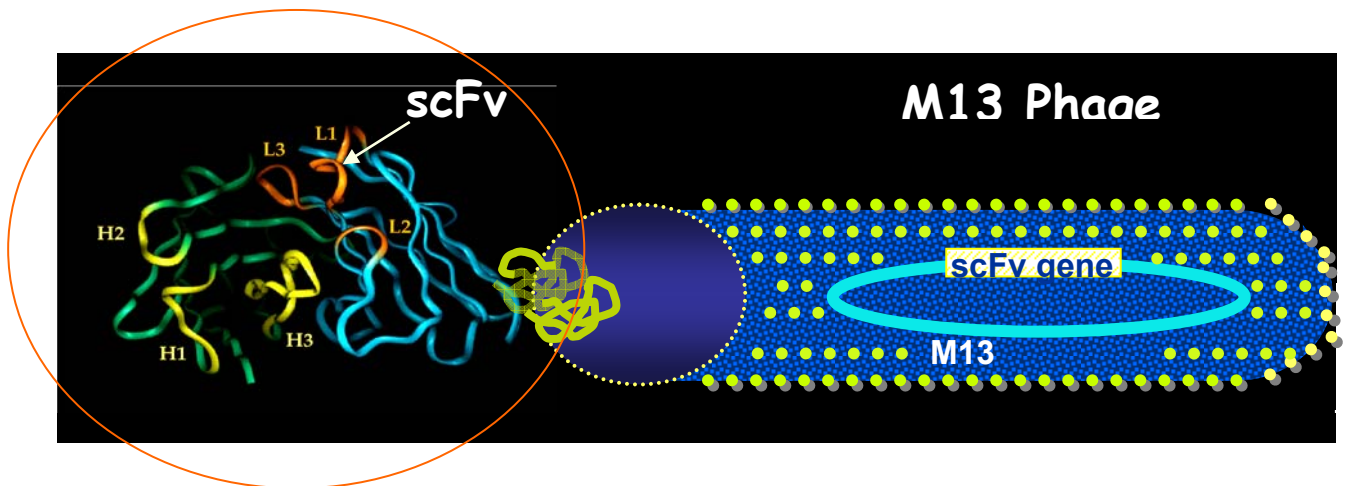


Figura 14. Esposizione di un scFv sulla proteina di rivestimento pIII del fago M13.

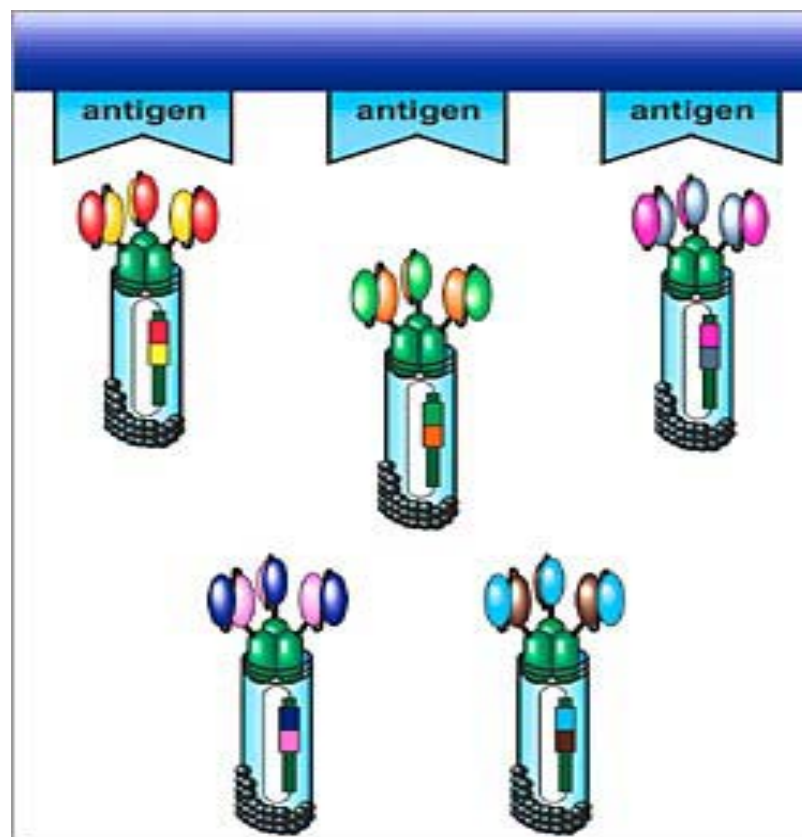


Figura 15 Selezione di una libreria di anticorpi a singola catena esposti su fago contro un antigene di interesse.

1.9.3 Repertori di anticorpi sintetici

Per la costruzione di un repertorio di anticorpi sintetici, i geni codificanti per i domini variabili V, vengono assemblati introducendo variazioni casuali in posizioni definite delle regioni “complementarity determining regions” (CDRs), anse ipervariabili in cui è concentrata la maggior parte della diversità. In un caso sono state introdotte variazioni casuali anche nelle regioni che costituiscono l’impalcatura del dominio variabile, le “framework” (FR) (Hoogenboom & Winter 1992). Tuttavia le CDR3 occupano una posizione centrale nella formazione del sito di legame e, sulla base di studi di modellistica, è stato dimostrato che queste corrispondono alle regioni maggiormente implicate nel riconoscimento dell’antigene. Questo dato è anche confermato dalla maggior variabilità registrata per le CDR3 degli anticorpi noti, rispetto alle altre CDR: indice questo di maggior adattamento all’epitopo molecolare da riconoscere. Per questa regione le CDR3 costituiscono il bersaglio principale per introdurre diversità nei repertori sintetici. E’ comunque possibile migliorare l’affinità degli anticorpi ottenuti da una prima selezione, attraverso la successiva modifica casuale delle CDR1, seconde dopo le CDR3 nel riconoscimento dell’antigene ed infine anche delle CDR2. Questo permette di ottenere nuovi “sotto-repertori molecolari”, da cui è possibile selezionare molecole con maggiore affinità di legame che meglio si adattano all’epitopo riconosciuto (Garrard & Henner, 1993; Soderlind *et al.*, 1995). Repertori sintetici di più recente costruzione, in virtù dell’uso di tecniche di clonaggio e di sistemi di trasformazione più efficienti, hanno raggiunto livelli di complessità particolarmente alti (vicini a 10^{10}) (Griffiths *et al.*, 1994). Questo ha permesso di ottenere anticorpi con ottima affinità anche senza ricorrere ad ulteriori passaggi di miglioramento di affinità. Esistono comunque limiti fisici nell’arricchimento che sono legati alla procedura di selezione e che condizionano sia la grandezza che la diversità genetica di un repertorio.

Una seconda generazione di repertori sono stati costruiti dalla società MorphoSys (Hoogenboom *et al.*, 1998), usando segmenti di geni V basati sulle strutture canoniche che rappresentano tutte le sottoclassi ufficialmente riconosciute (Kabat *et al.*, 1991) in modo da incorporare solo le strutture opportunamente espresse. Un altro esempio di repertori di seconda generazione è legato all’idea di combinare complementarietà e diversità di una “library” primaria di anticorpi (“germline”) e

una secondaria (ipermutazioni somatiche) in un unico repertorio di anticorpi su fago. Questo può dar luogo ad un “super repertorio” che contiene anticorpi con maggiore affinità di quelli che producono naturalmente le cellule B (Tomlinson *et al.*, 1996; Hoogenboom, 1997).

Una variante rispetto al formato scFv è quella detta V_{HH}, più piccola dei frammenti convenzionali poiché basata esclusivamente sulla catena V_H. Questo tipo di anticorpi è strutturalmente analogo alla porzione variabile degli anticorpi naturali di cammelli, dromedari e lama, che interagiscono efficientemente con l'antigene anche se le catene leggere sono totalmente assenti. Repertori sintetici di V_{HH}, con variabilità introdotta a livello delle CDR₃ tramite mutagenesi casuale per PCR, sono stati costruiti per sfruttare le piccole dimensioni di questo tipo di anticorpi e utilizzati nell'inibizione di enzimi, come immunoadsorbenti e come “intrabodies” (Muylderman, 2001).

Sono stati costruiti molti repertori, vasti e diversificati, interamente *in vitro* (da considerarsi veri e propri “sistemi immunitari artificiali”) per selezionare anticorpi ad alta affinità senza ricorrere al metodo classico dell'immunizzazione animale. L'uso di segmenti di geni V nei repertori artificiali ha permesso di selezionare frammenti anticorpali sotto forma di Fab o scFv, diversi da quelli derivati da repertori naturali. Inoltre i frammenti selezionati possono essere migliorati ulteriormente attraverso cicli di “chain shuffling” (Marks *et al.*, 1992) o mutagenesi puntiforme (Hawkins *et al.*, 1992) in modo da ottenere ligandi specifici e con alta affinità, perfino superiore a quella di molecole prodotte da un sistema immunitario.

Anticorpi con buona affinità (dell'ordine micro-molare) sono stati isolati da repertori scFv di circa 10⁷-10⁸ elementi (Griffiths *et al.*, 1993; de Kruif *et al.*, 1995). Questi anticorpi hanno però un'affinità (K_d compresa tra 10⁻⁵ e 10⁻⁷M) caratteristica di una risposta immunitaria primaria, che potrebbe non essere sufficiente per usare questi anticorpi in terapia o per la neutralizzazione di virus. Repertori con una complessità maggiore di 10⁸ permettono invece di isolare anticorpi con elevata capacità di legame, quindi utilizzabili direttamente come reagenti immunochimici.

Ligandi con specificità difficili da ottenere con la tecnica dell'ibridoma, sono stati ottenuti ad esempio contro il fattore di allungamento EF-1α (Merrick *et al.*, 1993)

e la catena pesante immunoglobulinica legante la proteina BiP (Nissim *et al.*, 1994).

1.10 GLI ANTICORPI INTRACELLULARI ('INTRABODIES')

1.10.1 Espressione di anticorpi all'interno della cellula

Uno dei limiti principali nell'uso degli anticorpi è costituito dal fatto che sono proteine di tipo secretorio, pertanto se vengono indirizzate in compartimenti cellulari diversi dalla via di secrezione, possono incorrere in problemi di stabilità e ripiegamento, che portano alla perdita di funzionalità della molecola e alla sua degradazione. Per molte applicazioni è necessario disporre di anticorpi in grado di raggiungere, legare ed eventualmente interferire con la funzione di proteine che sono espresse nel compartimento citoplasmatico. Il citoplasma è un ambiente caratterizzato da un potenziale redox, che impedisce la formazione di ponti disolfuro. Tali legami covalenti generalmente contribuiscono alla stabilizzazione della conformazione proteica stabilizzando la struttura di ciascun dominio VH e VL (Creighton, 1986; Hinck *et al.*, 1996). Inoltre l'assenza di enzimi che assistono il corretto ripiegamento molecolare, è causa principale di aggregati proteici insolubili che vengono rapidamente degradati dalla cellula. Sono pochi gli esempi di anticorpi naturalmente dotati sia di un'elevata stabilità termodinamica *in vitro*, sia della capacità di essere espressi in forma funzionale nel compartimento citoplasmatico ('intrabody'). Nel caso dell'espressione come anticorpi intracellulari, la versione più usata è quella di frammento a singola catena (scFv): questa classe di anticorpi ricombinanti presenta due ponti disolfuro intracatena rispettivamente nei domini V_H e V_L. (Figura 16). Questa caratteristica ne limita l'utilizzo come interferenti molecolari *in vivo* per la difficoltà di ottenere una espressione funzionale nel citoplasma. I ponti disolfuro intracatena sono molto conservati, quindi critici per la stabilità dei frammenti scFv (Proba *et al.*, 1997; Glockshuber *et al.*, 1992). Solo i frammenti intrinsecamente stabili sono capaci di ripiegarsi correttamente ed in quantità sufficienti per essere attivi come "intrabodies". La maggior parte dei scFv espressi nel citoplasma mostrano bassi livelli di espressione, limitata emi-vita e bassa funzionalità (Biocca *et al.*, 1995;

Martineau *et al.*, 1998; Visintin *et al.*, 1999). Altri sono attivi nel citoplasma a temperature basse (20°C) ma non a 30°C, impedendo molte applicazioni *in vivo* (Visintin *et al.*, 1999).

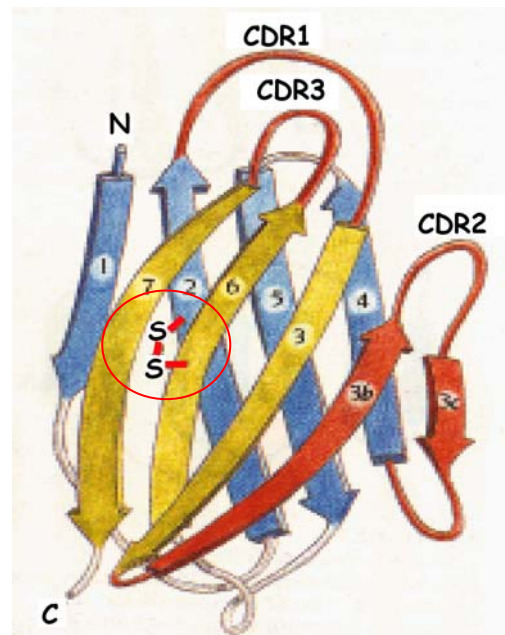


Figura 16 Struttura di un frammento anticorpale a singola catena (scFv) in cui sono messi in evidenza i ponti disolfuro intracatena.

1.10.2 “Intrabodies” ottenuti

Per molti scopi applicativi è di fondamentale importanza ottenere anticorpi stabili e solubili in ambiente citoplasmatico. L’interesse per la stabilità degli anticorpi è aumentato negli ultimi anni, determinando il ricorso sia ad approcci razionali che di evoluzione molecolare.

Per gli approcci razionali sono utilizzate conoscenze basate sulle strutture o su statistiche di sequenza per predire mutazioni stabilizzanti che possono essere poi introdotte in un dato scFv per mezzo di mutagenesi sito-diretta. La possibilità di prevedere tali mutazioni comunque è ancora limitata (Worn & Pluckthun, 2001).

Alternativamente possono essere applicate strategie di evoluzione basate sulla mutagenesi casuale di un frammento scFv tipicamente con buona affinità per

l'antigene bersaglio ma con bassa stabilità molecolare. Il repertorio risultante è quindi sottoposto a selezione in condizioni opportune per riuscire ad ottenere frammenti con aumentata stabilità rispetto al frammento di origine. Le tecniche di selezione adottate a questo scopo si basano su "panning" su fago (Winter *et al.*, 1994), "ribosome display" (Hanes & Pluckthun, 1997) o "yeast display" (Boder & Wittrup, 1997). Attraverso queste procedure messe a punto a seconda delle esigenze sperimentali, è stato possibile selezionare in modo specifico scFv con proprietà modificate in termini di affinità, stabilità, tossicità o livelli di espressione.

E' inoltre possibile combinare approcci di evoluzione e razionali per aumentare ulteriormente la stabilità dei scFv (Knappik & Pluckthun, 1995; Forsberg *et al.*, 1997; Nieba *et al.*, 1997). Comunque, nonostante gli sforzi scientifici di numerosi gruppi di ricerca, sono ancora pochi gli anticorpi in grado di interferire funzionalmente con antigeni espressi nel compartimento citoplasmatico.

Tra i rari esempi vi è un mutante scFv dell'anti β -galattosidasi umana capace di ripiegarsi ad alti livelli nel citoplasma di *E. coli*. Studi comparati di questo mutante con l'anticorpo originario hanno evidenziato livelli di espressione comparabili in forma attiva ed ossidata nel periplasma, mentre se un agente riducente come il DTT veniva aggiunto al mezzo di crescita, solo il scFv mutante era ancora capace di ripiegarsi (Martineau & Betton., 1999).

Ha avuto successo anche l'espressione di alcuni frammenti anticorpali diretti contro proteine del virus HIV nella via secretoria, nel citoplasma o nel nucleo di cellule animali. Un anti-gp120, chiamato sFv 105, dà luogo a particelle virali non infettive (Chen *et al.*, 1994), un altro scFv specifico contro la proteina Vif interferisce con la replicazione del virus impedendogli di completare la trascrizione inversa (Goncalves *et al.*, 2002).

Un ulteriore esempio di "intrabody" è rappresentato da un scFv diretto contro la regione N-terminale della proteina tumorale umana p53. Questo anticorpo ricombinante, chiamato DO-1 deriva da un anticorpo monoclonale, ed ha mostrato una buona espressione nel citoplasma e nel nucleo di cellule di mammifero, consentendo un'inibizione delle funzioni transattivatrici di p53. Il DO-1 è stato ulteriormente modificato aggiungendo un dominio C_K che aumenta la sua stabilità citoplasmatica e nucleare (Cohen *et al.*, 1998).

Un approccio alternativo si basa sull'impiego di anticorpi intrinsecamente stabili da utilizzare come struttura molecolare per ottenere, mediante mutagenesi, molecole con nuove specificità di legame. Il limite principale di questa tecnica è legato alla difficoltà di preservare le caratteristiche di stabilità della molecola di partenza dopo le operazioni di ingegneria proteica. Risultati molto promettenti sono però stati ottenuti impiegando un frammento anticorpale scFv, chiamato scFv(F8), con qualità molecolari particolarmente apprezzabili (Tavladoraki *et al.*, 1993; Tavladoraki *et al.*, 1999).

1.11 LA LIBRERIA DI “INTRABODIES” F8

1.11.1 Caratterizzazione termodinamica e biochimica dell' scFv(F8)

Il frammento anticorpale a singola catena scFv(F8) derivato da un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina di rivestimento del virus vegetale AMCV (“Artichoke Mottle Crinkle Virus”: virus dell'arricciamento maculato del carciofo), è uno dei pochi esempi di anticorpo funzionalmente espresso nel citoplasma delle piante e che è in grado di interferire con la replicazione del virus *in vivo* (Tavladoraki *et al.*, 1993). Lo studio dello stato redox di questo particolare frammento ha mostrato che esso si accumula in forma solubile e funzionale nel citoplasma di cellule vegetali di *Nicotiana benthamiana* con i residui di cisteina in forma ridotta, dimostrando che esso è in grado di ripiegarsi correttamente anche in assenza dei ponti disolfuro intracatena (Tavladoraki *et al.*, 1999). Lo stesso risultato è stato ottenuto esprimendo il frammento scFv(F8) privo del segnale di secrezione in *E. coli* (Tavladoraki *et al.*, 1999). Anche in questo caso il frammento anticorpale si accumula sotto forma ridotta nel citoplasma batterico in forma stabile e funzionale.

Sulla base dell'osservazione che il frammento anticorpale scFv(F8) è in grado di accumularsi in elevate quantità nel citoplasma di piante transgeniche e per valutare se tale capacità dipendesse effettivamente dall'elevata stabilità della molecola è stata inoltre determinata la velocità di “turnover” del frammento scFv(F8). La determinazione di tale parametro è stata eseguita, lasciando sospensioni cellulari e protoplasti ottenuti da piante transgeniche in incubazione per 2 ore con aminoacidi marcati e analizzando poi aliquote della miscela di

reazione per misurare la concentrazione di molecola scFv(F8) marcata. La quantità di scFv(F8) marcata è risultata costante per oltre 16 ore sia nelle sospensioni cellulari che nei protoplasti, dimostrando la bassa velocità di “turnover”, quindi l’alta emi-vita di questo frammento anticorpale nelle cellule vegetali (Tavladoraki *et al.*, 1993).

Le caratteristiche di alta stabilità della molecola scFv(F8) sono state confermate da esperimenti *in vitro* di denaturazione e rinaturazione all’equilibrio in presenza di concentrazioni crescenti dell’agente denaturante cloruro di guanidinio (GdmCl) (Tavladoraki *et al.*, 1999). Questo studio condotto utilizzando tecniche di spettroscopia di fluorescenza, ha evidenziato che la molecola scFv(F8) denaturata è in grado di rinaturarsi nella forma “nativa” (correttamente ripiegata) anche dopo denaturazione completa (concentrazione di GdmCl fino a 4M). Il prodotto rinaturato inoltre mostra la stessa capacità di legame dell’anticorpo in forma nativa.

La denaturazione è completamente reversibile anche in presenza di un agente riducente, il DTT, che impedisce la formazione dei ponti disolfuro.

Il prodotto rinaturato in condizioni riducenti (20 mM DTT; pH 9,0) è stato caratterizzato mediante le sue proprietà spettrali ed ha rivelato gli stessi valori di fluorescenza intrinseca, lo stesso spettro lontano-UV e vicino-UV del scFv(F8) nativo.

Questa minuziosa caratterizzazione molecolare ha dimostrato che la struttura portante (“scaffold”) dell’anticorpo scFv è la principale responsabile delle peculiari qualità termodinamiche e si è rivelata un’ottima impalcatura per costruire nuove molecole anticorpali intrinsecamente stabili da utilizzare come interferenti intracellulari.

1.11.2 Il scFv(F8) come “scaffold” per la costruzione di anticorpi a nuova specificità

Esperimenti di “grafting” (trapianto molecolare), effettuati mediante le moderne tecniche di ingegneria proteica, sono stati effettuati per valutare la possibilità di modificare la specificità del scFv(F8), tentando di preservare le caratteristiche di stabilità (Donini *et al.*, 2003). Questi studi sono stati effettuati inserendo sullo “scaffold” del scFv(F8) alcune regioni di un altro anticorpo, il scFv(D1.3) ben conosciuto in letteratura e di cui è nota la struttura cristallografica

in complesso con il suo antigene, il lisozima. Ciò ha permesso di formulare un modello computerizzato che permettesse di prevedere ragionevolmente l'effetto di ogni singola modificazione aminoacidica sulla struttura del scFv(F8) e quindi sulla sua stabilità. In particolare è stato progettato il trapianto sul scFv(F8), attraverso mutagenesi graduale, di tutte le CDR del scFv(D1.3), delle zone di bordo delle anse ipervariabili e di alcuni residui delle “framework” (FR) che si reputavano importanti nel garantire la giusta conformazione delle anse ipervariabili.

La realizzazione di scFv mutanti con diversi livelli di mutagenizzazione e la loro espressione nel citoplasma di *E. coli* ha permesso di dimostrare che la struttura del scFv(F8) è in grado di sopportare modifiche strutturali anche estese (tutte le 6 CDR e numerosi residui delle FR) mantenendo inalterate la capacità di ripiegarsi correttamente in ambiente citoplasmatico, quindi in assenza di ponti disolfuro. E' stato inoltre dimostrato che è possibile modificare la specificità di legame per l'antigene del scFv(F8), ottenendo mutanti con affinità per il lisozima del tutto confrontabili all'anticorpo “donatore”, il scFv(D1,3).

Questi risultati hanno aperto la strada ad una serie di applicazioni che permettono di utilizzare la struttura del scFv(F8) per ottenere “intrabody”.

1.11.3 Repertorio molecolare 'F8 library'

I risultati ottenuti con il trapianto di specificità su disegno molecolare hanno dimostrato che era possibile modificare la struttura del scFv(F8) senza alterare le caratteristiche intrinseche di stabilità. Questo ha suggerito la possibilità di modificare alcune porzioni del sito di riconoscimento del scFv(F8) in modo casuale per ottenere un repertorio di anticorpi con specificità diverse, ma con stesse qualità termodinamiche. In altre parole è stata ipotizzata la possibilità di ottenere un repertorio di “intrabody” da cui selezionare leganti da destinare ad applicazioni per cui è richiesta funzionalità nel compartimento citoplasmatico.

Come punto di partenza per la costruzione di questo repertorio è stato utilizzato un derivato dell'anticorpo scFv(F8), caratterizzato da una parziale riduzione di alcune CDR individuata in modo da ottenere anse di lunghezza media tra le strutture canoniche degli anticorpi finora caratterizzati. In particolare è stata scorciata di 4 aminoacidi (portandola da 15 a 11 residui), e parzialmente modificata, la CDR₁ del dominio V_L e sono stati rimossi 9 residui aminoacidici

della lunga ed inconsueta CDR₃ del dominio V_H. Per la costruzione del repertorio di anticorpi è stata introdotta variabilità di sequenza in 4 posizioni aminoacidiche delle CDR₃ sia del dominio V_H che del dominio V_L tramite mutagenesi per PCR. Attraverso oligonucleotidi parzialmente degenerati sono stati modificati casualmente i residui compresi tra 95 e 98 della V_H e quelli tra 91 e 94 della V_L. I prodotti di mutagenesi sono stati clonati in un vettore fagemidico per il montaggio sulla superficie del batteriofago M13 come fusione con la proteina capsidica pIII. Il repertorio ottenuto, chiamato “library F8” è risultato composto di 5×10^7 differenti cloni (Desiderio *et al.*, 2001).

1.11.4 Caratteristiche biochimiche degli scFv selezionati dalla ‘library F8’

Diverse proteine sono state impiegate come antigeni per selezionare anticorpi scFv dalla “library F8”, tra queste il lisozima del bianco dell’uovo di gallina (HEL), albumina da siero bovino (BSA), nucleoproteina del tospovirus (TSWV-N) di due serogruppi differenti. Il numero di cicli di selezione (da 4 a 6) è stato deciso sulla base del progressivo arricchimento in cloni specifici contro i singoli antigeni, che viene valutato come titolo dei fagi policlonali ottenuti dopo ogni ciclo di selezione. Dopo l’ultimo ciclo di “panning”, i leganti specifici sono stati individuati mediante saggio ELISA. La percentuale dei cloni positivi è risultata variabile per i differenti antigeni; tra questi solo i cloni che mostravano segnali ELISA forti sono stati scelti per le successive caratterizzazioni. Il sequenziamento di tutti i cloni isolati ha confermato l’introduzione di variabilità di sequenza a livello delle CDR₃, la riduzione della lunghezza della CDR₃ della V_H e l’assenza di mutazioni non previste indotte durante la PCR (Desiderio *et al.*, 2001).

L’assortimento completamente casuale per carica e dimensione degli aminoacidi riscontrati nelle CDR₃ dei cloni caratterizzati indica che questi non influenzano sostanzialmente la struttura portante dell’anticorpo di partenza. La specificità di legame dei cloni scFv isolati per i rispettivi antigeni è stata valutata mediante saggio ELISA su diversi antigeni non correlati. Nessun anticorpo ha mostrato cross-reattività aspecifica. I cloni positivi contro il lisozima sono stati selezionati nel formato di anticorpo su fago e dopo sequenziamento, sono stati convertiti in frammenti scFv solubili. Tra questi ne è stato caratterizzato in dettaglio uno, chiamato scFv(HEL-11E), la cui affinità per il lisozima è stata valutata tramite risonanza plasmonica di superficie (tecnologia BIAcore) ($K_d=1,05 \times 10^{-7} M$).

L'affinità per l'antigene HEL è risultata confrontabile con quella del ben caratterizzato scFv(D1,3) derivato da un anticorpo monoclonale diretto contro lo stesso antigene (Desiderio *et al.*, 2001).

I frammenti scFv selezionati dalla “library F8” sono stati analizzati per dicroismo circolare per valutare accuratamente il livello di similarità strutturale con il scFv(F8) precedentemente caratterizzato (Tavladoraki *et al.*, 1999). Lo spettro UV ha rilevato una completa somiglianza della loro struttura terziaria a quella del scFv(F8). Inoltre è stata ripetuta sui cloni isolati un'analisi di denaturazione e rinaturazione all'equilibrio, seguendo le stesse condizioni sperimentali adottate per il scFv(F8). La transizione dei frammenti dallo stato nativo a quello non ripiegato apparentemente segue un meccanismo a due stadi senza intermedi distinguibili (Desiderio *et al.*, 2001).

I risultati confermano che tutti gli anticorpi selezionati dalla “library F8” presentano la stessa stabilità termodinamica dell'originario scFv(F8), anche in presenza di DTT. La funzionalità dei scFv dopo la denaturazione-rinaturazione è stata anche valutata su ELISA per confermare i dati fisici. Tutti i frammenti anticorpali derivati dal scFv(F8), come già era noto per quest'ultimo, riguadagnavano completamente sia la struttura che la funzionalità.

1.12 INTERFERENZA MOLECOLARE MEDIATA DA ANTICORPI

L'immunomodulazione è una tecnica molecolare che permette di interferire con il normale metabolismo cellulare, con i segnali di traduzione, con l'azione infettiva di un patogeno, mediante l'espressione di geni che codificano per anticorpi ricombinanti. Tale approccio finora è stato usato per diverse applicazioni come per la terapia di malattie umane (Lobato *et al.*, 2004), per modulare il metabolismo di piante, per la resistenza a patogeni (De Jaeger *et al.*, 2000; Conrad & Manteuffel 2001; Jobling *et al.*, 2002; Boonrod *et al.*, 2004) per studi di proteomica e genomica funzionale (Visintin *et al.*, 2004).

Gli anticorpi che riconoscono specificamente recettori solubili o associati a membrane, enzimi o proteine legate al DNA, possono interferire con la funzione di queste proteine generando dei complessi antigene-anticorpo o causando cambiamenti sterici nella struttura molecolare con conseguente perdita di

funzionalità (Conrad & Manteuffel 2001). Il legame di un anticorpo può essere utilizzato per neutralizzare direttamente il sito attivo di una proteina bersaglio. In questo caso essi agiscono da competitori o da inibitori dell'antigene. Possono anche agire in modo più indiretto interferendo con il normale traffico intracellulare dell'antigene. Per realizzare tale tecnologia è importante che siano superati alcuni ostacoli. La maggior parte degli anticorpi perde funzionalità all'interno della cellula a causa della mancanza dei legami disolfuro che non si formano nell'ambiente riducente del citoplasma. Pertanto anticorpi ricombinanti stabili e funzionali nel citoplasma rappresentano una valida strategia per interferire con la funzione di molecole specifiche *in vivo*. Inoltre per inibire funzioni enzimatiche è importante che gli anticorpi siano in grado di raggiungere e legare il sito attivo dell'enzima. L'uso di frammenti a singola catena scFv con queste caratteristiche può facilitare enormemente l'immunomodulazione di processi metabolici in molti organismi.

Anticorpi o frammenti di anticorpi espressi in pianta sono chiamati 'plantibodies'. Questi possono essere impiegati per applicazioni *ex planta*, come strumenti per la diagnostica o per la terapia medica, ma anche per applicazioni *in planta*, per la manipolazione di processi cellulari o per conferire resistenza a patogeni. Inoltre i 'plantibodies' possono non solo interferire con enzimi o proteine regolatorie ma sono anche in grado di prevenire la formazione di complessi proteici ed interferire con le interazioni proteina-proteina. L'espressione di frammenti scFv nell'apoplasto, nel reticolo endoplasmatico e nel citoplasma è stata dimostrata evidenziando il successo dell'immunomodulazione in pianta (De Jaeger *et al.*, 2000) (Figura 17). I potenziali meccanismi che sono alla base della modulazione dell'attività di una proteina o di una molecola segnale sono differenti. Il primo esempio di 'mistargeting' è stato applicato per immunomodulare l'attività del fitormone ABA (acido abscissico) responsabile di diversi processi di sviluppo e fisiologici, come per esempio la regolazione dello stato dell'acqua mediante il controllo della chiusura degli stomati. L'anticorpo specifico, in formato scFv, per l'ABA è stato prodotto in piante transgeniche di tabacco ed accumulato ad alti livelli nel reticolo endoplasmatico (Artsaenko *et al.*, 1995). Queste piante hanno mostrato un aumento dei ritmi di traspirazione, causati da un'incapacità di chiudere i loro stomati. Molto probabilmente gli anticorpi scFv accumulati ad alte concentrazioni prevengono il trasporto dell'ormone e la sua interazione con i

recettori nelle cellule degli stomati. Sono stati anche espressi anticorpi scFv nel seme per modulare i livelli e l'attività dell'ormone ABA affinché fossero tessuto e tempo specifici (Philips *et al.*, 1999). Un altro esempio di immunomodulazione dell'attività di fitormoni è rappresentato dall'espressione di anticorpi scFv in piante di tabacco contro la giberellina A 19/24 precursori delle giberelline biologicamente attive A1 e A4. Le linee transgeniche che hanno accumulato alti livelli di scFv nel reticolo endoplasmatico hanno mostrato bassi livelli di espressione dell'ormone A1 causati dall'inibizione del metabolismo delle giberelline precursori (Shimada *et al.*, 1999).

Un esempio di inibizione enzimatica è invece rappresentato dall'espressione in pianta di frammenti a singolo dominio di cammello, caratterizzati dall'assenza delle catene leggere. Pochi sono gli anticorpi in grado di legare il sito attivo degli enzimi e questo impedisce di neutralizzare funzioni enzimatiche. E' stato dimostrato, invece, che questi anticorpi (VHH), estremamente stabili e di piccole dimensioni, sono dei potenti inibitori enzimatici. Possono inibire l'enzima SBE A in piante di patata in modo significativamente più efficace rispetto all'approccio che prevede l'utilizzo dell' RNA antisenso (Jobling *et al.*, 2002).

Inoltre è stato dimostrato che l'immunomodulazione svolge un ruolo importante nei processi di infezione da patogeni. La validità del concetto è stata dimostrata attraverso la produzione di piante transgeniche che producono anticorpi ricombinanti che, diretti contro la proteina di rivestimento del virus e indirizzati nel giusto compartimento cellulare, sono in grado di proteggere le piante stesse da infezioni virali (Tavladoraki *et al.*, 1993, Voss *et al.*, 1995, De Jaeger *et al.*, 2000).

Recentemente è stata impiegata una nuova strategia per conferire resistenza virale basata sull'espressione di frammenti scFv specifici per la RNA polimerasi-RNA dipendente (RdRps), enzima chiave per la replicazione di virus a RNA (+). Gli anticorpi selezionati sono risultati specifici non solo per virus vegetali appartenenti a generi diversi ma anche per virus non correlati come il virus dell'epatite C. La resistenza all'infettività virale basata su anticorpi contro RdRps aggiunge un nuovo strumento per combattere l'infezione causata da virus vegetali (Boonrod *et al.*, 2004).

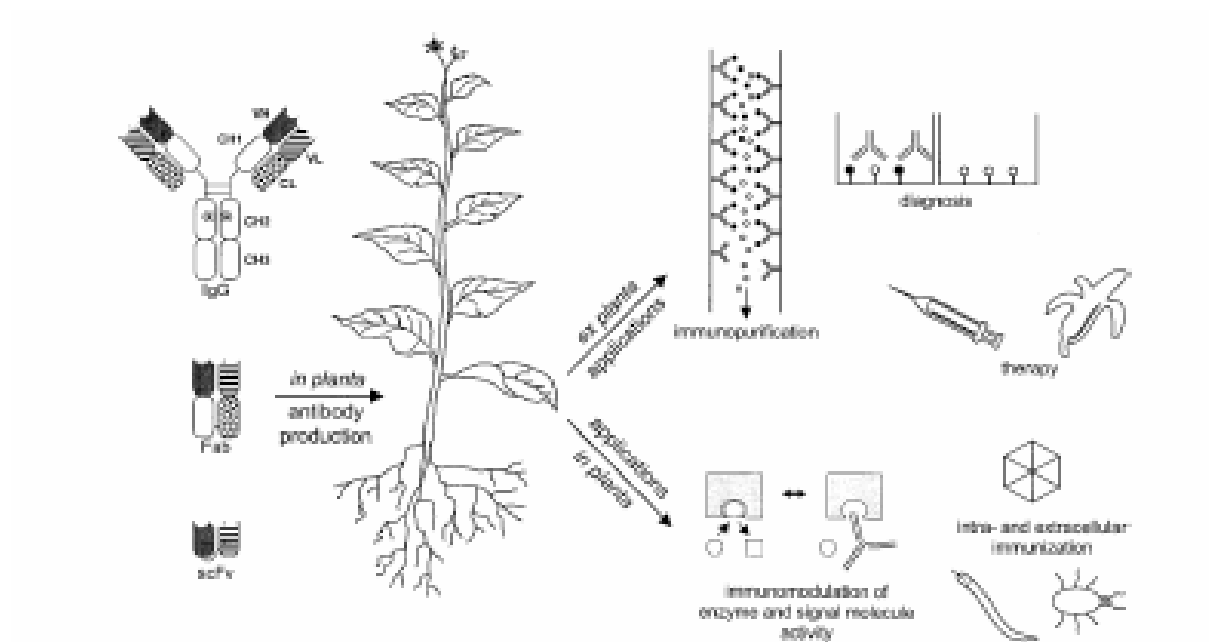


Figura 17 Applicazioni *in planta* ed *ex planta* di anticorpi e frammenti anticorpali espressi in pianta. Le piante possono essere trasformate per ottenere resistenza ai patogeni (immunizzazione intra- ed extra-cellulare) o per manipolare il metabolismo, come ad esempio l'immunomodulazione della attività di enzimi specifici o di molecole segnale. La purificazione, invece, fa sì che gli anticorpi prodotti in pianta possano essere utilizzati come diagnostici, in terapia o in purificazioni di affinità basate su anticorpi (Figura presa da De Jaeger *et al.*, 2000).

2. SCOPO DELLA TESI

2.1 LA TECNOLOGIA DEGLI ANTICORPI RICOMBINANTI

Questo lavoro sperimentale ha previsto l'utilizzo di molecole anticorpali ricombinanti per dotare le piante di nuovi strumenti di difesa contro i patogeni. Numerose sono le tecnologie a disposizione nel campo dell'ingegneria proteica degli anticorpi; tra queste, a tecnologia del "phage display" che può essere usata per ottenere velocemente e facilmente dei ligandi utili per scopi di ricerca o medici (Yip & Ward, 2002). In particolare, l'isolamento di anticorpi ricombinanti da repertori e la loro espressione all'interno della cellula ('intrabody') rappresenta una strategia efficace per interferire con la funzione di specifiche molecole *in vivo* ('immunomodulazione' o 'immunizzazione intracellulare') (Biocca & Cattaneo, 1995; Rondon & Marasco, 1997; Cattaneo & Biocca, 1999). L'immunomodulazione, affinché sia efficace, richiede che le molecole siano altamente stabili, siano espresse correttamente nell'appropriato compartimento cellulare ad alti livelli e abbiano un'elevata affinità e specificità per la molecola bersaglio. Il frammento anticorpale a singola catena (scFv) mantiene molte caratteristiche proprie degli anticorpi, con la possibilità di essere espresso a livello intracellulare. Nell'scFv, i domini variabili della catena leggera e pesante (V_H e V_L) sono uniti tra loro per mezzo di un polipeptide linker flessibile a formare un'unica catena polipeptidica (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988); in ogni dominio variabile (V) è presente un ponte disolfuro fondamentale per il corretto ripiegamento della molecola e, di conseguenza, per le proprietà di legame all'antigene (Glockshuber *et al.*, 1992).

Molte applicazioni nella fisiologia/patologia sia umana che vegetale richiedono l'espressione di scFv funzionali all'interno della cellula. Purtroppo, l'ambiente riducente di questo compartimento cellulare previene la formazione di ponti disolfuro intracatena tra la V_H e la V_L , pregiudicando la stabilità degli scFv (Biocca *et al.*, 1995; Worn *et al.*, 2000). Di conseguenza l'scFv nel citoplasma potrebbe avere bassi livelli di espressione, poca solubilità, perdita del corretto ripiegamento e della funzionalità. Sono state sviluppate diverse strategie per cercare di ottenere anticorpi intracellulari termodinamicamente stabili e funzionali nel citoplasma, come l'ingegneria proteica seguita da selezioni *in vivo* od *in vitro* da repertori (Martineau *et al.*, 1998; Tse *et al.*, 2002) o approcci di 'disegno razionale' (Jung *et al.*, 1999; Donini *et al.*, 2003). Nonostante gli sforzi compiuti, però, ancora non è stata identificata una metodologia efficace per isolare anticorpi intracellulari; infatti solo un piccolo numero di frammenti anticorpali hanno mostrato proprietà tali da renderli stabili e solubili in condizioni non-permissive (Martineau *et al.*, 1998; Proba *et al.*, 1998; Worn & Pluckthun, 1998; Tavladoraki *et al.*, 1999; der maur *et al.*, 2002; Gennari *et al.*, 2004).

2.2 IL PIANO SPERIMENTALE

Presso il nostro laboratorio è stato dimostrato che l'espressione ectopica di un anticorpo ricombinante (scFvF8) nel citoplasma, derivato da un anticorpo monoclonale diretto contro il virus AMCV conferisce protezione *in planta* (Tavladoraki et al., 1993). Questo scFv presenta alta stabilità termodinamica *in vitro*, è ripiegato correttamente e funzionalmente nel citoplasma e si accumula come scFv solubile con i gruppi sulfidrilici liberi (Tavladoraki et al., 1999); da questo anticorpo ricombinante, utilizzando la sua struttura stabile, è stato costruito un repertorio molecolare di frammenti anticorpali ('libreria F8'), mutando in maniera combinatoriale quattro residui aminoacidici delle CDR3 sia della V_H che della V_L. Da questo repertorio sono stati isolati anticorpi tutti dotati di elevata stabilità intrinseca e solubili nell'ambiente riducente del citoplasma di batterio (Desiderio *et al.*, 2001).

Fino ad oggi, però, nessuno degli scFv isolati da questa libreria è stato usato come anticorpo intracellulare. Lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di dimostrare:

- la possibilità di selezionare direttamente *in vitro* scFv che siano poi funzionalmente espressi nel citoplasma di cellule eucariotiche;
- il comportamento *in vivo* di questi scFv come anticorpi intracellulari leganti proteine citoplasmatiche;
- l'abilità degli scFv selezionati di elicitare una risposta fenotipica *in vivo*.

Come modello per provare che questi postulati avessero fondamento è stato deciso di interferire con l'infezione del virus del mosaico del cetriolo (CMV) in pianta, un bersaglio di rilevante importanza agronomica. Il CMV appartiene al genere *Cucumoviruses*, famiglia *Bromoviridae* ed infetta più di 1000 specie vegetali nel mondo, in particolare il pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). E' un virus tripartito ad RNA a singolo filamento di polarità positiva, è costituito di particelle icosaedriche con un'unica proteina di rivestimento (180 subunità/virione) (Schmitz & Rao, 1998), con l'RNA genomico impacchettato in particelle separate (Palukaitis & Garcia-Arenal, 2003). ScFv contro il CMV sono già stati ottenuti (Ziegler *et al.*, 1995; Chae *et al.*, 2001) ma l'immunomodulazione dell'infezione del CMV in pianta ancora non era stata decritta.

In questo lavoro di dottorato è stato dimostrato che gli scFv, isolati dalla 'libreria F8' dopo selezione su particelle di CMV si legano al virus all'interno della cellula, sono in grado di interferire con la moltiplicazione virale e di conferire un nuovo fenotipo resistente a piante di pomodoro transgenico (cultivar Micro-Tom) (Meissner *et al.*, 1997). Questo lavoro dimostra inoltre che la libreria F8 contiene anticorpi intracellulari in grado di modulare

processi biologici *in vivo*; anticorpi contro bersagli intracellulari possono essere selezionati facilmente da questo repertorio per mezzo di classiche tecniche *in vitro*. Inoltre, la ‘libreria F8’ offre un’opportunità per isolare facilmente e velocemente molecole stabili in grado di interferire con numerosi bersaglia sia vegetali che animali, superando tutte le limitazioni delle strategie di immunomodulazione attuali.

Il lavoro di dottorato è stato pubblicato su Plant Molecular Biology:

Maria Elena Villani, Piero Roggero, Orsola Bitti, Eugenio Benvenuto, Rosella Franconi (2005) “Immunomodulation of a plant virus infection by intrabodies selected in vitro from a stable single-framework phage display library”. *Plant Mol Biol.*, **58** (3):305-316.

3. MATERIALI E METODI

3.1 CMV E ANTICORPI POLICLONALI

Il CMV purificato (10 mg/ml in glicerolo, mantenuto a -20°C), sia del ceppo F100 (serogruppo I) che del ceppo CAR (serogruppo II), e gli anticorpi policlonali contro i virus (A326 per CMV-CAR e A343 per CMV-F100) derivano dalla collezione IVV del CNR di Torino. La purezza del virus è stata verificata mediante gel SDS-PAGE colorato con Coomassie; l'integrità delle particelle virali è stata dimostrata verificando l'abilità del virus di produrre l'infezione. Il virus è stato diluito 1:1000 in PBS pH 7.2 e 100 µl sono stati inoculati meccanicamente su foglie di *N. benthamiana*, come descritto successivamente. I sintomi sistemici sono apparsi dopo 7 giorni.

3.2 CEPPI BATTERICI E DI LIEVITO

- *Escherichia coli* TG1: K12Δ (lac-pro), supE, thi, hsd 5/F', tarD36, pro AB, lacIq, lacZΔM15.
- *Escherichia coli* HB2151: K12Δ (lac-pro), ara, nal^r, thi/F' pro AB, lacIq, lacZΔM15.
- *Escherichia coli* DH5α: supE44, ΔlacU169 (Φ 80 lac Z ΔM15), hsrD17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1.
- *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105: C58 pTiBo542; T-region::aph.
- *Saccharomyces cerevisiae* L40: MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3, 112 ade2 LYS::(lexAop)4-HIS URA3::(lexAop)8-LacZ GAL4

3.3 SELEZIONE DI scFv DALLA 'LIBRERIA F8'

3.3.1 Immobilizzazione dell'antigene e cicli di selezione

L'immobilizzazione di virioni integri di CMV è stata effettuata con 4 ml di virus ad una concentrazione di 100 µg/ml in PBS pH 7.2 in immunotubo, lasciando incubare a 4 °C per 16 ore.

La 'library F8', con una diversità di 5×10^7 cloni e clonata nel vettore pDN332, è stata utilizzata per effettuare cinque cicli di selezione separatamente contro ambedue i ceppi

di CMV. I fagi della libreria sono stati incubati nell'immunotubo, dopo aver immobilizzato il CMV e bloccato i legami aspecifici con una soluzione di PBS latte al 5%. Dopo un'incubazione di 2 ore l'immunotubo è stato lavato 10 volte con PBST e 10 volte con PBS in modo da eliminare i fagi non legati all'antigene. I fagi con gli scFv legati specificamente al CMV sono stati eluiti con 1 ml di trietilammina 100 mM in H₂O e subito neutralizzati con 500 µl di Tris 1M pH 7.8. Questi sono stati utilizzati per infettare cellule di *E. Coli* TG1 in crescita esponenziale (a 37°C in bagnetto per 30 min). Una parte delle cellule sono state piastrate a varie diluizioni su piastre 2XYT Amp Glucosio 1%, per calcolare il titolo, mentre le restanti sono state piastrate per recuperare tutti i fagi eluiti dal ciclo di selezione. Quest'ultime sono state infettate con il fago helper VCS per permettere la replicazione di batteriofagi e la lisi delle cellule. I fagi, presenti nel mezzo di coltura, sono stati purificati con PEG/NaCl e utilizzati per un successivo ciclo di selezione, secondo lo schema riportato nella figura 18. Ad ogni ciclo di selezione il titolo sale in seguito ad arricchimento dei fagi specifici per l'antigene.

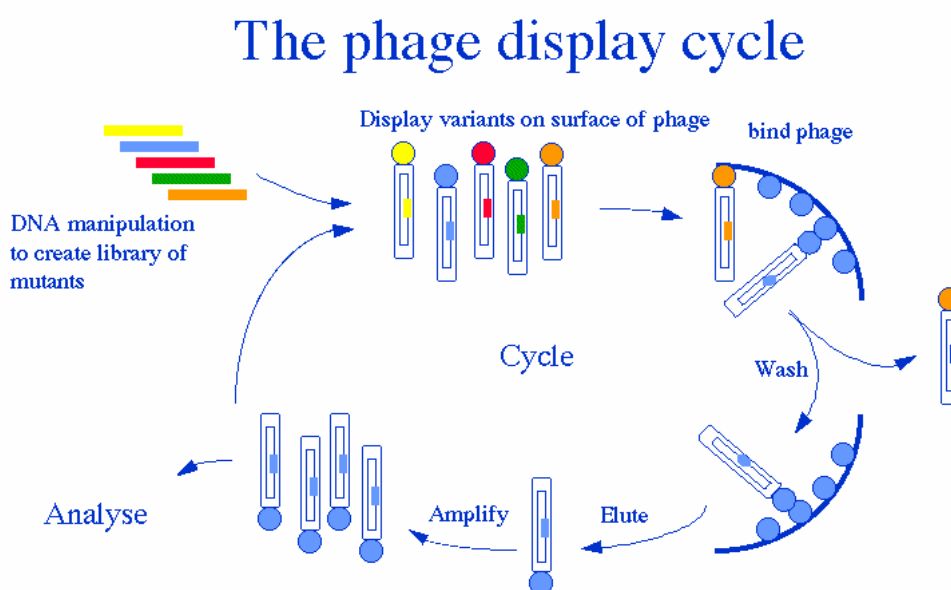


Figura 18 Schema del ciclo di selezione da una libreria di scFv ad esposizione su fago.

3.3.2 Analisi dei cloni

All'ultimo ciclo di selezione (quando il titolo era nell'ordine di grandezza di 10^8) sono state infettate cellule di *E. Coli* del ceppo non soppressore HB2151 per ottenere i scFv in forma solubile e non come prodotto di fusione con la proteina di rivestimento del fago. In particolare 1 ml di *E. Coli* HB2151 in crescita esponenziale sono stati infettati con 10 μ l di fagi eluiti. Dopo piastramento su 2XYT Amp Glu sono state analizzate circa 70 colonie per ogni selezione; le singole colonie sono state poi inoculate in 150 μ l di 2XYT Amp Glu 0,1% su piastre a 96 pozzetti. Dopo crescita per 2 ore a 37°C è stato aggiunto IPTG (isopropil β -D-tiogalattopiranoside) alla concentrazione di 1 mM finale per indurre l'espressione degli scFv solubile e le piastre sono state incubate 16 ore a 30°C, in agitazione. Le cellule batteriche sono state centrifugate e i supernatanti sono stati analizzati in test ELISA come descritto successivamente.

3.4 ELISA

La specificità di legame è stata analizzata mediante ELISA. Particelle di CMV (10 μ g/ml in PBS), o antigeni non correlati, sono state immobilizzate su piastre ELISA (Nunc, Maxisorp). Dopo aver bloccato le piastre con PBS latte 5%, 80 μ l di supernatante sono stati incubati in ogni pozzetto in una soluzione di PBS latte 2% finale e anticorpo anti-Flag M2 (Sigma) (2,5 μ g/ml) per 2 ore a 37°C, seguito da un'incubazione con un anticorpo policlonale di capra diretto contro le IgG di topo coniugato all'HRP (Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL). L'attività enzimatica è stata misurata con 2.2-azino-di-3-etilbenzotiazoline sulfonato (ABTS, KPL) e le piastre sono state lette a 405 nm su un lettore per piastre da 96 pozzetti.

Per l'analisi della reattività degli scFv su estratti di piante infettate, è stato eseguito un 'triple antibody sandwich' (TAS)-ELISA. Le particelle di CMV negli estratti di pianta sono state immobilizzate nei pozzetti per mezzo dell'anticorpo policlonale A343 diluito 1:1000 in PBS 1x. Estratti periplasmatici di scFvG4/B4/G2 sono stati poi incubati sulla piastra per 2 ore a 37 °C. L'scFv legato è stato rivelato con l'anticorpo monoclonale Anti-Flag M2 (2.5 mg/ml) e si è poi proceduto come descritto sopra.

3.5 PURIFICAZIONE scFv MEDIANTE CROMATOGRAFIA DI AFFINITA'

Gli estratti periplasmatici da colture cellulari indotte sono stati ottenuti come segue: dopo induzione con IPTG per 3 ore a 30 °C, in agitazione, le cellule batteriche sono state centrifugate ed il pellet è stato risospeso in 1/100 del volume della coltura iniziale di TES. Successivamente è stato aggiunto TES diluito 1:5 in H₂O e questa soluzione è stata lasciata in ghiaccio per 30 min. Dopo centrifugazione a 6000 rpm per 20 min il supernatante, e cioè l'estratto periplasmatico contenente l'scFv, è stato utilizzato per la purificazione.

La purificazione è stata effettuata mediante cromatografia di affinità con 'Ni-NTA immobilized metal ion affinity chromatography' (IMAC) (QIAGEN) seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

La concentrazione dei scFv dopo purificazione è stata calcolata dai valori di assorbanza dei campioni a tre differenti lunghezze d'onda A₂₈₀, A₃₂₀, A₃₅₀ e dai coefficienti di estinzione noti dei residui di triptofano, tirosina e cisteina (Mach & Lewis, 1992). La purezza del scFv è stata verificata per SDS-PAGE seguita dalla colorazione delle proteine con nitrato d'argento (Merril *et al.*, 1981).

3.6 ELETTROFORESI DI PROTEINE SU GEL DENATURANTE DI POLIACRILAMMIDE (SDS-PAGE) E WESTERN BLOTTING

3.6.1 SDS-PAGE

I gel di poliacrilammide sono stati preparati come descritto da Laemmli (1970). Prima della corsa è stato aggiunto 1/3 del volume di tampone di caricamento 3x ai campioni e la soluzione è stata denaturata a 100 °C per 3 min. L'elettroforesi è stata condotta a voltaggio costante a 150 V in tampone di corsa 1x. Le proteine così separate possono essere colorate con nitrato d'argento o trasferite su filtro PVDF (Hybond-P, Amersham).

3.6.2 Colorazione con nitrato d'argento

Questa colorazione si basa sul metodo di Blum e permette l'identificazione di circa 2 ng di proteina in una singola banda. Il gel è stato incubato per 30 min in una soluzione di fissaggio (100 ml di soluzione stock + 50 µl di formaldeide), lavato per due volte per 10' in etanolo al 50%, lasciato per 1' nella soluzione di pretrattamento (100 ml di H₂O ultrapura +

200 µl di soluzione stock di tiosolfato), lavato per tre volte in H₂O ultrapura per 20'', tenuto per 10 min in una soluzione di 100 ml di H₂O ultrapura + 200 mg di nitrato d'argento + 50 µl di formaldeide e sviluppato (100 ml di soluzione stock + 7 µl di soluzione stock di tiosolfato + 50 µl di formaldeide) fino all'intensità desiderata. La reazione di sviluppo è stata interrotta incubando il gel nella soluzione di stop.

3.6.3 Trasferimento delle proteine (Western blotting)

La corsa elettroforetica è stata effettuata su gel di poliacrilammide (12%) in presenza di SDS 2%. Le proteine sono state poi trasferite elettroforeticamente dal gel su una membrana di PVDF (Hybond-P, Amersham) 1 ora in camera fredda a 100 V costanti. La membrana PVDF è stata posta in agitazione in una soluzione bloccante, latte 5% in PBS Tween 0,5% (PBST) a 4°C per 16 ore. Dopo tre lavaggi in PBST per 10 min la membrana è stata incubata con una soluzione di latte al 2% in PBS contenete l'anticorpo monoclonale anti-flag M2 (Sigma) alla concentrazione di 2,5 µg/ml o l'anticorpo policlonale A343 contro il CMV, per 2 ore a temperatura ambiente. La membrana è stata di nuovo lavata una volta con PBST, NaCl 0,8 M e di nuovo con PBST e poi incubata per un'ora con un'immunoglobulina di capra diretta contro le IgG murine coniugata con HRP (KPL). Dopo lavaggi con PBST e PBS la membrana è stata incubata con 1 ml di soluzione per la rivelazione delle proteine per la chemiluminescenza (ECL Plus, Amersham). Tale sistema consiste nell'emissione di luce a seguito dell'ossidazione del luminolo, in presenza di attivatori chimici, da parte della perossidasi di rafano. Il segnale è stato rivelato in seguito ad esposizione della membrana su lastra fotografica (Hyperfilm-ECL, Amersham o con il sistema ECL Mini-Camera, Amersham).

3.7 CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE

Per gli esperimenti di co-immunoprecipitazione di CMV e scFv in soluzione, 600 ng di CMV-F100 purificato sono stati incubati con 150 ng di scFv purificato (scFvB4 o scFvG4 diluiti in PBS). Successivamente è stata aggiunta Proteina L-Sefarosio (Pierce), una proteina che lega le Ig kappa della catena leggera, e la soluzione è stata incubata per un'ora a temperatura ambiente in una piattaforma rotante. La resina è stata poi lavata sei volte con PBS 1x e le proteine legate sono state recuperate dopo aggiunta del tampone di caricamento per

SDS-PAGE 1 x con β -mercaptoetanolo e incubazione di 5 min a 100 °C. Le proteine eluite sono state separate su SDS-PAGE e poi elettrotrasferite su membrana PVDF. Le proteine sono state rivelate con gli anticorpi specifici (l'anticorpo monoclonale anti-Flag M2 per gli scFv, l'anticorpo policlonale A343 per il CMV-F100).

Per la co-immunoprecipitazione dai minipomodori 'wild type' o transgenici infettati con CMV, è stata usata la seguente procedura: le foglie inoculate con il virus sono state prelevate dopo un mese dall'infezione, lavate a lungo con acqua distillata per eliminare eventuale virus presente sulla superficie delle foglie e ridotte in polvere con azoto liquido in PBS 1x con l'aggiunta di inibitori di proteasi. Gli estratti sono stati poi incubati con Proteina L-Sefarosio e trattati come descritto sopra.

3.8 CALCOLO DELL'AFFINITÀ E MAPPATURA DELL'EPITOPO MEDIANTE RISONANZA PLASMONICA DI SUPERFICIE (SPR)

3.8.1 Calcolo dell'affinità mediante SPR

L'affinità degli anticorpi ricombinanti purificati è stata calcolata mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR). Le analisi di interazione in tempo reale sono state effettuate utilizzando il 'BIAcore X biosensor system' (Pharmacia Biosensor AB). Particelle di CMV-F100 (200 ng/ μ l in tampone acetato 10 mM pH4.0) sono state immobilizzate alla matrice di carbossimetildestrano del 'sensor chip', precedentemente attivata, attraverso una coniugazione amminica. È stato usato il kit 'Amine Coupling' (Biacore AB) seguendo le istruzioni della casa produttrice ad un flusso di 5 μ l/min. La matrice di destrano carbossilata è stata attivata con un'iniezione di una miscela di N-idrossisuccinimide 0,05 M ed N-etil-N'-(3-dietilamminopropil)-carbodiimmide 0,2 M per un volume di 35 μ l. Dopo l'iniezione del CMV, la procedura di immobilizzazione è stata completata da un'iniezione di 7 min. di etanolamina idrocloruro per bloccare i gruppi esteri rimanenti.

Per stimare le costanti di dissociazione all'equilibrio (K_D), concentrazioni di scFvG4 o scFvB4 tra 80 e 500 nM in tampone PBS 1x sono state iniettate nella cella di flusso ad una velocità di 20 μ l/min. Al termine di ogni curva di legame il chip è stato rigenerato con l'iniezione di 10 μ l di HCl 10 mM, concentrazione sufficiente per staccare il legame antigene/anticorpo. Le velocità di associazione (k_{on}) e di dissociazione (k_{off}) sono state calcolate utilizzando il software BIAevaluation 3.0 (BIAcore, AB), usando il modello a

singolo sito. I parametri cinetici sono: K_D , k_{on} , k_{off} . La costante di dissociazione all'equilibrio (K_D) è stata calcolata come segue:

$$K_D (M) = k_{off} (s^{-1}) / k_{on} (M^{-1} s^{-1})$$

3.8.2 Mappatura dell'epitopo

Per gli studi della mappatura dell'epitopo, sono state eseguite due iniezioni di quantità saturanti di scFvG4 oppure scFvB4 alla concentrazione di 200 nM. Di seguito è stata iniettata una soluzione di scFvB4 o scFvG4 200 nM sul chip saturato ed è stata analizzata l'interazione. Tutti gli esperimenti di legame sono stati eseguiti a 25 °C e ad una velocità di flusso di 20 µl/min.

3.9 CLONAGGI

3.9.1 Restrizioni

0,2-1 µg di DNA sono digeriti con 1-2 unità di enzima di restrizione in un volume di 20 µl per 2 ore alla temperatura consigliata dalla casa produttrice.

3.9.2 Amplificazione mediante PCR

Le reazioni di polimerizzazione a catena (PCR) del DNA sono state effettuate in un apparecchio Perkin Elmer/Cetus 600. La reazione consiste in una serie di cicli identici, ciascuno caratterizzato da tre fasi a differenti temperature. Nella prima fase la doppia elica del DNA viene denaturata alla temperatura di 94 °C; nella seconda gli oligonucleotidi di innesco vengono fatti appaiare al DNA a singolo filamento ad una temperatura detta di legame; nella terza fase il DNA viene polimerizzato a 72 °C ad opera della Taq polimerasi. Le fasi vengono ripetute per un numero di cicli tali da consentire l'amplificazione specifica di un frammento di DNA di un fattore 2^n , dove n indica il numero di cicli compiuti. La miscela di reazione contiene: 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM di ciascun deossinucleotide (dNTP); 1 µM di ciascun oligonucleotide di innesco; 2,5 U/ 100 µl di Taq DNA polimerasi (Perkin Elmer); il DNA stampo.

3.9.3 Sintesi degli oligonucleotidi

Gli oligonucleotidi usati nelle amplificazioni per PCR e nelle reazioni di sequenza sono stati sintetizzati presso la M-Medical/GENENCO.

3.9.4 Gel di agarosio

Viene preparato come descritto da Maniatis (Sambrook *et al.*, 1989) in tampone TAE 0,5X e con 0,2 µg/ml di bromuro di etidio. Il tampone di caricamento 5X è composto di glicerolo 30%, sodio dodecil solfato (SDS) 0,1%, bromofenolo blu (BFB) 0,1% e xilene cianolo 0,1%.

3.9.5 Estrazione e purificazione del DNA dal gel di agarosio

I frammenti di DNA sono stati recuperati da gel e purificati utilizzando il kit “QIAquick” della QIAGEN seguendo il protocollo consigliato dalla casa produttrice. Tale metodo sfrutta la capacità di particelle di silice di trattenere le molecole di DNA (Vogelstein & Gillespie, 1979).

3.9.6 Reazione di ligazione

Il DNA del vettore linearizzato ed il frammento del DNA da clonare sono stati mescolati in un rapporto molare 1:3. La reazione è stata condotta in un volume di 15 µl, utilizzando 1U di T4 DNA ligasi (Promega) ed incubando a 4°C per 16 ore.

3.9.7 Preparazione cellule competenti per elettroporazione

Una singola colonia di *E.Coli* DH5α o di *A. tumefaciens* ceppo EHA105 è stata inoculata in 20 ml di LB e incubata 28°C per 12-16 h. Con un'aliquota della coltura di partenza si inocula una seconda coltura (8 ml in 800 ml) nelle medesime condizioni seguendone la crescita fino ad una densità ottica (OD₆₀₀) compresa tra 0,5 e 0,6. A questa concentrazione si blocca la crescita mettendo le beute in ghiaccio per 15 min, poi si centrifuga la coltura a 400 xg per 5 min. Il sovrantante è rimosso totalmente e le cellule sono risospese in un uguale volume (800 ml) di H₂O ultrapura fredda (+4°C) e sterile, quindi centrifugate come sopra. L'operazione viene ripetuta per tre volte ogni volta risospesando le cellule rispettivamente in 400 e 20 ml di acqua ultrapura e infine in glicerolo 10% freddo. La sospensione finale viene suddivisa in aliquote da 40 µl, congelata in azoto liquido e conservata a -80 °C.

3.9.8 Elettroporazione

Si scongela un'aliquota di cellule competenti su ghiaccio e vi si aggiungono 5-10 ng di plasmide o 1-2 μ l della miscela di ligazione. L'elettroporatore (Gene Pulser e Pulse Controller, BIORAD) è regolato su 25 μ F, 1,25 kV e 200 Ω . Le cellule sono poste all'interno di una cuvetta fredda con elettrodi distanti 0,1 cm e si dà un impulso elettrico che produce una costante di tempo di 4-5 msec. I batteri vengono immediatamente risospesi in 1 ml di LB e incubati alla temperatura adatta (37°C per *E.Coli*, 28°C per *A. tumefaciens*) per un'ora e poi piastrati a diverse diluizioni su LB con gli opportuni antibiotici.

3.9.9 Caratterizzazione dei ricombinanti batterici mediante PCR

Per individuare rapidamente le colonie di *E.Coli* trasformate con i vettori ricombinanti, è stata sfruttata la tecnica di PCR applicata direttamente alle cellule batteriche (Sandhu *et al.*, 1989). Per ciascun campione è stata preparata la seguente miscela di reazione: 1 μ l di tampone di reazione Taq 10x (Perkin Elmer), dNTP alla concentrazione di 200 μ M ciascuno, 1 μ M di innescio senso, 1 μ M di innescio antisenso, 0,5 U di AmpliTaq Perkin Elmer e H₂O ultrapura sterile fino ad un volume di 10 μ l. Le cellule raccolte da una singola colonia con una punta sterile, sono state risospese nella miscela di reazione. La PCR è stata effettuata come segue: 4' a 94°C per rompere la parete batterica e denaturare il DNA, 35 cicli divisi in tre fasi, 45'' a 94 °C, 1' a 50°C e 1'30'' a 72°C a cui sono seguiti 10' di incubazione a 72°C. I prodotti della reazione sono stati analizzati su gel di agarosio. Tra i campioni che sono risultati positivi (quelli che presentano cioè un'unica banda delle dimensioni attese) sono stati scelti quelli da analizzare per sequenza.

3.9.10 Minipreparazione di DNA plasmidico

Il DNA plasmidico è stato purificato utilizzando il kit "QIAprep Spin Miniprep" della QIAGEN, secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice. Il metodo di purificazione si basa sulla capacità di particelle di silice di trattenere il DNA (Vogstein & Gillespie, 1979).

3.9.11 Sequenziamento

Il sequenziamento è stato eseguito dalla ditta Biogen S.r.l. utilizzando un sequenziatore automatico.

3.10 SISTEMA DOPPIO IBRIDO IN LIEVITO PER L'ANALISI DELL'INTERAZIONE ANTIGENE/ANTICORPO *IN VIVO*

3.10.1 Clonaggio nei vettori per l'espressione delle proteine di fusione in lievito

La proteina di fusione con LexA è stata preparata nel plasmide pHybLex/Zeo (Invitrogen). Per ottenere la proteina di fusione LexA-CMV la proteina di rivestimento del CMV-F100 è stata amplificata per RT-PCR da RNA totale isolato da piante di *N. benthamiana* infettate con il virus (estratto con RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN). Sono stati usati oligonucleotidi specifici (CMV back: 5' CG GAA TTC ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC 3'; CMV for: 5' AA CTG CAG TCA GAC TGG GAG CAC CCC AGA 3') ed il gene CMV-CP è stato inserito nel vettore pHybLex/Zeo attraverso i siti di restrizione *EcoRI*-*PstI*. Le proteine di fusione con B42, invece sono state preparate nell vettore pYEST Trp2 (Invitrogen). Le sequenze codificanti per scFvG4 e scFvB4 sono state clonate nei siti di restrizione *EcoRI* e *NotI* (Figura 19).

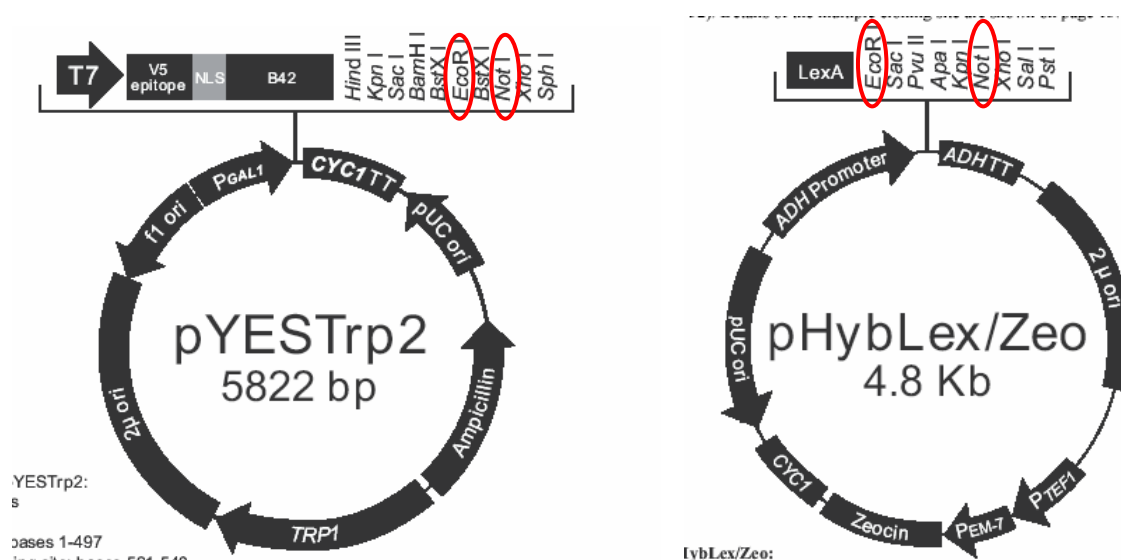


Figura 19. Schema del clonaggio in pYESTTrp2 e pHybLex/Zeo per l'espressione delle proteine di fusione in lievito.

3.10.2 Analisi dell'interazione

Per l'analisi del doppio ibrido, sono state preparate cellule competenti di *S. cerevisiae* ceppo L40 seguendo il protocollo descritto in Visintin *et al.*, 1999. Queste sono state co-trasformate con entrambi i vettori di espressione. I cloni co-trasformati sono stati selezionati mediante i marker auxotrofici per i due plasmidi. Per analizzare la corretta espressione delle proteine di fusione, cellule di *S. cerevisiae* sono state incubate in agitazione fino a raggiungere OD₆₀₀ 0.7; le cellule di lievito sono state centrifugate ed il pellet è stato risospeso in 1:250 del volume iniziale di buffer di lisi (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP40). E' stato poi aggiunto un uguale volume di biglie di vetro e la sospensione è stata agitata su vortex. Dopo centrifugazione, il supernatante è stato separato su un gel di poliacrilammide SDS-PAGE al 12% e poi trasferito su membrana PVDF. Per rivelare la proteina di fusione LexA-CMV è stato utilizzato l'anticorpo policlonale A343, mentre per rivelare le proteine di fusione B42-scFv è stato utilizzato un anticorpo policlonale di coniglio (A357) contro l'anticorpo monoclonale F8. Il segnale è stato poi rivelato con un anti-coniglio IgG fuso all'HRP (Pierce).

L'analisi dell'interazione, invece, è stata effettuata con la prototrofia all'istidina che viene revertita in caso di interazione delle proteine di fusione; i co-trasformanti sono stati fatti crescere su piastre prive di questo aminoacido. Per il saggio β -gal su filtro le colonie sono state lisate in azoto liquido ed è stata fatta una replica su filtri di nitrocellulosa. Questa è stata appoggiata sulla piastra con le colonie e poi bagnata nel tampone Z (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM, β -mercaptoetanolo 0.05 M, pH 7.0); su questo è stato appoggiato un filtro di carta Wathman. Il filtro è stato poi immerso in azoto liquido per 5 min. Dopo aver aspettato che il filtro di nitrocellulose si scongelasse, questo è stato chiuso in un disco Petri a 30 °C fino ad ottenere la colorazione blu.

3.11 INFEZIONE DI PIANTE DI *NICOTIANA BENTHAMIANA* CON PVX

L'infezione di piante di *N. benthamiana* con PVX-scFvB4 o PVX-scFvG4 è stata effettuata per infiltrazione diretta di una certa quantità di DNA plasmidico pPVX sulla superficie fogliare. Su foglie giovani di piante di *N. benthamiana* (circa 20 giorni dopo la germinazione) precedentemente cosparse con una piccola quantità di polvere di Carborundum (Sigma), è stato pipettato un volume di 50 μ l di una soluzione acquosa contenente 20 μ g di

DNA plasmidico. La soluzione è stata fatta assorbire esercitando con il guanto un lieve sfregamento sulla superficie fogliare che provoca microferite. Sono state infettate due foglie per pianta. Le piante sono state coltivate in una serra a 25°C, con un fotoperiodo di 16 h di luce e 8 h di buio.

3.12 TRASCRIZIONE INVERSA ED AMPLIFICAZIONE DEL cDNA (RT-PCR)

3.12.1 Estrazione di RNA da tessuti vegetali

100 mg di tessuto fogliare sono congelati e ridotti ad una polvere fine in mortaio con azoto liquido. Dall'omogenato così ottenuto è stato purificato l'RNA totale utilizzando l'"Rneasy Plant mini Kit" della QIAGEN seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice.

3.12.2 RT-PCR

Si basa sulla trascrizione di mRNA in cDNA e sulla successiva amplificazione di quest'ultimo con il metodo della reazione a catena della polimerasi (PCR) già descritto in precedenza. Sono stati utilizzati enzima e reagenti contenuti nel "GeneAmp RNA PCR Kit" della Perkin Elmer, che fa uso della trascrittasi inversa del virus della leucemia murina (MuLV) e per le amplificazioni seguenti dell'enzima AmpliTaq DNA Polymerase. Il kit permette di eseguire entrambe le reazioni nello stesso tubo.

3.13 ESTRAZIONE ED ANALISI DI PROTEINE VEGETALI

3.13.1 Estrazione di proteine totali da tessuti vegetali

Il tessuto vegetale è stato congelato in azoto liquido e ridotto in polvere in un mortaio. Al tessuto ancora congelato è stato aggiunto PBS (circa 200 ml per 100 mg di tessuto) contenente inibitori di proteasi ('Complete Mini', Roche) ed omogeneizzato utilizzando un omogeneizzatore a sonda di tipo 'Ultraturrax'. L'omogeneizzato è stato centrifugato a 20000g ed il supernatante, contenente la frazione di proteine solubili, è stato recuperato e analizzato.

3.13.2 Quantificazione delle proteine con il metodo Bradford

Per ogni saggio va preparata una curva standard utilizzando quantità crescenti (5,10 e 20 µl) di una soluzione di BSA 1 mg/ml. La reazione è stata ottenuta miscelando in un tubo 0,2 ml di reagente (BIORAD) con 0,8 ml di H₂O + il volume del campione desiderato. Tutte le reazioni sono state lette allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm.

3.14 TRASFORMAZIONE CON scFv DI PIANTE DI POMODORO MEDIATA DA AGROBATTERIO

I geni di scFvB4 ed scFvG4 sono stati subclonati dai costrutti pPVXscFv(G4) e pPVXscFv(B4). I plasmidi sono stati poi trasferiti in *Agrobacterium tumefaciens*, ceppo EHA 105 attraverso elettroporazione. L' *A. tumefaciens* così ottenuto è stato poi utilizzato per la trasformazione dei dischi fogliari del minipomodoro *Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom (Meissner *et al.*, 1993). Piante transgeniche di pomodoro sono state ottenute essenzialmente come descritto in Van Roekel *et al.*, 1993. La trasformazione ha incluso tre esperimenti indipendenti per ogni costrutto.

Dieci giorni dopo la germinazione, i cotiledoni sono stati tagliati da piantine germinate *in vitro* e poste con la pagina superiore verso l'alto su 'feeder layers' preparati con una sospensione di cellule di carote in terreno Gamborg's B5 (Sigma G 5893), 30 g/l di saccarosio, 0,5 mg/ml 2,4 D (2,4 Acido diclorofenossiacetico), 0,25 mg/ml BAP (benzilamminopurina), a pH 5,8. Il giorno successivo gli espianti sono stati incubati delicatamente in una soapensione di *Agrobacterium* per 20 min. I cotiledoni sono stati poi asciugati su un filtro di carta sterile e trasferiti su un secondo set di 'feeder layers' preparati come descritto sopra. Dopo 48 ore, gli espianti sono stati trasferiti su piastre contenenti il mezzo Murashige and Skoog (MS) (Sigma M 5524), vitamine Gamborg's B5 (Sigma G 2519), 30 g/l saccarosio, 2 mg/l zeatina riboside (ZR), 0,1 mg/ml acido indolacetico (IAA), 200 mg/ml cefotaxime, 50 mg/ml vancomicina, 7 g/l Difco bacto-agar (pH 5.8). Dopo 72 ore, gli espianti sono stati trasferiti su un mezzo selettivo, per selezionare gli espianti trasformati, contenente sali MS, vitamine Gamborg's B5, glucosio 1%, 2 mg/ml ZR, 0,1 mg/l IAA, 500 mg/l carbenicillina, 100 mg/l kanamicina, 7 g/l Difco Bacto-agar (pH 5.8). Dopo sei settimane, i rigeneranti resistenti alla kanamicina sono stati rimossi dai calli e trasferiti sul mezzo di radicazione: sali MS, vitamine Gamborg's B5, saccarosio 30 g/l, 0.1 g/l

mioinositolo, 0.1 mg/l acido indolbutirrico, 200 mg/l cefotaxime, 30 mg/l kanamicina e 7 g/l Difco bacto-agar (pH 5,8). I trasformanti primari (T0) (definiti come germogli che radicavano su terreno contenente 30 mg/l di kanamicina), sono stati analizzati per l'espressione degli anticorpi ricombinanti scFvB4 ed scFvG4 da omogenati di foglie e analizzati per immunoblotting quantitativo. I semi delle generazioni successive (T1-T5) sono stati fatti germinare su terreno selettivo MS con kanamicina 250 mg/l.

3.15 INFEZIONE DI PIANTE DI POMODORO CON CMV

Piante di minipomodoro 'wild type' sono state prima analizzate per la loro suscettibilità all'infezione da CMV. Sintomi tipici sono stati osservati solo con il ceppo CMV-F100, mentre le piante sono risultate asintomatiche per il ceppo CMV-CAR nelle stesse condizioni di infezione. La sfida con il virus è stata effettuata con le generazioni T1, T2, T3, T4 e T5 di piante transgeniche derivate da auto-impollinazione, selezionate su kanamicina e che esprimevano gli anticorpi ricombinanti. Per determinare la resistenza sono state infettate due foglie per ogni pianta, come descritto per l'infezione di *N. bentamiana*. Dopo essere state cosparse con polvere di Carborundum (Sigma), le foglie sono state sfregate tra le dita con un inoculo preparato in PBS (rapporto 1:3 w/v) di estratto di foglie giovani e sintomatiche di *N. bentamiana* infettata con CMV-F100. Le piante infettate sono state fatte crescere in una serra a contenimento priva di insetti (Livello 2 di biosicurezza) e i sintomi sono stati osservati fino a 8 settimane dopo l'inoculo.

Inoltre piante transgeniche della generazione T3 e piante 'wild type' sono state infettate anche con un virus non correlato, il TBSV. L'infezione è stata effettuata come descritto per il CMV.

3.16 TEST DI RECUPERO DEL VIRUS

Il test per il recupero del virus su piante di *N. bentamiana* è stato effettuato come segue: quattro piante transgeniche della generazione T3 resistente e quattro piante di minipomodoro di controllo sono state infettate con CMV-F100 come descritto sopra. Quattro settimane dopo l'infezione sono state prelevate le foglie sistemiche di tutte le piante e da queste sono stati preparati estratti come descritto sopra. Questi sono stati poi usati per inoculo meccanico di piante di *N. bentamiana* allo stadio di tre-quattro foglie, come descritto sopra. Sono state infettate due foglie per pianta.

3.17 SOLUZIONI UTILIZZATE

TAE 50x

242 g Tris Base; 57,1 ml acido acetico glaciale; 100 ml EDTA 0.5 M pH 8; H₂O fino ad 1 litro.

TAMPONE DI CORSA 5 X

15 g Tris base; 72,2 g Glicina; 5 g Na dodecilsolfato (SDS)M; H₂O fino ad 1 litro.

TAMPONE DI CARICAMENTO 2 X

1,25 ml 1M Tris-HCl pH 6,8; 2 ml glicerolo, 2 ml SDS 20% (w/v); 1 ml 2-β mercaptoetanol; 0,1 g bromofenolo blu; H₂O fino ad 10 ml.

TAMPONE DI TRASFERIMENTO

3,02 g Tris Base; 14,4 g Glicina; 200 ml metanolo; H₂O ultrapura fino ad 1 litro.

PBS 10 X

76 g NaCl; 25 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O; 4 g NaH₂PO₄ x H₂O; H₂O fino ad 1 litro; pH 7,2.

TES

Tris-HCl 0.2 M pH8.0; saccarosio 0.5 M; EDTA 0,5 mM.

SOLUZIONE DI 'BLOCKING

10 ml PBS 10 x; 200 µl Tween 200; 5 g latte scremato in polvere; H₂O fino a 100 ml.

SOLUZIONE DI POLIACRILAMMIDE

29,2 g Acrilammide; 0.8 g Bis-Acrilammide; H₂O ultrapura fino ad 1 l

SOLUZIONE DI FISSAGGIO/STOP

500 ml Metanolo; 120 ml Acido acetico glaciale; H₂O ultrapura fino ad 1 l

SOLUZIONE DI SVILUPPO

60 g Na₂CO₃ ; H₂O ultrapura fino ad 1 l

SOLUZIONE DI TIOSOLFATO DI SODIO

150 mg Na₂S₂O₃ x 5 H₂O; H₂O ultrapura fino ad 1 l

3.18 TERRENI PER LE COLTURE BATTERICHE

Terreno LB (Luria-Bertani)

Tryptone 10 g; estratto di lievito 5 g, NaCl 5 g; H₂O fino ad 1 l.

Terreno 2XYT

Tryptone 17 g; estratto di lievito 10.g; NaCl 5 g; H₂O fino ad 1 l.

Terreno LB/2XYT agar

Agar 15 g; LB/2XYT fino ad 1 l.

4. RISULTATI

4.1 SELEZIONE DI scFv ANTI-CMV DALLA ‘LIBRERIA F8’

Anticorpi ricombinanti scFv contro CMV-F100 (serogruppo I) oppure contro CMV-CAR (serogruppo II) sono stati selezionati dalla ‘libreria F8’ ad esposizione su fago (‘F8 library’) (Desiderio *et al.*, 2001). Sono stati immobilizzati nell’immunotubo virioni integri di CMV in PBS, pH 7.0, cioè in condizioni tali da mantenere l’integrità del virus (vedi materiali e metodi). Il CMV è costituito da particelle poliedriche tutte con un’unica proteina di rivestimento, presente in multiple copie nel virione. La selezione contro il virus purificato, quindi, ci permette di isolare scFv specifici per la proteina di rivestimento. ScFv specifici contro il virus sono stati ottenuti sia per CMV-F100 che per CMV-CAR. In particolare, dopo quattro cicli di selezione contro CMV-F100, i singoli cloni ottenuti sono stati analizzati in test ELISA per la loro capacità di legare il virus. Circa il 60% dei cloni analizzati sono risultati positivi; sette di questi, con un forte segnale in ELISA (almeno quattro volte maggiore rispetto al controllo negativo), sono stati sequenziati. Sono state identificate cinque sequenze differenti; di queste tre erano uguali (clone G4), mentre le altre (B4, G2, C3 ed F6) erano diverse (tabella 2). Contro il virione appartenente al serogruppo II (CMV-CAR), invece, sono stati effettuati cinque cicli di selezione. L’analisi dei singoli cloni in ELISA (con il 50% positivi) e la successiva analisi di sequenza di cinque cloni che mostravano un forte segnale ha portato ad identificare due sequenze diverse; di queste quattro erano identiche al clone B4 e l’altra al clone G4, ambedue già selezionati contro CMV-F100 (tabella 2).

Clone	VH CDR3 ^a	VLCDR3 ^b	Specificità
A5/D5/ G4	NNWS	GQRK	F100/CAR
B4	NNYS	GRRA	F100/CAR
G2	VTYN	SRRR	F100
C3	NLLA	NRHE	F100
F6	NLLA	NRRR	F100

Tabella 2. Sequenza aminoacidica delle CDR3 degli anticorpi ricombinanti isolati dalla libreria F8. contro ambedue i ceppi di CMV (F100 e CAR).

^a Posizione degli aminoacidi dal 95 al 98.

^b Posizione degli aminoacidi dal 91 al 94.

Gli anticorpi ricombinanti ottenuti sono stati espressi nel periplasma batterico; tutti sono stati secreti come proteina solubile e purificati per cromatografia di affinità per mezzo dell'IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography), utilizzando la coda di sei istidine (His₆ tag) presente come tag in tutti gli anticorpi provenienti dalla “libreria F8”. I livelli di espressione proteica erano elevati, circa 1-2 mg per litro di coltura batterica.

Gli anticorpi contro il CMV sono stati poi caratterizzati per mezzo di alcuni saggi *in vitro*. E' stata prima analizzata la specificità dei cloni selezionati: estratti periplasmatici o scFvs purificati sono stati analizzati in ELISA contro antigeni non correlati: BSA, actina, lisozima, superossido dismutasi (SOD), virus dell'aricciamento maculato del carciofo (AMCV) e la nucleoproteina del tospovirus (TSWV-N). Non è stato osservato alcun legame con questi antigeni per i cloni B4, G4 e G2, dimostrando la loro specificità per il CMV. Il scFv C3 ha mostrato cross-reattività con gli antigeni BSA e lisozima; l'anticorpo F6, invece, per superossido dismutasi (SOD), AMCV e la nucleoproteina del tospovirus.

Per verificare che i cloni specifici (G4, B4 e G2) fossero in grado di legare il CMV in piante infettate è stato compiuto un saggio ELISA. Estratti periplasmatici di G4, B4 o G2 sono stati incubati su estratti di *Nicotiana benthamiana* infettati con CMV-F100; l'scFv legato al virus è stato rivelato con l'anticorpo monoclonale M2 anti-flag che riconosce specificamente la codina di 6 aminoacidi all'estremità C-terminale degli anticorpi della ‘libreria F8’. I risultati dimostrano che tutti e tre gli anticorpi ricombinanti sono in grado di legare in maniera specifica il CMV in estratti di piante infettate; infatti non è stato osservato alcun legame con gli estratti di piante di controllo non infettate (Figura 20). Anche se gli estratti periplasmatici testati in questo esperimento non sono stati normalizzati per quantità di proteine totali, il risultato ottenuto ci ha permesso di osservare che gli anticorpi G4 e B4, avendo un segnale maggiore, probabilmente si legano al CMV con una maggiore affinità rispetto al G2. Quindi i due anticorpi ricombinanti scFvG4 e scFvB4, in quanto specifici per ambedue i ceppi di CMV e con un segnale in ELISA più forte, sono stati caratterizzati maggiormente in dettaglio.

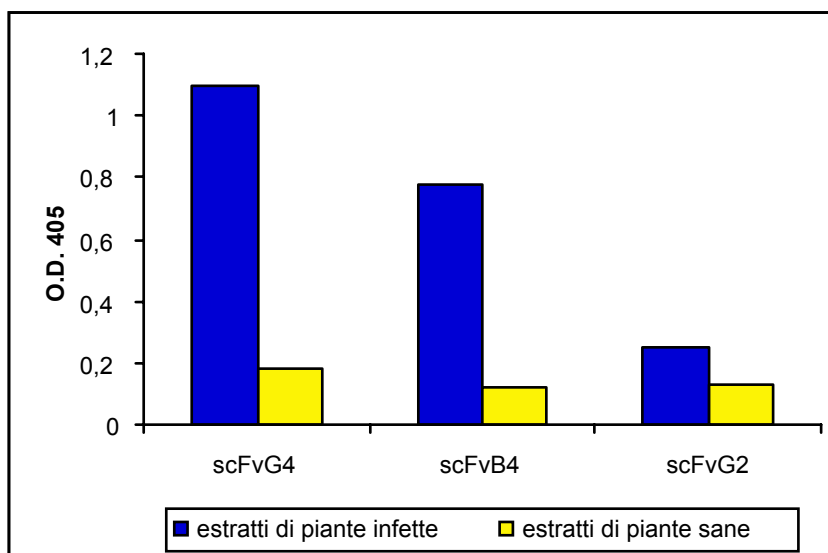


Figura 20. Analisi della reattività degli scFv selezionati su tessuti infettati con CMV-F100. Risultato di un TAS-ELISA nel quale 80 μ l di estratti periplasmatici sono stati incubati su estratti infettati (barre blu) o sani (barre gialle) di *Nicotiana benthamiana*, come descritto nei materiali e metodi. Il CMV-F100 è stato immobilizzato con l'anticorpo monoclonale A343. I segnali riportati sono stati ottenuti dopo un'ora di sviluppo.

4.2 CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA DEGLI ANTICORPI SELEZIONATI

4.2.1 Western blot e co-immunoprecipitazione

Dopo purificazione, gli scFvG4 e scFvB4 sono stati analizzati per la loro capacità di legare il CMV (purificato o da estratti di pianta infettati) in immunoblotting. Estratti da foglie di *N. benthamiana* sintomatiche per il CMV o CMV purificato sono stati separati per SDS-PAGE e poi elettrotrasferiti su membrana PVDF. Questa è stata incubata con il scFv purificato, che è stato poi rivelato con l'anticorpo monoclonale anti-flag M2 come descritto in materiali e metodi. Sia scFvG4 che scFvB4 non sono stati in grado di riconoscere il virus in immunoblotting.

E' stato allora investigato se i due anticorpi ricombinanti legassero il virus in soluzione per mezzo di un esperimento di co-immunoprecipitazione. Il CMV e il scFvG4, ambedue purificati, sono stati incubati insieme e poi immunoprecipitati con la proteina L-Sepharose, in grado di legare specificamente il scFv. Dopo SDS-PAGE gli immunoprecipitati sono stati trasferiti su membrana PVDF e incubati con l'anticorpo monoclonale anti-Flag M2

per rivelare il scFv, o con l'anticorpo policlonale A343 per rivelare il virus (vedi materiali e metodi). Come dimostrato nella figura 21 una banda di 30 K, corrispondente al peso molecolare della proteina di rivestimento del CMV (CMV-CP), co-immunoprecipita con scFvG4. Gli stessi risultati sono stati ottenuti per scFvB4. Questi dati suggeriscono che ambedue gli anticorpi ricombinanti siano in grado di legare specificamente il CMV in soluzione, probabilmente riconoscendo un epitopo discontinuo non più rilevabile dopo la denaturazione in immunoblotting.

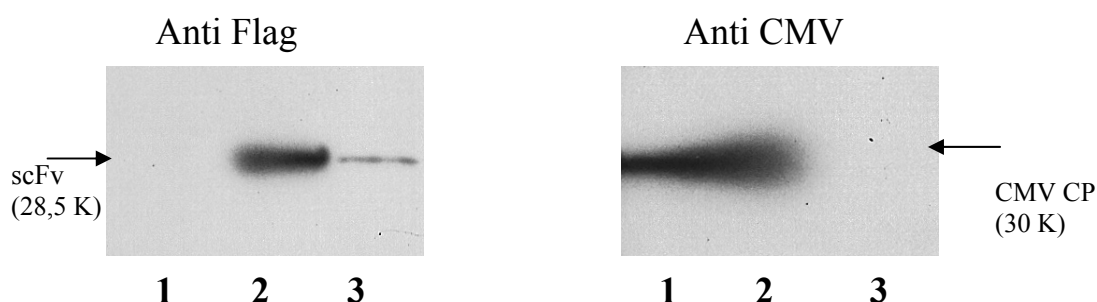


Figura 21 Immunoblot del complesso co-immunoprecipitato CMV/scFvG4. ScFvG4 purificato (600 ng) è stato incubato con 150 ng di CMV-F100 purificato ed immunoprecipitato con proteina L-Sepharose come descritto nei materiali e metodi. Lanes 1: CMV purificato (50 ng); lanes 2: co-immunoprecipitati; lanes 3: scFvG4 purificato (20 ng). La membrana a sinistra è stata incubata con l'anticorpo monoclonale anti-Flag per rivelare il scFv, mentre la membrana a destra è stata incubata con l'anticorpo policlonale A343 specifico per il CMV-F100.

4.2.2 Risonanza plasmonica di superficie

L'analisi dell' interazione in tempo reale per mezzo della risonanza plasmonica di superficie (SPR) per calcolare i parametri cinetici dell'associazione e della dissociazione CMV/scFv è stata condotta su particelle di CMV-F100 purificate coniugate sul 'sensor chip'. ScFvG4 o scFvB4 a differenti concentrazioni in HBS (vedi materiali e metodi) sono stati iniettati nella cella di flusso dello strumento ad una velocità di 20 μ l/min. Nella figura 22 è riportato il sensorgramma ottenuto per scFvG4 a varie concentrazioni. L'aumento in unità di risonanza (RU) rappresenta il legame dell' anticorpo al CMV immobilizzato ed è indicativo dell'inizio della fase di associazione. La linea di soglia, al culmine dell'associazione, raffigura

il momento di saturazione dei siti di legame, cioè il raggiungimento di un equilibrio dinamico tra associazione e dissociazione.

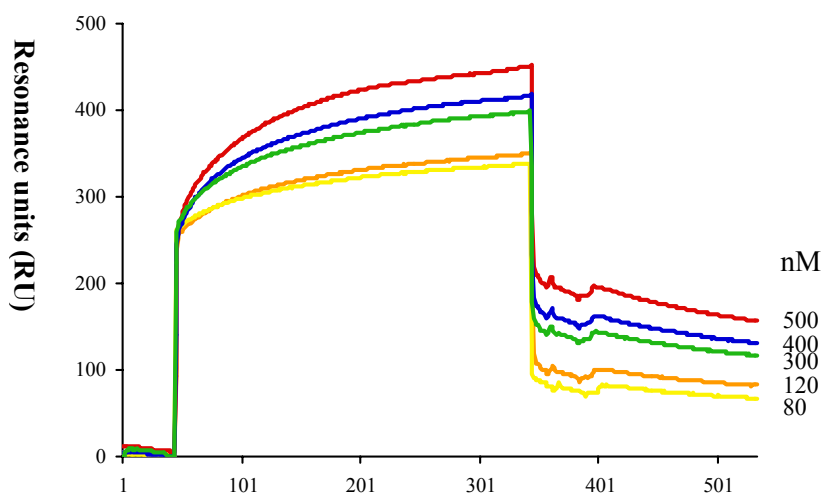


Figura 22. Analisi mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR). Sensorgramma di curve sovrapposte delle iniezioni di scFvG4 a concentrazioni crescenti sul chip con il CMV immobilizzato.

Il decremento nelle RU dalla linea di soglia, infine, rappresenta la fase di dissociazione del complesso scFv/CMV causata dal lavaggio della superficie con il tampone.

Dalle analisi di interazione è stato possibile estrapolare, per ogni curva di interazione ad una certa concentrazione molare, i parametri cinetici. Le costanti di associazione (k_{on}) e dissociazione (k_{off}) osservate sono $3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $2,3 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ per scFvG4 e $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $2.1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ per scFvB4 con una costante di dissociazione all'equilibrio (K_D) di 64 e 42 nM rispettivamente, come riportato nella tabella 3.

Tabella 3. Parametri dell'affinità tra scFvG4 o scFvB4 isolati dalla libreria F8 verso il CMV.

	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_D (nM)$
scFvG4	3.6×10^4	2.3×10^{-3}	63
scFvB4	5×10^4	2.1×10^{-3}	42

Le costanti di associazione (k_{on}) e dissociazione (k_{off}) sono state determinate mediante risonanza plasmonica di superficie. Particelle di CMV purificato sono state immobilizzate sul sensor chip. La costante di dissociazione all'equilibrio (K_D) è stata calcolata come k_{off}/k_{on}

Inoltre, sono stati compiuti esperimenti di competizione per mezzo della risonanza plasmonica di superficie per investigare se questi anticorpi riconoscessero lo stesso epitopo sulla proteina di rivestimento virale. Il chip con immobilizzato CMV-F100 (circa 5400 unità di risonanza, RU) è stato saturato con scFvG4; subito dopo è stato iniettato scFvB4 e non è stato osservato alcun legame sul chip. Lo stesso risultato è stato ottenuto quando il chip è stato saturato prima con scFvB4 e poi è stato iniettato scFvG4 (Figura 23). Questi risultati suggeriscono che i due anticorpi riconoscono, completamente o parzialmente, uno stesso epitopo della proteina di rivestimento del virus, anche se non si può escludere che ci possa essere l'influenza anche altri fattori, come ad esempio l'ingombro sterico.

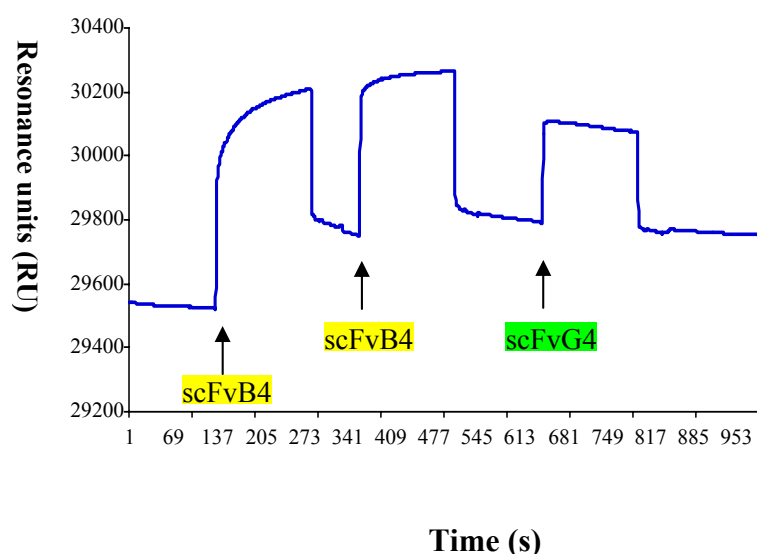


Figura 23. Sensorgramma dello studio di competizione per la mappatura dell'epitopo tra scFvG4 e scFvB4. La terza linea si riferisce al legame di scFvG4 dopo due iniezioni consecutive di quantità a saturazione di scFvB4 (linea 1 e 2).

4.3 ANALISI DELL'INTERAZIONE scFv/CMV *IN VIVO* PER MEZZO DEL SISTEMA DOPPIO IBRIDO IN LIEVITO

Per verificare se gli anticorpi scFvG4 e scFvB4 fossero in grado di legare la proteina di rivestimento del CMV nell'ambiente riducente del citoplasma. *in vivo*, gli scFv e la CMV-CP sono stati espressi nel sistema doppio ibrido in lievito. A tale scopo è stato utilizzato il sistema Hybrid HunterTM Invitrogen. Questo sistema prevede la costruzione di due proteine di fusione separate; una è con la proteina Lex, (dominio di legame al DNA (DBD) del fattore di trascrizione), mentre l'altra è con il dominio di attivazione del fattore di trascrizione, proteina B42. Questi due ibridi sono costruiti in due plasmidi separati per l'espressione delle proteine di fusione e sono co-trasformati in un ceppo di lievito che contiene due geni reporter (*lacZ* e un marker per auxotrofia). Le regioni regolatrici di questi due geni reporter contengono i siti di legame per LexA; se le due proteine di fusione interagiscono si ricostituisce il fattore di

trascrizione (sito di legame al DNA e dominio di attivazione) e si ha l'espressione dei geni reporter.

Il gene per la proteina di rivestimento del CMV (CMV-CP) è stata fuso con *LexA* nel plasmide pHybLex/Zeo (Invitrogen) nei siti *EcoRI/PstI*, come descritto nei materiali e metodi. Il gene della CMV-CP è stato ottenuto mediante PCR a trascrizione inversa (RT-PCR) partendo da RNA estratto da piante di *N. benthamiana* infettate con CMV, utilizzando una coppia di oligonucleotidi di innesco specifici per la proteina di rivestimento del CMV (CMV back e CMV for) (**tabella 3**). I geni per gli scFv, invece, sono stati fusi con B42 nel vettore pYEST Trp2 (Invitrogen) nei siti *EcoRI/NotI*, dopo amplificazione per PCR dal fasmide pDN332 dei geni codificanti i frammenti anticorpali con oligonucleotidi innesco specifici (VHEM back e VK1 for) per inserire i siti di restrizione per *EcoRI* al 5' e *NotI* al 3' (tabella 4). I due vettori per l'espressione delle proteine di fusione così ottenuti sono stati co-trasfettati in cellule di *Saccharomyces cerevisiae*, ceppo L40. Prima di analizzare l'eventuale interazione *in vivo* fra l'anticorpo e la proteina di rivestimento virale è stata verificata la corretta espressione delle proteine di fusione mediante immunoblotting dei lisati di lievito (Figura 24). Come dimostrato dall'immunoblotting, tutte e tre le proteine di fusione (B42-scFvB4, B42-scFvG4 e LexA-CMV) sono espresse correttamente (si osserva una banda specifica al peso molecolare corrispondente a quello atteso) e ad alti livelli nel citoplasma di lievito.

Tabella 4 Sequenze degli oligonucleotidi di innesco utilizzati per l'amplificazione dei geni della proteina di rivestimento del CMV e dei geni di scFvG4 e scFvB4.

oligonucleotidi innesco per il clonaggio della proteina di rivestimento del CMV in pHybLex/Zeo
CMV back: 5' CG GAA TTC <u>ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC</u> 3' <i>EcoRI</i> CMV CP CMV for: 5' AA CTG CAG <u>TCA GAC TGG GAG CAC CCC AGA</u> 3' <i>PstI</i> CMV CP
Oligonucleotidi innesco per il clonaggio dei geni scFvG4 e scFvB4 in pYEST Trp2 (amplificano sequenza scFv da libreria F8)
VHHEM back: 5' CAT GAATTC <u>AGG TGC AGC TGC AGG AGT CTG</u> 3' <i>EcoRI</i> PelB VK1 for: 5'CG GCGGCCGC <u>CTT GTC GTC GTC GTC TCC GTA GTC</u> <i>NotI</i>

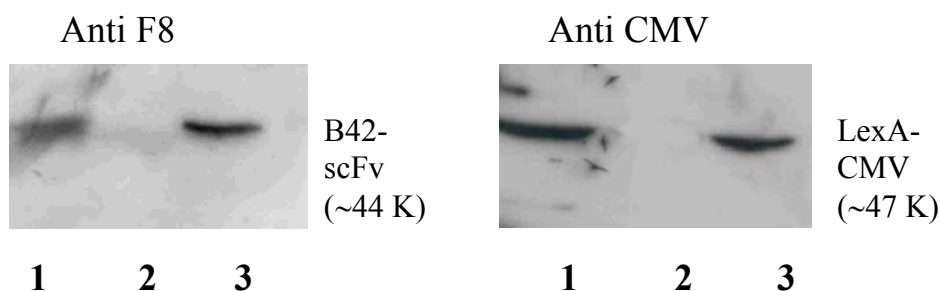


Figura 24. Immunoblot delle proteine di fusione B42-scFvB4, B42-scFvG4 e LexA-CMV in *S cerevisiae*. In ogni corsia sono stati caricati 20 μ l di campione, come descritto in materiali e metodi. **1:** Lievito trasformato con B42-scFvG4 e LexA-CMV **2:** Lievito non trasformato. **3:** Lievito trasformato con B42-scFvB4 e LexA-CMV. La membrana a sinistra è stata incubata con un anticorpo policlonale di coniglio specifico per gli anticorpi derivati da F8 mentre la membrana a destra è stata incubata con l'anticorpo policlonale A343 specifico per il CMV-F100.

Successivamente è stata investigata l'interazione scFv/CMV nel citoplasma di lievito. I trasformanti che esprimevano ambedue le proteine di fusione (B42-scFvB4/scFvG4 e LexA-CMV), sono stati selezionati per prototrofia dell'istidina su piastre prive di questo aminoacido, ma non si è osservata la crescita di colonie né nei trasformanti con scFvG4 né in quelli con scFvB4. Questo risultato negativo è stato confermato anche dal saggio β -galattosidasi su filtro (vedi materiali e metodi), indicando l'assenza di interazione scFv/CMV nel citoplasma di lievito. Questi risultati potrebbero essere spiegati con la mancanza dell'assunzione di una corretta struttura della CMV-CP nel citoplasma di lievito; è infatti noto che la proteina di rivestimento del CMV non è in grado di assemblarsi correttamente in assenza dell'RNA virale. Questo suggerisce che probabilmente i due scFvs riconoscono un epitopo non-lineare che si forma in seguito all'assemblaggio del virus, confermando quanto osservato dall'esperimento di immunoblotting nel quale gli anticorpi ricombinanti non erano in grado di legare la proteina di rivestimento virale in seguito a denaturazione di questa.

4.4 ESPRESSIONE TRANSIENTE IN *NICOTIANA BENTHAMIANA* DEGLI ANTICORPI scFvB4 E scFvG4 MEDIANTE IL VETTORE PVX

4.4.1 Clonaggio dei geni scFvG4 e scFvB4 nel vettore di espressione transiente pPVX201

L'espressione mediata da PVX rappresenta un saggio veloce per analizzare il comportamento di frammenti anticorpali nel citoplasma, in ambiente riducente; dopo l'estrazione da foglia è possibile testare l'accumulo e la giusta compartimentalizzazione dei frammenti anticorpali (Franconi *et al.*, 1999). Per analizzare il comportamento di scFvG4 ed scFvB4 nella cellula vegetale, i due anticorpi sono stati espressi in maniera transiente nel citoplasma di piante di *N. benthamiana*.

Il gene codificante per il frammento scFvG4 o scFvB4 è stato clonato nel vettore di espressione transiente pPVX201 (Baulcombe *et al.* 1995). Le sequenze codificanti i due scFv sono state amplificate mediante PCR dal fasimide pDN332 con oligonucleotidi disegnati per inserire i siti di restrizione *ClaI* e *XbaI* a monte (oligonucleotide PVX CX back) ed il sito di restrizione *Sall* a valle del gene codificante per l'scFv (oligonucleotide PVX Flag) (tabella 5). Quest'ultimo oligonucleotide permette di mantenere la sequenza di riconoscimento Flag a valle dell'scFv, mentre porta all'eliminazione della sequenza di riconoscimento His (His₆). I geni per l'scFv sono stati poi inseriti come frammenti *ClaI/Sall* nel *polylinker* del vettore pPVX201, ottenendo i costrutti PVXscFv(G4) e PVXscFv(B4).

Tabella 5. Sequenze degli oligonucleotidi di innesco utilizzati per l'amplificazione dei geni di scFvG4 e scFvB4 dal fasimide pDN332.

PVX Cx back:

5' TTC **ATC GAT** **TTG CAT GCT** **CTA GAC** ATG CAG GTG CAG CTG CAG 3'
 ClaI *SphI* *XbaI* VH F8

PVX Flag:

5' TCC **GTC GAC** **CTA** CTT GTC GTC GTC GTC TCC GTA GTC 3'
 Sall STOP Flag-tag

4.4.2 Infezione di piante di *Nicotiana benthamiana* con PVXscFv(G4/B4)

Il DNA plasmidico (10 μ g) di ogni costrutto è stato utilizzato per infettare piante di *N.benthamiana*. Alla comparsa dei sintomi nelle foglie sistemiche (circa 10 giorni dopo l'infezione), le foglie apicali sono state prelevate e analizzate per l'espressione degli anticorpi mediante Western blot utilizzando l'anticorpo monoclonale M2 anti-Flag.

Ambedue i frammenti anticorpali sono espressi ad alti livelli nella frazione solubile degli estratti di pianta come dimostrato nella figura 25 dove si osserva un'intensa banda di 28.5 K corrispondente al peso molecolare del frammento scFv.

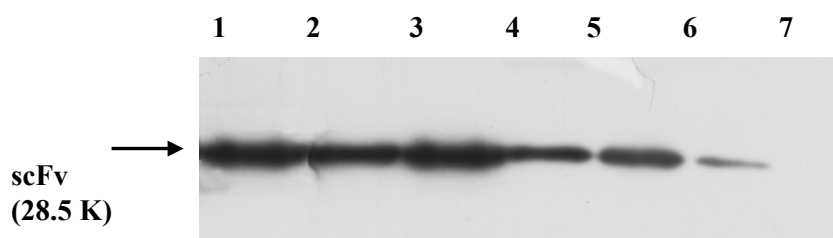


Figura 25: Espressione transiente di scFvB4 ed scFvG4 nel citoplasma di *N. benthamiana*. Immunoblot dell'espressione transiente mediata da PVX di scFvB4 e scFvG4 nel citoplasma di *Nicotiana benthamiana*. 25 μ g di proteine solubili totali (TSP) di estratti di foglie sistemiche sintomatiche sono stati analizzati mediante SDS-PAGE, trasferiti su membrana PVDF e incubati con l'anticorpo monoclonale anti-Flag M2. **1-2:** Estratti di *N. benthamiana* infettati con PVX-B4; **3-5:** Estratti di *N. benthamiana* infettati con PVX-G4; **6:** 20 ng di scFv G4 purificato; **7:** Estratto di *N. benthamiana* non infettata, usato come controllo negativo.

4.5 ESPRESSIONE MEDIATA DA AGROBATTERIO DI scFvG4 E scFvB4 IN POMODORO

4.5.1 Clonaggio dei geni scFvG4 e scFvB4 nel vettore di pBI121

Il risultato ottenuto con l'espressione transiente di scFvG4 e scFvB4 in *N. benthamiana*, e cioè l'espressione ad alti livelli di ambedue gli anticorpi nel citoplasma della cellula vegetale, ha aperto la strada per la costruzione di piante transgeniche. I due frammenti anticorpali sono stati espressi in piante di mini-pomodoro (cultivar *Lycopersicon esculentum*) (Meissner *et al.*, 1997). Questa varietà costituisce un modello per lo studio del pomodoro. Infatti cresce ad alta densità (fino a 1357 piante per m²), ha un ciclo vitale molto breve (70-90 giorni dalla germinazione al frutto) e ha una frequenza di trasformazione con Agrobatterio molto alta, fino all' 80%. Inoltre, differisce dalle cultivar standard di pomodoro per soli due geni principali; quindi ogni transgene può essere studiato in mini-pomodoro e, quando necessario, trasferito in una cultivar standard.

Per la trasformazione mediata da *A. tumefaciens* di questa varietà di pomodoro sono stati ottenuti costrutti con i frammenti anticorpali privi di sequenza segnale, in modo da indirizzare il transgene nel citoplasma. I geni di scFvB4 ed scFvG4 sono stati subclonati dai costrutti PVXscFv(G4) e PVXscFv(B4) in un vettore derivato da pBI (descritto in Tavladoraki *et al.*, 1993) sotto il controllo del promotore 35S del CaMV dopo digestione con *Xba I* al 5' e *Sal I* al 3'. I costrutti ottenuti permettono l'espressione dell'anticorpo ricombinante all'interno della cellula vegetale con la sequenza di riconoscimento Flag a valle dell'scFv.

La trasformazione è stata effettuata come riportato in materiali e metodi; nella figura 26 sono riportati i germogli laterali derivati dai calli trasformati e selezionati su kanamicina.

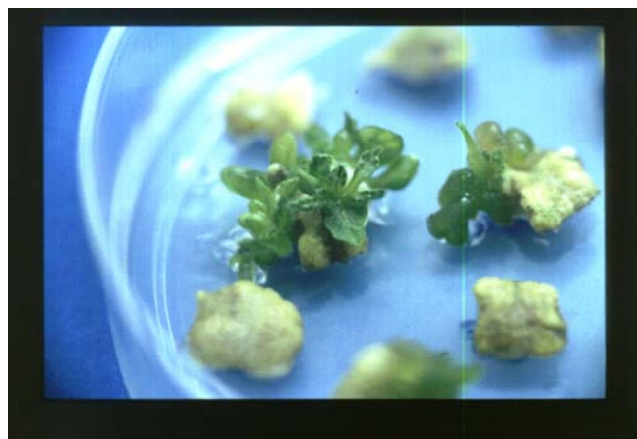
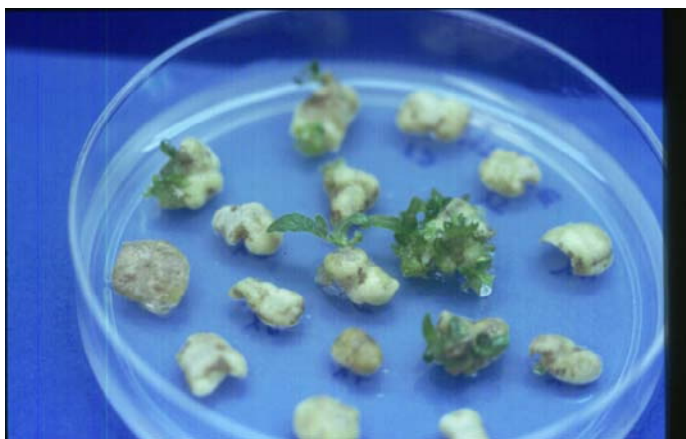


Figura 26 Foto dei germogli laterali resistenti alla kanamicina derivati dai calli trasformati.

Dopo trasformazione, i rigeneranti ottenuti sono stati selezionati per la resistenza alla kanamicina e analizzati per la presenza della proteina ricombinante mediante Western blot con l'anticorpo monoclonale M2 Anti-Flag. Si è osservata una banda del peso molecolare atteso in numerosi rigeneranti derivati dalle trasformazioni con ambedue i geni; in particolare 5 piante trasformate con scFvB4 su 5 analizzate hanno mostrato la proteina ricombinante, mentre 3 piante trasformate con scFvG4 su 9 analizzate mostravano la presenza del transgene, come dimostrato nella figura 27

In piante derivate da eventi di trasformazione indipendenti, i frammenti anticorpali ricombinanti si accumulano tra lo 0.05% e lo 0.5% delle proteine solubili totali (TSP).

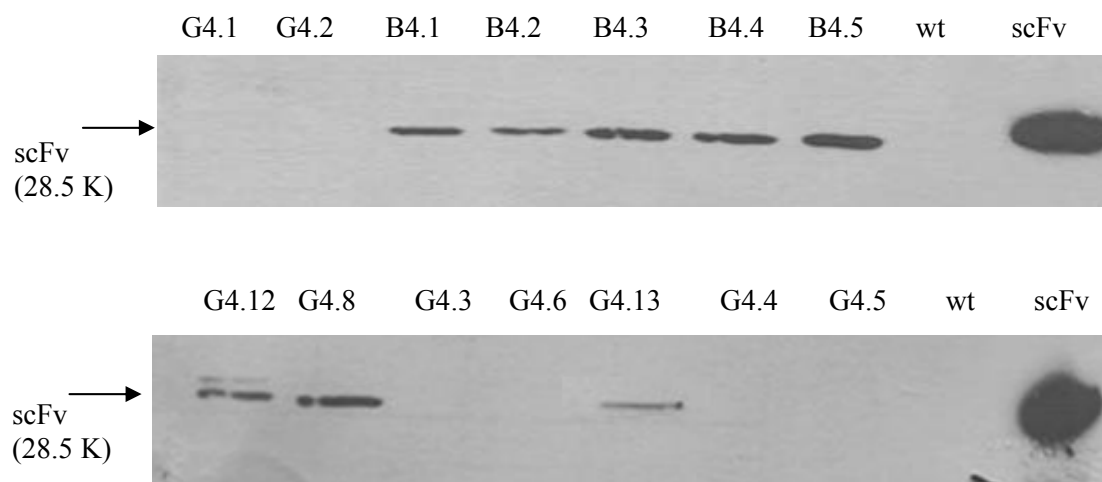


Figura 27: Immunoblot di scFvB4 e scFvG4 espressi nel citoplasma di piante di mini pomodoro (generazione T0). In ogni pozzetto sono stati caricati 25 μ g di TSP, estratte da foglie di piante di mini pomodoro transgenico. Come controllo negativo sono state usate piante non trasformate (wt), mentre scFv purificato (1 μ g) è stato usato come controllo positivo.

La sintomatologia del CMV su piante di minipomodoro non è mai stata descritta; come prima analisi sono state, quindi, infettate piante di mini-pomodoro 'wild type' e i sintomi sono stati osservati giornalmente. Le prime due foglie dopo i cotiledoni sono state inoculate ciascuna con 80 μ l di estratti di *N. benthamiana* infettata con CMV-F100. La dose virale dell'inoculo era di circa 20 μ g/ml, stimata mediante ELISA quantitativo: gli estratti di *N.benthamiana* infettata a diverse diluizioni in PBS sono stati immobilizzati su pozzetti ELISA ed il segnale è stato rivelato con l'anticorpo policlonale anti-CMV A343; il segnale ottenuto è stato confrontato con quello osservato con quantità note di CMV purificato. Tre giorni dopo l'infezione le foglie inoculate presentavano clorosi e dieci giorni dall'inoculo i sintomi sono comparsi nelle foglie sistemiche. Inizialmente si è osservata clorosi, nei giorni successivi il tessuto fogliare è andato incontro a necrosi e le foglie si sono ripiegate; inoltre la crescita della pianta è bloccata e questa assume un aspetto cespuglioso. La pianta non risce a svilupparsi ulteriormente e a produrre fiori e frutti maturi (Figura 28).



Figura 28 Sintomatologia dell'infezione da CMV su una pianta di minipomodoro 'wild type' un mese dopo l'inoculo con CMV-F100.

Dopo l'osservazione della sintomatologia sulle piante di controllo, alcune linee di minipomodoro transgenico sono state sfidate con il virus inoculando le foglie con 80 μ l di estratti di *N. benthamiana* infettata con CMV-F100. In un esperimento preliminare, solo un piccolo numero di piante della generazione transgenica T1 (quelle che comunque avevano mostrato espressione di scFv nella generazione T0) sono state sfidate con il CMV. Il piccolo numero deriva dal fatto che dalla generazione T0 abbiamo ottenuto da ogni pianta solo un numero limitato di semi che non ci ha permesso di analizzare un numero statisticamente significativo di piante per ogni linea transgenica T1. Questo esperimento preliminare, però, ha portato all'identificazione di due linee transgeniche, G4.8 (che esprime scFvG4) e B4.5 (che esprime scFvB4) che hanno mostrato protezione nei confronti del virus (Tabella 6). Estratti di foglie delle piante infettate, normalizzati per quantità proteica totale, sono stati analizzati per immunoblot per indagare la quantità di anticorpo ricombinante presente in questa generazione. Come mostrato nella figura 29, gli estratti che derivano dalle piante che non hanno mostrato sintomi (dalle linee B4.5 e G4.8) presentano una maggiore quantità di anticorpo, facendo ipotizzare una diretta correlazione tra resistenza e quantità di scFv.

Tabella 6. Numero di piante per ogni linea transgenica e wild type analizzata prive di sintomi visibili 25 giorni dopo l'inoculo.

	N° piante senza sintomi
Wt	0/3
B4.1	0/3
B4.4	0/3
B4.5	3/3
G4.8	3/5
G4.12	1/3

Nella tabella sono evidenziate le linee B4.5 (tutte le piante analizzate non presentano sintomi) e G4.8 (tre su cinque sono prive di sintomi).

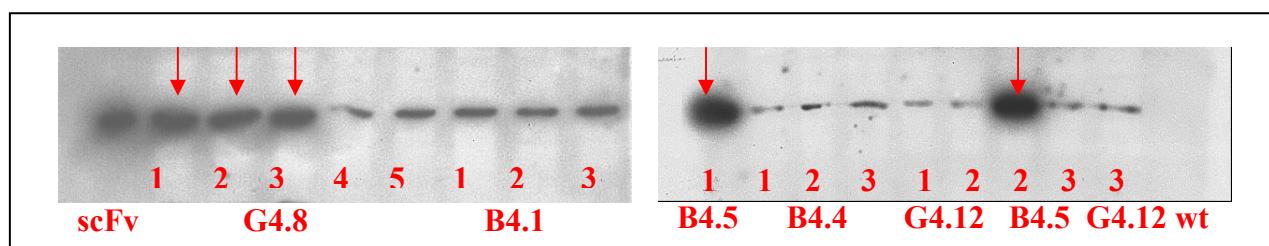


Figura 29. Immunoblot di estratti di piante di minipomodoro infettate con CMV e normalizzati per quantità di proteine totali. Con le frecce sono evidenziate le piante con la quantità più elevata di transgene, che corrispondono alle piante che non hanno mostrato sintomi nell'infezione da CMV. I numeri corrispondono alle singole piante analizzate per ogni costrutto. Il Western blot è stato incubato con il monoclonale M2 anti-flag.

Per confermare questi risultati, la sfida con il virus è stata ripetuta sulla progenie T2 delle piante dimostratesi resistenti in T1, B4.5 e G4.8 autoimpollinate. Sono state infettate 50 piante per ogni linea transgenica e per il controllo e i sintomi sono stati osservati giornalmente. Dieci giorni dopo l'inoculo (d.p.i.) tutte le piante transgeniche erano prive di sintomi da infezione virale, mentre le tutte le piante di controllo (wt) mostravano sintomi nelle foglie sistemiche (Figura 30). Dopo un mese, il 50 % delle piante derivate dalla linea G4.8 non mostrava alcuna lesione sistemica, risultando completamente resistente all'infezione da CMV (Figura 30). Queste piante, anche dopo un periodo di osservazione prolungato (due mesi), non avevano accumulato virus nelle foglie sistemiche. Il 30% delle rimanenti piante G4.8 e tutte le piante della linea B4.5, invece, hanno sviluppato sintomi virali inizialmente (clorosi nelle prime foglie sistemiche), ma sono state poi in grado di crescere ulteriormente e di sviluppare frutti e semi regolarmente. Il 20% delle rimanenti piante della linea G4.8 si sono dimostrate suscettibili all'infezione virale e hanno sviluppato i primi sintomi 25 giorni dopo l'inoculo, comunque 15 giorni dopo le piante di controllo (Figura 30).

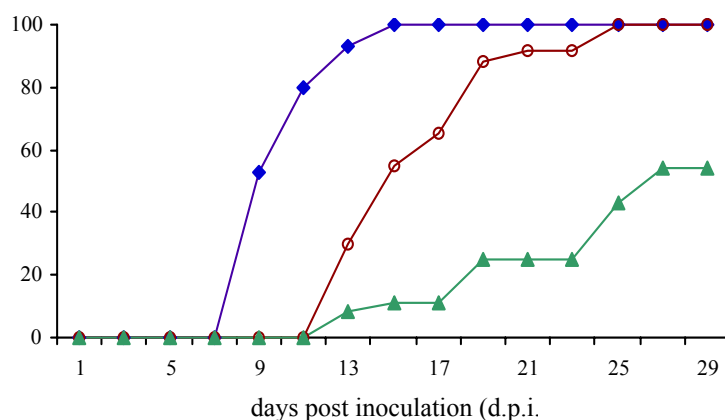


Figura 30 Sfida con il virus CMV su piante transgeniche e di controllo.

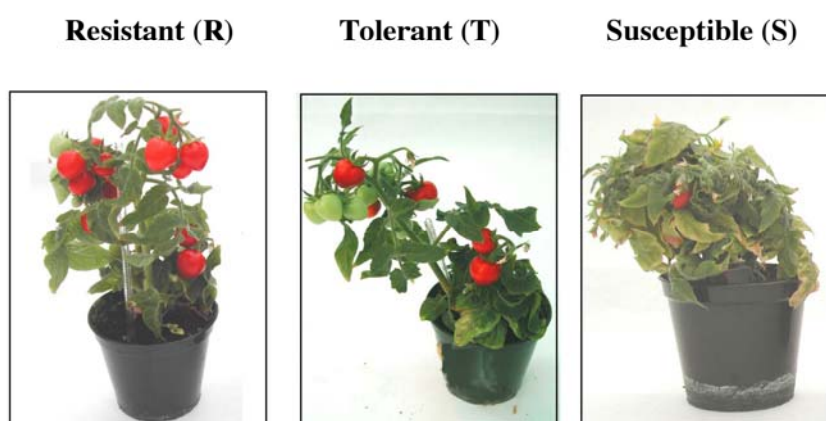
Percentuale delle piante transgeniche della generazione T2 e delle piante di controllo che mostravano i sintomi dell'infezione virale a giorni successivi all'inoculo (d.p.i.) con estratti di pianta infettati con CMV.

Controllo non trasformato (♦); linea transgenica B4.5 (○); linea transgenica G4.8 (▲).

La progenie T2 ha mostrato tre fenotipi diversi che sono stati classificati come:

1. 'Resistenti' (R);
2. 'Tolleranti' (T);
3. 'Suscettibili' (S) (Figura 31 A).

A



B

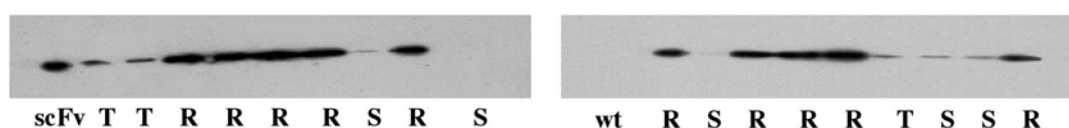


Figura 31. Correlazione tra i diversi fenotipi di pomodoro osservati dopo l'infezione con CMV e i livelli di espressione del scFv.

(A) Differenti fenotipi osservati nelle piante transgeniche della generazione T2 due mesi dopo l'inoculo virale con CMV-F100. Da sinistra a destra sono mostrate, rispettivamente, i fenotipi 'resistenti' (R), 'tolleranti' (T) e 'suscettibili' (S).

(B) Immunoblot di estratti di mini-pomodoro normalizzati per quantità di proteine totali caricate (25 mg TSP) e incubati con l'anticorpo monoclonale anti-Flag M2. ScFv: 100 ng di scFvG4 purificato; R: piante transgeniche con fenotipo resistente; T: piante transgeniche con fenotipo tollerante; S: piante transgeniche con fenotipo suscettibile; wt: piante non trasformate usate come controllo negativo.

Questi differenti fenotipi sono strettamente correlati ai livelli di espressione di scFv nelle piante transgeniche di pomodoro. I livelli più alti di scFv (0,5% TSP) corrispondono al fenotipo R, quelli più bassi al fenotipo S (Figura 31 B), dimostrando un rapporto stechiometrico tra anticorpo ricombinante e resistenza. Gli individui resistenti (R) derivano tutti dalla linea transgenica G4.8 e sono stati definiti come G4.8-R.

Gli stessi esperimenti di sfida con il virus sono stati ripetuti su cinquanta individui della generazione T3 di piante derivate da autoimpollinazione dei minipomodori resistenti G4.8 (G4.8-R); tutte e cinquanta non hanno mostrato alcun sintomo durante il loro ciclo vitale in seguito ad infezione con CMV-F100, con normale sviluppo di fiori, frutti e semi. Le piante di controllo (cinquanta) hanno mostrato, invece, i sintomi contemporaneamente, e cioè a dieci giorni dall'infezione. Individui della T4 e della T5, derivati da autoimpollinazione della G4.8-R, sono stati sfidati con il CMV con le stesse modalità degli esperimenti descritti sopra; la resistenza totale è sempre stata confermata, dimostrando di aver ottenuto una linea omozigote totalmente resistente all'infezione virale da CMV.

Le piante dimostratesi completamente resistenti sono state analizzate mediante test ELISA per verificare l'eventuale presenza di virus nelle foglie sistemiche. Estratti di foglie inoculate o sistemiche derivati da piante infettate sono stati immobilizzati su pozzetti ELISA e la presenza del virus è stata rivelata con il policlonale anti CMV A343. Come si osserva nella **figura 12** la quantità di virus nelle foglie inoculate delle piante di controllo e di quelle transgeniche è comparabile, mentre il virus è completamente assente nelle foglie sistemiche delle piante completamente resistenti.

Inoltre, per escludere totalmente la presenza di virus nelle foglie sistemiche asintomatiche delle piante resistenti è stato eseguito un esperimento di biosaggio. Piante indicatore di *N. benthamiana* sono state infettate con estratti provenienti da foglie sistemiche prive di sintomi di piante G4.8-R infettate con CMV. Tutte le piante analizzate non hanno mostrato alcun sintomo; quando *N. benthamiana* è stata infettata con estratti provenienti dalle piante di controllo infettate con CMV, invece, si sono osservati sintomi severi dopo cinque giorni dall'inoculo. Questo esperimento conferma i dati ottenuti con il test ELISA, indicando l'assenza rivelabile di virus nelle foglie apicali delle piante resistenti e confermando che il legame dell'scFvG4 verso il CMV avviene nelle foglie inoculate bloccando il movimento del virus nella pianta.

Piante transgeniche resistenti (G4.8-R) della generazione T3 e piante di controllo sono state sfidate anche con un virus non correlato, il tobusvirus TBSV. Tutte le piante

hanno sviluppato i sintomi simultaneamente, confermando che la protezione osservata è specifica per il CMV.

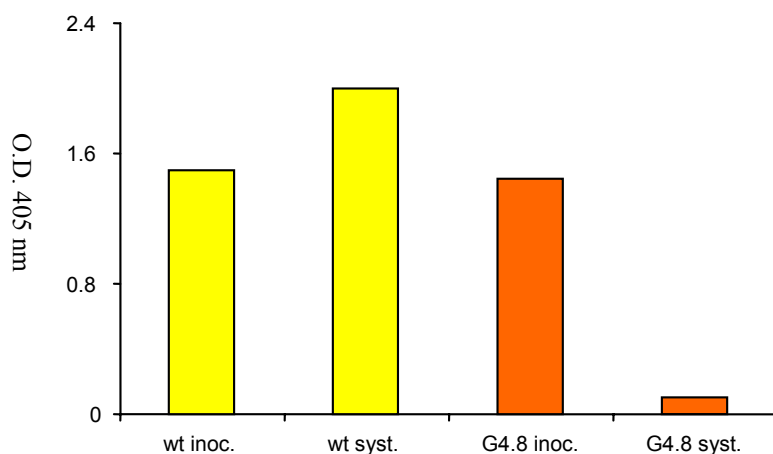


Figura 32. Test ELISA su estratti di foglie inoculate e sistemiche delle piante infettate di controllo (wt) e della generazione transgenica T2 (linea G4.8) resistente. La presenza del virus è stata rivelata con l’anticorpo policlonale A343 contro il CMV.

4.5.3 Co-immunoprecipitazione del complesso scFvG4/CMV dalle foglie inoculate della linea transgenica T3 resistente G4.8-R.

Per determinare se l’anticorpo intracellulare anti-CMV espresso nelle piante transgeniche resistenti G4.8-R era realmente funzionale e attivo nel legare il CMV nel citoplasma *in vivo* sono stati realizzati esperimenti di co-immunoprecipitazione.

Estratti di foglie inoculate di piante di minipomodoro transgeniche (G4.8-R) o di controllo sono state prima analizzate per la presenza di scFvG4 (Figura 33, pannello di sinistra, corsia 1,2) o di CMV (Figura 33, pannello di destra, corsie 1,2) in immunoblot. Questi estratti sono stati poi incubati con proteina-L Sepharose che lega selettivamente il scFv e immunoprecipitati. Dopo separazione per SDS-PAGE ed elettrotrasferimento su membrana PVDF, gli immunoprecipitati sono stati incubati con l’anticorpo monoclonale anti-Flag per rivelare il scFv (Figura 33, pannello di sinistra) o con l’anticorpo policlonale A343 per rivelare il CMV (Figura 33, pannello di destra). Come si osserva nella figura il CMV co-

immunoprecipita selettivamente con il scFvG4 (Figura 33, corsie 3). Questa co-immunoprecipitazione è specifica in quanto non si osserva CMV precipitato dalle foglie infettate di minipomodoro 'wild type' di controllo (Figura 33, corsie 4). Questo risultato conferma che il scFvG4 si lega al virus in maniera selettiva nelle cellule infettate.

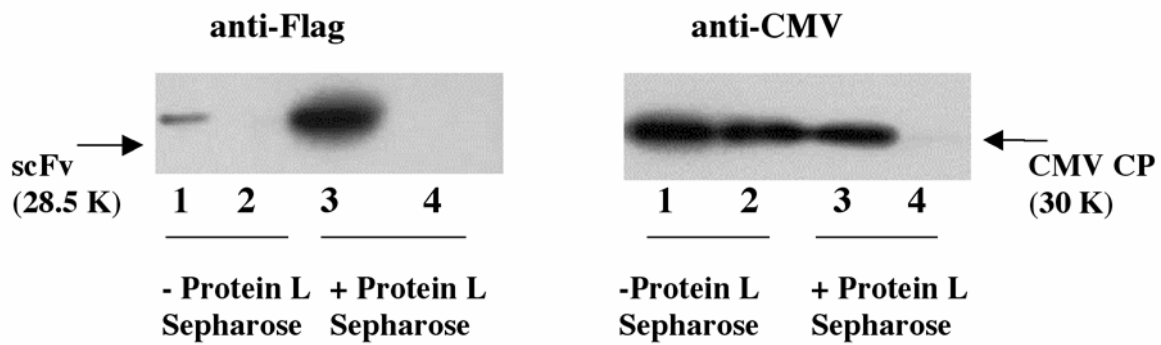


Figura 33. Co-immunoprecipitazione del complesso CMV/scFvG4 dalle foglie inoculate della generazione T3 della linea resistente G4.8-R.

Foglie inoculate (della pianta transgenica o di controllo) sono state prelevate dopo un mese dall'infezione e lavate a lungo con acqua distillata per eliminare eventuale virus presente sulla foglia. Da queste sono stati preparati estratti e incubati con proteina L-Sepharose.

Corsie 1: Estratti di piante transgeniche infettate con CMV; corsie 2: Estratti di piante di controllo infettate con CMV; corsie 3: co-immunoprecipitati dalle piante transgeniche; corsie 4: co-immunoprecipitati dalle piante di controllo. La membrana a sinistra è stata incubata con l'anticorpo monoclonale anti-Flag M2 per rivelare il scFv, mentre la membrana a destra è stata incubata con l'anticorpo policlonale A343 specifico per il CMV-F100.

5. DISCUSSIONE

Il knock-out fenotipico *in vivo*, mediato dagli anticorpi intracellulari, è un'alternativa agli approcci RNA antisenso o 'RNA interference' e trova molte applicazioni in terapia umana (Lobato & Rabbits, 2004), nella modulazione del metabolismo delle piante, nella resistenza ai patogeni (De Jager *et al.*, 2000; Conrad & Manteuffel, 2001; Jobling *et al.*, 2002; Boonrod *et al.*, 2004), in studi di genomica funzionale e proteomica (Visintin *et al.*, 2004).

La stabilità termodinamica è considerata il parametro più importante per l'attività intracellulare degli anticorpi ricombinanti (Worn *et al.*, 2000). E' stato dimostrato che gli anticorpi derivati dalla 'library F8', costruita su una struttura portante di un anticorpo intracellulare, hanno proprietà *in vitro* di alta stabilità termodinamica, solubilità, affinità e ripiegamento corretto e funzionale in condizioni non permissive (Desiderio *et al.*, 2001). Per confermare che queste proprietà corrispondano ad una attività biologica *in vivo* nell'ambiente riducente del citoplasma, abbiamo deciso di interferire con l'infezione del CMV in pianta.

La selezione è stata effettuata mediante selezioni ('biopanning') *in vitro* su virioni di CMV integri. Le particelle di CMV sono costituite quasi esclusivamente da un'unica proteina di rivestimento (CP) che, come le CP di molti virus vegetali è una proteina multifunzionale (Callaway *et al.*, 2001). Oltre ad avere un ruolo nella formazione di capsidi, la CP del CMV è coinvolta nel movimento del virus nella pianta sia cellula-cellula che sistemico, nella trasmissione attraverso afidi, nell'espressione dei sintomi e nella determinazione dell'ospite (Kaplan *et al.*, 1998; Schmitz & Rao, 1998; Liu *et al.*, 2002). In accordo con relazioni sia da un punto di vista serologico che molecolare, la maggior parte dei CMV isolati sono stati divisi in due principali sottogruppi (serogruppo I e serogruppo II) che condividono numerosi epitopi conservati nella proteina di rivestimento (Roossnick, 2002; Palukaitis & Garcia-Arenal, 2003). Dopo ripetuti cicli di selezione, sono stati isolati numerosi anticorpi ricombinanti specifici per il CMV. Due di questi (scFvB4 e scFvG4) sono stati isolati dalle selezioni contro ambedue i serogruppi di CMV (serogruppo I e serogruppo II). Quindi questi due scFv sono stati caratterizzati ulteriormente per investigare le loro potenzialità come anticorpi intracellulari in grado di interferire con la maggior parte dei ceppi di CMV.

Inizialmente sono stati condotti una serie di esperimenti per valutare il comportamento *in vivo* di questi anticorpi ricombinanti. Questi scFv hanno mostrato alti livelli di espressione in *E. Coli* e in *S. cerevisiae*, un'alta affinità e un'elevata specificità in quanto sono in grado di riconoscere il CMV da estratti di piante sia in ELISA che in soluzione. La mappatura dell'epitopo ha dimostrato che i due scFvs riconoscono un epitopo simile, che molto

probabilmente è tridimensionale anziché lineare dal momento che ambedue gli anticorpi ricombinanti si legano al virus in soluzione ma non lo riconoscono in immunoblotting. Naturalmente sono necessari ulteriori studi per identificare questo epitopo anche se l'ipotesi che sia conformazionale è confermata dall'incapacità di entrambi gli anticorpi ricombinanti di interagire con la proteina di rivestimento del CMV nel sistema doppio ibrido in lievito. E' infatti noto che in assenza del genoma ad RNA virale, la proteina di rivestimento del CMV non si ripiega e assembla *in vitro*. Nella cellula di lievito, infatti, l'incapacità della proteina di fusione con la CP (pLexA-CMV) di ripiegarsi/assemblarsi correttamente molto probabilmente previene la formazione dell'epitopo conformazionale riconosciuto da entrambi gli scFv. In aggiunta, questo risultato mette in luce come la tecnologia IAC ('intracellular antibody capture'), spesso descritta come un ottimo metodo per l'identificazione *in vivo* di nuove coppie antigene-anticorpo nel compartimento intracellulare, non sia sempre applicabile.

L'espressione transiente in pianta mediata da PVX, ha dimostrato che ambedue gli anticorpi ricombinanti sono espressi ad alti livelli nel citoplasma di *N. benthamiana*, contrariamente alla maggioranza degli anticorpi che sono degradati rapidamente quando espressi in questo compartimento cellulare (Franconi *et al.*, 1999), confermando, quindi, la diretta correlazione tra la stabilità ed i livelli di espressione degli scFv.

Successivamente, per verificare che gli anticorpi intracellulari anti-CMV fossero realmente attivi nell'interferire con l'infezione virale *in vivo*, abbiamo generato piante transgeniche di minipomodoro che esprimevano i frammenti anticorpali nel citoplasma. Esperimenti di biosaggio (sfida con il virus) sulle generazioni transgeniche T1, T2, T3, T4 e T5 hanno dimostrato che ambedue gli anticorpi si comportano da anticorpi intracellulari ('intrabodies') poiché si accumulano come proteina solubile nel citoplasma della pianta. Questi scFv hanno anche la capacità di modificare il fenotipo del minipomodoro quando sfidato con il virus. Questi esperimenti hanno permesso di isolare una linea transgenica (G4.8-R) totalmente protetta dall'infezione virale. Inoltre la correlazione, osservata nella generazione T2, tra la quantità di frammento anticorpale scFv e il fenotipo della pianta sottoposta alla sfida con il virus (fenotipi chiamati S, T ed R), suggerisce che il livello della resistenza è maggiormente dipendente dai livelli di espressione del transgene piuttosto che dall'affinità dell'anticorpo per l'antigene. Infatti, entrambi gli anticorpi hanno mostrato una K_D dello stesso ordine di grandezza, come dimostrato dagli esperimenti di Biacore. Il livello di espressione di scFv nelle piante R, inoltre, è maggiore di quello descritto per anticorpi anti-CP o anti-RNA-dipendente-RNA polimerasi, capaci di conferire resistenza parziale o solamente ridotta suscettibilità della pianta all'infezione virale (Tavladoraki *et al.*, 1993;

Zimmermann *et al.*, 1998; Boonrod *et al.*, 2004). Negli esperimenti effettuati con gli anti-CMV da noi selezionati, la quantità di scFv espressa nelle piante transgeniche è sufficiente a neutralizzare completamente il virus, nonostante l'inoculo meccanico effettuato probabilmente sia notevolmente superiore alla quantità di virus che naturalmente in campo infetta le piante di pomodoro. Inoltre, il controllo sull'infezione virale mediato dagli anticorpi è altamente specifico, in quanto quando la sfida è stata effettuata con un virus non correlato, nelle piante transgeniche si sono osservati i sintomi tipici dell'infezione. Da notare, inoltre, che anche le piante definite come suscettibili (fenotipo S), che esprimono la quantità minore di anticorpo ricombinante, hanno mostrato un ritardo nell'espressione dei sintomi.

La proteina di rivestimento del CMV (CMV-CP), ma non il virione completo, sembra essere coinvolta nel movimento cellula-cellula (Kaplan *et al.*, 1998), mentre sembra che il virione completo si muova a lunga distanza attraverso il floema (Palukaitis e Garcia-Arenal, 2003). Probabilmente la resistenza al CMV da noi osservata, conferita dagli anticorpi intracellulari, non coinvolge la replicazione virale o il movimento cellula-cellula. Questa ipotesi è sostenuta dall'osservazione che nelle foglie inoculate, sia delle piante transgeniche resistenti che delle piante di controllo (wt), si accumulano quantità comparabili di CMV. Inoltre, la co-immunoprecipitazione del complesso scFv-CMV dalle foglie inoculate delle piante transgeniche resistenti suggerisce che avvenga un'interazione antigene-anticorpo *in vivo*. Quest'ultimo risultato lascia ipotizzare anche che, molto probabilmente, il scFv espresso nelle piante transgeniche eserciti la sua modulazione sull'infezione virale *in vivo* bloccando l'infezione nelle foglie inoculate e disattivando altre funzioni fondamentali della proteina di rivestimento del CMV, prevenendo il movimento a lunga distanza. Questa ipotesi è stata successivamente confermata dal test di recupero del virus, che ci ha permesso di dimostrare la completa assenza del CMV nelle foglie sistemiche. Naturalmente sono necessari ulteriori studi per capire il meccanismo coinvolto nella protezione mediata dagli anticorpi intracellulari e per spiegare come il scFv perturbi il processo coinvolto nel movimento virale, se bloccando possibili interazioni tra la CP e l'RNA genomico virale oppure con altri fattori cellulari della pianta o del virus. Inoltre sarebbe interessante anche identificare il meccanismo che permette alle piante con il fenotipo definito tollerante (T) di recuperare un fenotipo sano in seguito alla comparsa dei sintomi.

Le piante transgeniche di minipomodoro resistenti al CMV sono state da noi ottenute attraverso un approccio nuovo. Infatti, piante di pomodoro transgenico, che esprimevano sequenze derivate dal CMV per sviluppare la resistenza al virus, sono già state descritte (Ref.). Questo tipo di piante geneticamente modificate, però, non sono state introdotte

nell'ambiente a causa di restrizioni dovute a problemi legati alla biosicurezza. Il nostro approccio, basato su interazioni proteina-proteina, dovrebbe garantire una resistenza duratura contro la maggior parte degli isolati di CMV, superando i problemi di biosicurezza legati alla diffusione di nuovi genotipi di CMV a causa dell'utilizzo di sequenze virali.

In conclusione, abbiamo dimostrato che dal nostro repertorio di anticorpi ricombinanti a singola struttura ('library F8'), dopo classica selezione *in vitro* (biopanning), abbiamo isolato anticorpi intracellulari attivi contro un virus vegetale che sono stati in grado di conferire un nuovo profilo agronomico a piante transgeniche di minipomodoro. La 'library F8', che contiene anticorpi ricombinanti stabili in grado di modulare specifiche funzioni *in vivo*, assicura automaticamente che gli anticorpi isolati leghino il proprio antigene nell'ambiente riducente del citoplasma, senza la necessità di ricorrere a successive procedure di ingegneria proteica e/o complicate strategie di selezione. Gli anticorpi ricombinanti derivati dalla 'library F8' possono anche trovare applicazioni in genomica funzionale e, a lungo termine, potrebbero essere utilizzati anche in terapia umana.

6. BIBLIOGRAFIA

- Agrios GN (1997) *Plant Pathology* (4th edition), Academic Press, NY.
- Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E, et al. (1993) "Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a". *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90(15):7327-3.
- Alkan SS (2004) "Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine" *Nature Reviews Immunology* 4:153-156.
- Artsaenko O, Peisker M, zur Nieden U, Fiedler U, Weiler EW, Muntz K, Conrad U. (1995) "Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilt phenotype in transgenic tobacco". *Plant J*; 8(5):745-50.
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP. (1997) "Signaling in plant-microbe interactions". *Science*; 276(5313):726-33.
- Barbas CF 3rd, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. (1991) "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site". *Proc Natl Acad Sci USA*; 88(18):7978-82.
- Barbas CF 3rd, Crowe JE Jr, Cababa D, Jones TM, Zebedee SL, Murphy BR, Chanock RM, Burton DR. (1992) "Human monoclonal Fab fragments derived from a combinatorial library bind to respiratory syncytial virus F glycoprotein and neutralize infectivity". *Proc Natl Acad Sci USA*; 89(21):10164-8.
- Baron C, Zambryski PC. (1995) "The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme?" *Annu Rev Genet*. 29:107-29.
- Baulcombe DC, Saunders GR, Bevan MW, Mayo MA, Harrison BD. (1986) "Expression of biologically active satellite RNA from nuclear genome of transformed plants" *Nature*; 321: 446-449.
- Beachy RN. (1997) "Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants". *Curr Opin Biotechnol*; 8(2):215-20.
- Beachy RN (1999) "Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 354(1383):659-64.
- Biocca S, Pierandrei-Amaldi P, Cattaneo A. (1993) "Intracellular expression of anti-p21ras single chain Fv fragments inhibits meiotic maturation of xenopus oocytes". *Biochem Biophys Res Commun*; 197(2):422-7.
- Biocca S, Cattaneo A (1995) "Intracellular immunization: antibody targeting to subcellular compartment" *Trends Cell Biol*. 5:248-252.
- Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Withlow M (1998) "Single-chain antigen-binding protein". *Science* 242:423-426.
- Blackman LM, Boevink P, Cruz SS, Palukaitis P, Oparka KJ. (1998) "The movement protein of cucumber mosaic virus traffics into sieve elements in minor veins of *Nicotiana glauca*" *Plant Cell*; 10(4):525-38.
- Boccard F, Baulcombe D. (1993) "Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus". *Virology*; 193(2):563-78.
- Borja M, Rubio T, Scholthof HB, Jackson AO. (1999) "Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene". *Mol Plant Microbe Interact*; 12(2):153-62.
- Brederode FT, Linthorst HJ, Bol JF (1991) "Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding". *Plant Mol Biol*; 17(6):1117-25.
- Breitling F, Dubel S, Seehaus T, Klewinghaus I, Little M. (1991) "A surface expression vector for antibody screening". *Gene*; 104(2):147-53.

- Boder ET, Wittrup KD. (1997) "Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries". *Nat Biotechnol.*;15(6):553-7.
- Boevink P, Oparka KJ. (2005) "Virus-host interactions during movement processes". *Plant Physiol.*;138(4):1815-21.
- Boonrod K, Galetzka D, Nagy PD, Conrad U, Krczal G. (2004) "Single-chain antibodies against a plant viral RNA-dependent RNA polymerase confer virus resistance". *Nat Biotechnol.*;22(7):856-62.
- Bourque JE. (1995) "Antisense strategies for genetic manipulation in plants". *Plant Sci.* 105: 125-149.
- Canto T, Prior DA, Hellwald KH, Oparka KJ, Palukaitis P. (1997) "Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus". *Virology.*; 237(2):237-48.
- Caranta C, Pflieger S, Lefebvre V, Daubeze AM, Thabuis A, Palloix A. (2002) "QTLs involved in the restriction of cucumber mosaic virus (CMV) long-distance movement in pepper". *Theor Appl Genet*;104(4):586-591.
- Cattaneo A, biocca S (1999) "The selection of intracellular antibodies" *Trends Biotechnol.* 17:115-121.
- Carrington JC, Kasschau KD, Mahajan SK, Schaad MC. (1996) "Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants". *Plant Cell.*;8(10):1669-168.
- Celebi F, russo P, Watanabe K, Valkonen JPT, Slack SA (1998) "Resistance of potato to cucumber mosaic virus appears related to localization in inoculated leaves". *Amer. J. Potato Res.* 75:195-199.
- Chae JS, Choi JK, Lim HT, Cha SH. (2001) "Generation of a murine single chain Fv (scFv) antibody specific for cucumber mosaic virus (CMV) using a phage display library". *Mol Cells*;11(1):7-12.
- Chaim BA, Grube RC, Lapidot M, Jahn M, Paran I (2001) "Identification of quantitative trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *Capsicum annum*". *Theor. Appl. Genet.* 102:1213-1220.
- Chen SY, Khouri Y, Bagley J, Marasco WA. (1994) "Combined intra- and extracellular immunization against human immunodeficiency virus type 1 infection with a human anti-gp120 antibody". *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(13):5932-6
- Cillo F, Roberts IM, Palukaitis P. (2002) "In situ localization and tissue distribution of the replication-associated proteins of Cucumber mosaic virus in tobacco and cucumber". *J Virol.*;76(21):10654-64.
- Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. (1991) "Making antibody fragments using phage display libraries". *Nature.*;352(6336):624-8.
- Cohen PA, Mani JC, Lane DP. (1998) "Characterization of a new intrabody directed against the N-terminal region of human p53". *Oncogene.*;17(19):2445-56.
- Conrad U, Manteuffel R. (2001) "Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plant cells". *Trends Plant Sci.*;6(9):399-402.
- Creager ANH (2002) "The life of a virus". University of Chicago Press, Chicago.
- Creighton TE. (1986) "Disulfide bonds as probes of protein folding pathways". *Methods Enzymol.*;131:83-106.
- Crute IR, Pink D. (1996) "Genetics and Utilization of Pathogen Resistance in Plants". *Plant Cell.* 8(10):1747-1755.
- Dangl JL, Jones JD. (2001) "Plant pathogens and integrated defence responses to infection". *Nature*;411(6839):826-33.
- Delaney TP. (1997) "Genetic dissection of acquired resistance to disease". *Plant Physiol*;113(1):5-12.

- De Jaeger G, De Wilde C, Eeckhout D, Fiers E, Depicker A. (2000) "The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance". *Plant Mol Biol.*;43(4):419-28.
- de Kruif J, Boel E, Logtenberg T. (1995) "Selection and application of human single chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions". *J Mol Biol.*;248(1):97-105.
- Dente L, Vetriani C, Zucconi A, Pelicci G, Lanfrancione L, Pelicci PG, Cesareni G. (1997) "Modified phage peptide libraries as a tool to study specificity of phosphorylation and recognition of tyrosine containing peptides". *J Mol Biol.*;269(5):694-703.
- der Maur AA, Zahnd C, Fischer F, Spinelli S, Honegger A, Cambillau C, Escher D, Pluckthun A, Barberis A. (2002) "Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework". *J Biol Chem.*;277(47):45075-85.
- Desiderio A, Franconi R, Lopez M, Villani ME, Viti F, Chiaraluce R, Consalvi V, Neri D, Benvenuto E. (2001) "A semi-synthetic repertoire of intrinsically stable antibody fragments derived from a single-framework scaffold". *J Mol Biol.*;310(3):603-15.
- Ding SW, Anderson BJ, Haase HR, Symons RH. (1994). "New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome". *Virology.*;198(2):593-601.
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ. (1994) "Early events in the activation of plant defense responses". *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32:479-501.
- Donini M, Morea V, Desiderio A, Pashkoulov D, Villani ME, Tramontano A, Benvenuto E. (2003) "Engineering stable cytoplasmic intrabodies with designed specificity". *J Mol Biol.* 2003 Jul 4;330(2):323-32.
- Dufour O, Palloix A, gebrè Selassie K, Pochard E, Marchoux G (1989)"The distribution of cucumber mosaic virus in resistant and susceptible plants of peppper" *Can. J. Bot.* 67:655-660.
- Dunn PM, hedden P, Bailey JA. (1990) "A physiologically-induced resistance of *Phaseolus vulgaris* to a compatible race of *Colletotrichum lindemuthianum* is associated with increases in ABA content". *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 36:339-346.
- Ecker JR, Davis RW. (1987) "Plant defense genes are regulated by ethylene". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5202-5206.
- Farmer EE, Ryan CA. (1990) "Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves". *Proc Natl Acad Sci USA*;87(19):7713-6.
- Felici F, Castagnoli L, Musacchio A, Jappelli R, Cesareni G. (1991) "Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector". *J Mol Biol.*;222(2):301-10.
- Fisher DB, Wu Y, Ku MSB (1992). "Turnover of soluble proteins in wheat sieve tube". *Plant Phisiol.* 100: 1433-1441.
- Flor HH (1971) "Current status of the gene-for-gene concept". *Annu. Rev. Phytopathol.*, 9:275-296.
- Forsberg G, Forsgren M, Jaki M, Norin M, Sterky C, Enhorning A, Larsson K, Ericsson M, Bjork P. (1997) "Identification of framework residues in a secreted recombinant antibody fragment that control production level and localization in *Escherichia coli*". *J Biol Chem.*;272(19):12430-6.
- Franconi R, Roggero P, Pirazzi P, Arias FJ, Desiderio A, Bitti O, Pashkoulov D, Mattei B, Bracci L, Masenga V, Milne RG, Benvenuto E. (1999) "Functional expression in bacteria and plants of an scFv antibody fragment against tospoviruses". *Immunotechnology.*;4(3-4):189-201.

- Fulton RW. (1986) "Practices and precautions in the use of cross-protection for plant virus disease control". *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:67-81.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J. (1993). "Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance". *Science*, 261; 754-756.
- Gal-On A, Kaplan I, Roossinck MJ, Palukaitis P. (1994) "The kinetics of infection of zucchini squash by cucumber mosaic virus indicate a function for RNA 1 in virus movement". *Virology*.;205(1):280-9.
- Garrard LJ, Yang M, O'Connell MP, Kelley RF, Henner DJ. (1991) "Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system". *Biotechnology (NY)*.;9(12):1373-7.
- Garrard LJ, Henner DJ. (1993) "Selection of an anti-IGF-1 Fab from a Fab phage library created by mutagenesis of multiple CDR loops". *Gene*. 1993 Jun 15;128(1):103-9.
- Gennari F, Mehta S, Wang Y, St Clair Tallarico A, Palu G, Marasco WA. 82004) "Direct phage to intrabody screening (DPIS): demonstration by isolation of cytosolic intrabodies against the TES1 site of Epstein Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) that block NF-kappaB transactivation". *J Mol Biol.*;335(1):193-207.
- Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I, Pluckthun A. (1990) "A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments". *Biochemistry*.;29(6):1362-7.
- Glockshuber R, Schmidt T, Pluckthun A.(1992) "The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding in vitro, and functional expression in *Escherichia coli*". *Biochemistry*.;31(5):1270-9.
- Goldbach R, Bucher E, Prins M. (2003) "Resistance mechanisms to plant viruses: an overview". *Virus Res*;92(2):207-12.
- Goncalves J, Silva F, Freitas-Vieira A, Santa-Marta M, Malho R, Yang X, Gabuzda D, Barbas C 3rd (2002) "Functional neutralization of HIV-1 Vif protein by intracellular immunization inhibits reverse transcription and viral replication". *J Biol Chem.*;277(35):32036-45. Epub 2002 May 30
- Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. (1989) "Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes". *Nucleic Acids Res.*;17(12):4713-30.
- Grube RC, Radwanski ER, Jahn M. (2000) "Comparative genetics of disease resistance within the solanaceae". *Genetics*.;155(2):873-87.
- Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann RE, Jones PT, Low NM, Allison TJ, et al. (1994) "Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires". *EMBO J.*;13(14):3245-60.
- Gundlach H, Muller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. (1992) "Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures". *Proc Natl Acad Sci USA*; 89(6):2389-93.
- Guo HS, Ding SW. (2002) "A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal". *EMBO J.*;21(3): 398-407.
- Habili N, Francki RIB (1974). "Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. I Physical and chemical properties". *Virology*; 57:302-401.
- Habili N, Symons RH (1989). "Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases". *Nucleic Acid Res.*; 17:9543-9555.
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ (2001) "Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA". *Nat Rev Genet*;2(2):110-9.
- Hanes J, Pluckthun A. (1997) "In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display". *Proc Natl Acad Sci USA*.;94(10):4937-42.

- Harrison BD, Mayo MA, Baulcombe DC (1987). "Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA". *Nature* 328: 799- 805.
- Hayes RJ, Buck KW. (1990) "Infectious cucumber mosaic virus RNA transcribed in vitro from clones obtained from cDNA amplified using the polymerase chain reaction". *J Gen Virol.*;71 (Pt 11):2503-8.
- Hawkins RE, Russell SJ, Winter G. (1992) "Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation". *J Mol Biol.* 226(3):889-96.
- Hodgman TC. (1988) "A new superfamily of replicative proteins". *Nature*; 333(6168):22-3.
- Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G. (1991) "Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains". *Nucleic Acids Res.*;19(15):4133-7.
- Hoogenboom HR, Winter G. (1992) "By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro". *J Mol Biol.* 227(2):381-8.
- Hoogenboom HR. (1997) "Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies". *Trends Biotechnol.*;15(2):62-70
- Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC. (1998) "Antibody phage display technology and its applications". *Immunotechnology*;4(1):1-20
- Hoogenboom HR. (2005) "Selecting and screening recombinant antibody libraries". *Nat Biotechnol.*;23(9):1105-16.
- Hufton SE, Moerkerk PT, Meulemans EV, de Bruine A, Arends JW, Hoogenboom HR. (1999) "Phage display of cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands". *J Immunol Methods*;231(1-2):39-51.
- Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R, et al.(1988) "Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*". *Proc Natl Acad Sci USA*;85(16):5879-83.
- Ishikawa M, Okada Y. (2004) "Replication of tobamovirus RNA" *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 80:215-222.
- Jobling SA, Jarman C, Teh MM, Holmberg N, Blake C, Verhoeyen ME. (2003) "Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments". *Nat Biotechnol.*;21(1):77-80.
- Jones JDG (1996) "Plant disease resistance genes: structure, function and evolution". *Curr. Opin. Biotech.*, 7:155-160.
- Jung S, Honegger A, Pluckthun A. (1999) "Selection for improved protein stability by phage display". *J Mol Biol.*;294(1):163-80.
- Kabat EA, Wu TT. (1991) "Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites". *J Immunol.*;147(5):1709-19.
- Kaper JM (1969). "Reversible dissociation of cucumber mosaic virus (strain S)". *Virology*; 37:134-139.
- Kaplan IB, Zhang L, Palukaitis P. (1998) "Characterization of cucumber mosaic virus. V. Cell-to-cell movement requires capsid protein but not virions". *Virology*;246(2):221-3.
- Kempers R, prior DAM, Van Bel AJE, Oparka KJ (1993) "Plasmodesmata between sieve element and companion cell of extrafascicular stem phloem of *Cucurbita maxima* permit passage of 3 KDa fluorescent probes" *Plant J.* 4; 567-575.

- Kennerdell JR, Carthew RW. (1998) "Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway". *Cell*;95(7):1017-26.
- Knappik A, Pluckthun A. (1995) "Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding". *Protein Eng*;8(1):81-9.
- Kobori T, Ohki ST, Osaki T (2000) "Movement of cucumber mosaic virus is restricted at the interface between mesophyll and phloem pathway in *Cucumis figarei*" *J. Gen. Plant Pathol*. 56:159-166.
- Kohler G, Milstein C. (1975) "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity". *Nature*;256(5517):495-7.
- Lazarowitz SG, Beachy RN. (1999) "Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants". *Plant Cell*;11(4):535-48.
- Li Q, Palukaitis P. (1996) "Comparison of the nucleic acid- and NTP-binding properties of the movement protein of cucumber mosaic cucumovirus and tobacco mosaic tobamovirus". *Virology*; 216(1):71-9.
- Lindbo JA, Dougherty WG. (1992) "Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts". *Virology*;189(2):725-33.
- Lobato MN, Rabbitts TH (2004) "Intracellular antibodies as specific reagents for functional ablation: future therapeutic molecules" *Curr. Mol. Med*. 4:519-528.
- Loebenstein G, Cohen J, Shabtai S, Coutts RH, Wood KR. (1997) "Distribution of cucumber mosaic virus in systemically infected tobacco leaves". *Virology*;81(1):117-25.
- Longstaff M, Brigneti G, Boccard F, Chapman S, Baulcombe D. (1993) "Extreme resistance to potato virus X infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase". *EMBO J*;12(2):379-86.
- Lot H, Kaper JM. (1976) "Further studies on the RNA component distribution among the nucleoproteins of cucumber mosaic virus", *Virology*; 74:223-226.
- Lucy AP, Guo HS, Li WX, Ding SW. (2000) "Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus". *EMBO J*;19(7):1672-80.
- Marks JD, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G.(1992) "Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system". *J Biol Chem*;267(23):16007-10.
- Marks JD, Ouwehand WH, Bye JM, Finnern R, Gorick BD, Voak D, Thorpe SJ, Hughes-Jones NC, Winter G. (1993) "Human antibody fragments specific for human blood group antigens from a phage display library" *Biotechnology (N Y)*. 11(10):1145-9.
- Martineau P, Jones P, Winter G. (1998) "Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm". *J Mol Biol*. 1998 Jul 3;280(1):117-27.
- Martineau P, Betton JM.(1999) "In vitro folding and thermodynamic stability of an antibody fragment selected in vivo for high expression levels in *Escherichia coli* cytoplasm". *J Mol Biol*;292(4):921-9
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. (1990) "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains". *Nature*. 348(6301):552-4.
- Mhashilkar AM, Bagley J, Chen SY, Szilvay AM, Helland DG, Marasco WA. (1995) "Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies". *EMBO J*;14(7):1542-51.
- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y. Levy A (1997) "A new model for tomato genetic" *Plant J* 12:1465-1472.

- Merril CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH. (1981) "Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins". *Science*;211(4489):1437-8.
- Moon YH, Song SK, Choi KW, Lee JS. (1997) "Expression of a cDNA encoding *Phytolacca insularis* antiviral protein confers virus resistance on transgenic potato plants" *Mol Cells*;7(6):807-15.
- Muyldermans S. (2001) "Single domain camel antibodies: current status". *J Biotechnol*;74(4):277-302.
- Murphy AM, Carr JP. (2002) "Salicylic acid has cell-specific effects on tobacco mosaic virus replication and cell-to-cell movement". *Plant Physiol*;128(2):552-63.
- Nakajima H, muranaka T, Ishige F, Akatsu K, Oeda K. (1997) "Fungal and bacterial disease resistance in transgenic plants expressing human lysozyme" *Plant Cell Rep*. 16, 674-679.
- Nakayama M, Neri D, Ohara O. (2001) "A new simplified method for preparation of a synthetic phage antibody with practically acceptable detection sensitivity on immunoblots". *Hum Antibodies*;10(2):55-65.
- Nieba L, Honegger A, Krebber C, Pluckthun A. (1997) "Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment". *Protein Eng*;10(4):435-44.
- Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, Flynn G, Midgley C, Lane D, Winter G. (1994) "Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents" *EMBO J*;13(3):692-8.
- Nurkiyanova KM, Ryabov EV, Kalinina NO, Fan Y, Andreev I, Fitzgerald AG, Palukaitis P, Taliansky M. (2001) "Umbravirus-encoded movement protein induces tubule formation on the surface of protoplasts and binds RNA incompletely and non-cooperatively". *J Gen Virol*. 82(Pt 10):2579-88
- Ogawa T, Hori T, Ishida I. (1996) "Virus-induced cell death in plants expressing the mammalian 2',5' oligoadenylate system". *Nat Biotechnol*; 14(11):1566-9.
- O'Reilly EK, Wang Z, French R, Kao CC. (1998) "Interactions between the structural domains of the RNA replication proteins of plant-infecting RNA viruses". *J Virol*;72(9):7160-9.
- Palukaitis P, Roossinck MJ, Dietzgen RG, Francki RI. (1992) "Cucumber mosaic virus". *Adv Virus Res*. 1;41:281-348.
- Palukaitis P, Garcia-Arenal F. (2003). "Cucumoviruses". *Adv Virus Res*; 62:241-323.
- Panavas T, Serviène E, Brasher J, Nagy PD. (2005) "Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses". *Proc Natl Acad Sci USA*;102(20):7326-3.
- Plasterk RH. (2002) "RNA silencing: the genome's immune system". *Science*;296(5571):1263-5.
- Pluckthun A. (1991) "Antibody engineering: advances from the use of *Escherichia coli* expression systems". *Biotechnology (N Y)*. 9(6):545-51.
- Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. (1989) *EMBO J*; 8(12):3867-74.
- Proba K, Worn A, Honegger A, Pluckthun A. (1998) "Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution". *J Mol Biol*. ;275(2):245-53.
- Powell-Abel P, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT et al., (1986) "Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene". *Science*, 232: 738-743.

- Rao ALN, Francki RIB (1981) "Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. VI. Partial compatibility of genome segments from the two viruses". *Virology*; 114: 573-575.
- Rondon IJ, marasco WA (1997) "Intracellular antibodies (intrabodies) for gene therapies of infectious diseases" *Annu. Rev. Microbiol.* 51:257-283.
- Roossinck MJ (2003) "Plant RNA virus evolution" *Curr Opin Microbiol.*;6(4):406-9.
- Rozanov MN, Koonin EV, Gorbalenya AE. (1992) "Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses". *J Gen Virol.*;73 (Pt 8):2129-34
- Rubio T, Borja M, Scholthof HB, Feldstein PA, Morris TJ, Jackson AO. (1999) "Broad-spectrum protection against tombusviruses elicited by defective interfering RNAs in transgenic plants". *J Virol.*;73(6):5070-8.
- Schillberg S, Zimmermann S, Zhang MY, Fischer R. (2001) "Antibody-based resistance to plant pathogens". *Transgenic Res*;10(1):1-12.
- Shimada N, Suzuki Y, Nakajima M, Conrad U, Murofushi N, Yamaguchi I. (1999) "Expression of a functional single-chain antibody against GA24/19 in transgenic tobacco". *Biosci Biotechnol Biochem*;63(4):779-83
- Schmitz I, Rao AL (1998) "Deletions in the conserved amino-terminal basic arm of cucumber mosaic virus coat protein disrupt virion assembly but do not abolish infectivity and cell-to-cell movement". *Virology.*;248(2):323-31.
- Schwinghamer MW, Symons RH. (1975). "Fractionation of cucumber mosaic virus RNA and its translation in a wheat embryo cell-free system in toad oocytes". *Virology*; 79:88-108.
- Shi BJ, Palukaitis P, Symons RH. (2002) "Differential virulence by strains of Cucumber mosaic virus is mediated by the 2b gene". *Mol Plant Microbe Interact.*;15(9):947-55.
- Skerra A, Pluckthun A.(1988) "Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*". *Science.*;240(4855):1038-41
- Smith TJ, Chase E, Schmidt T, Perry KL. (2000) "The structure of cucumber mosaic virus and comparison to cowpea chlorotic mottle virus". *J Virol.*;74(16):7578-86.
- Soderlind E, Vergeles M, Borrebaeck CA. (1995) "Domain libraries: synthetic diversity for de novo design of antibody V-regions". *Gene.*;160(2):269-72
- Sticher L, Mauch-Mani B, Metraux JP (1997) "Systemic acquired resistance". *Annu Rev Phytopathol*; 35:235-70.
- Soosaar JL, Burch-Smith TM, Dinesh-Kumar SP. (2005) "Mechanisms of plant resistance to viruses". *Nat Rev Microbiol.*; 3(10):789-98.
- Sternberg N, Hoess RH. (1995) "Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda". *Proc Natl Acad Sci USA.*;92(5):1609-13.
- Tavladoraki P, Benvenuto E, Trinca S, De Martinis D, Cattaneo A, Galeffi P. (1993) "Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack". *Nature.*;366(6454):469-72.
- Tavladoraki P, Girotti A, Donini M, Arias FJ, Mancini C, Morea V, Chiaraluce R, Consalvi V, Benvenuto E. (1999) "A single-chain antibody fragment is functionally expressed in the cytoplasm of both *Escherichia coli* and transgenic plants". *Eur J Biochem.*;262(2):617-24.
- Takahashi H, Sugiyama M, Sukamoto H, karasawa A, Hase S, Ehara Y. (2000) "A variant of cucumber mosaic virus is restricted to local lesion in inoculated tobacco leaves with a hypersensitive response" *J. Gen. Plant Pathol.* 66:335-344.
- Thivierge K, Nicaise V, Dufresne PJ, Cotton S, Laliberte JF, Le Gall O, Fortin MG. (2005) "Plant virus RNAs. Coordinated recruitment of conserved host functions by (+) ssRNA viruses during early infection events". *Plant Physiol.*;138(4):1822-7.

- Tomlinson IM, Walter G, Jones PT, Dear PH, Sonnhammer EL, Winter G. (1996) "The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes". *J Mol Biol.*; 256(5):813-17.
- Tse E, Lobato MN, Forster A, Tanaka T, Chung GT, Rabbitts TH (2002) "Intracellular antibody capture technology : application to selection of intracellular antibodies recognising the BCR-ABL oncogenic protein" *J. Mol. Biol.* 317:85-94.
- Tumer NE, Hwang DJ, Bonness M. (1997) "C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes". *Proc Natl Acad Sci USA.*;94(8):3866-71.
- Vaccaro P, Dente L, Onofri F, Zucconi A, Martinelli S, Valtorta F, Greengard P, Cesareni G, Benfenati F. (1997) "Anti-synapsin monoclonal antibodies: epitope mapping and inhibitory effects on phosphorylation and Grb2 binding". *Brain Res Mol Brain Res.*;52(1):1-16.
- Vaquero C, Liao YC, Nahring J, Fischer R. (1997) "Mapping of the RNA-binding domain of the cucumber mosaic virus movement protein". *J Gen Virol.*:2095-9.
- Vain P, Worland B, Clarke MC, Richard G, Beavis M, Liu H, Kohli A, leech M, snape J, Christou P, Atkinson H. (1998) "Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (Oryzacystatin-I Delta D86) for nematode resistance in transgenic rice plants". *Theor. Appl. Genet.* 96: 266-271.
- Vigers AJ, Roberts WK, Selitrennikoff CP. (1991) "A new family of plant antifungal proteins". *Mol Plant Microbe Interact.*; (4):315-23.
- Visintin M, Tse E, Axelson H, Rabbitts TH, Cattaneo A., (1999) "Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system". *Proc Natl Acad Sci USA.*;96(21):11723-8.
- Visintin M, Meli GA, Cannistraci I, Cattaneo A. (2004) "Intracellular antibodies for proteomics". *J Immunol Methods.*;290(1-2):135-53.
- Vogelstein B, Gillespie D. (1979) "Preparative and analytical purification of DNA from agarose". *Proc Natl Acad Sci U S A.*;76(2):615-9.
- Waigmann E, Ueki S, Trutnyeva K, Citovsky (2004) "The ins and outs of non-destructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses". *Crit. Rev. Plant Sci.*; 23:195-250.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Metraux JP, Ryals JA. (1991) "Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance". *Plant Cell.*; (10):1085-1094.
- Watanabe Y, Morita N, Nishiguchi M, Okada Y.(1987) "Attenuated strains of tobacco mosaic virus. Reduced synthesis of a viral protein with a cell-to-cell movement function". *J Mol Biol.*;194(4):699-704
- Watanabe Y, Ogawa T, Takahashi H, Ishida I, Takeuchi Y, Yamamoto M, Okada Y. (1995) "Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific ribonuclease". *FEBS Lett.*; 372(2-3):165-8.
- Whitham S, McCormick S, Baker B. (1996) "The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato". *Proc Natl Acad Sci USA.*;93(16):8776-81.
- Whitham SA, Quan S, Chang HS, Cooper B, Estes B, Zhu T, Wang X, Hou YM. (2003) "Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants". *Plant J.*;33(2):271-83.
- Winter G, Milstein C. (1991) "Man-made antibodies". *Nature.* 24;349(6307):293-9.
- Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. (1994) "Making antibodies by phage display technology". *Annu Rev Immunol.*;12:433-55.
- Wikoff WR, Tsai CJ, Wang G, Baker TS, Johnson JE. (1997) "The structure of cucumber mosaic virus: cryoelectron microscopy, X-ray crystallography, and sequence analysis". *Virology.*;232(1):91-7.

- Worn A, Auf der Maur A, escher D, Honneger A, Barberis A, Pluckthun A (2000) "Correlation between in vitro stability and in vivo performance of anti-GCN4 intrabodies as cytoplasmic inhibitors" *J. Mol. Biol.* 275:2795-2803.
- Worn A, Pluckthun A (2001) "Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments". *J Mol Biol*;305(5):989-1010.
- Xiao S, Ellwood S, Calis O, Patrick E, Li T, Coleman M, Turner JG. (2001) "Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8". *Science*; 291(5501):118-20.
- Xiao S, Charoenwattana P, Holcombe L, Turner JG. (2003) "The *Arabidopsis* genes RPW8.1 and RPW8.2 confer induced resistance to powdery mildew diseases in tobacco" *Mol Plant Microbe Interact.*;16(4):289-94.
- Yip YL, Ward RL. (2002) "Application of phage display technology to cancer research". *Curr Pharm Biotechnol*;3(1):29-43.
- Zhang, ZC, Li D,W, Zhang L, Yu JL, Liu Y (1999) "Virus movement protein gene mediated resistance against cucumber mosaic virus infection" *Acta Botanica Sinica* 41:585-590.
- Ziegler A, Torrance L, Macintosh SM, Cowan GH, Mayo MA. (1995) "Cucumber mosaic cucumovirus antibodies from a synthetic phage display library". *Virology*. 1;214(1):235-8.
- Zimmermann S, Schillberg S, Liao YC, Fischer R (1998) "Intracellular expression of TMV-specific single chain Fv fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabacum*" *Mol. Breed.* 4:369-379.