



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI
VITERBO**

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
IN BIOTECNOLOGIE VEGETALI - XIII CICLO.**

Titolo del progetto:

**Produzione in pianta di “particelle simil-virali” per la formulazione di
vaccini**

S.S.D. BIO 04

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Masci

Tutor: Dott.ssa Carla Marusic
(ENEA C.R. Casaccia)

Tutor: Dott. Eugenio Benvenuto
(ENEA C.R. Casaccia)

Dottoranda: Patrizia Circelli

INDICE

	pag
Lista abbreviazioni presenti nel testo	1
SCOPO DELLA TESI	2
CAPITOLO1: INTRODUZIONE	4
1. Definizione di vaccino e suo meccanismo d'azione	4
1.1 Tipologie di vaccini	5
1.1.1 Vaccini peptidici	7
2. Particelle simil-virali	8
2.1 Produzione di VLP in pianta	10
2.2 VLP derivate da virus animali prodotte in pianta	16
2.3 VLP chimeriche derivate da virus vegetali	19
2.3.1 VLP chimeriche da virus vegetali icosaedrici	19
2.3.2 VLP chimeriche da virus vegetali filamentosi	21
3. Il virus dell'Arricciamento maculato del carciofo	22
3.1 Struttura dei <i>Tombusvirus</i>	23
4. Elaborazione di modelli <i>in silico</i> di virus vegetali	24
5. Fattori che regolano la stabilità dei virioni	26
5.1 Ruolo strutturale e funzionale dell'RNA	26
5.2 Effetto di pH, forza ionica e ioni divalenti sull'assemblaggio delle particelle virali	27
5.3 Studio della stabilità virale e applicazioni in campo biotecnologico	28
6. Il virus dell'immunodeficienza umana, HIV	29
6.1 Sviluppo di un vaccino contro HIV-1	31
CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI	36
2.1 Ceppi batterici	34
2.2 Vettori utilizzati	34
2.2.1 Vettori utilizzati per la realizzazione dei costrutti	34
2.2.2 Costrutti contenenti gli inibitori del <i>silencing</i>	38
2.3 Letture spettrofotometriche	39
2.4 Clonaggi	40
2.4.1 Elettroforesi su gel d'agarosio per RNA	40
2.4.2 RT-PCR	40
2.4.4 Amplificazione del DNA mediante PCR	40
2.4.5 PCR sovrapposta	41

2.4.6 Sintesi degli oligonucleotidi e geni sintetici per il seguente progetto di tesi	42
2.4.7 Appaiamento in vitro di oligonucleotidi	43
2.4.8 Purificazione dei frammenti ottenuti mediante PCR	44
2.4.9 Estrazione e purificazione di DNA da gel d'agarosio	44
2.4.10 Restrizioni di DNA	44
2.4.11 Reazione di de fosforilazione	44
2.4.12 Reazione di ligazione	44
2.4.13 Preparazione di cellule batteriche competenti ed elettroporazione	44
2.4.14 Elettroporazione	45
2.4.15 Caratterizzazione dei ricombinanti batterici mediante PCR	45
2.4.16 Minipreparazione di DNA plasmidico	46
2.4.17 Sequenziamento	46
2.4.18 Preparazione di DNA plasmidico su larga scala	46
2.4.19 Preparazione dei costrutti genici per l'espressione della CP di AMCV in pianta	46
2.4.20 Realizzazione dei costrutti chimerici	48
2.5 Agroinfiltrazioni di Pianta di <i>Nicotiana benthamiana</i>	50
2.5.1 Condizioni di crescita delle piante	50
2.5.2 Agroinfiltrazione	51
2.6 Infezione di piante di <i>N. benthamiana</i> con il virus AMCV	51
2.7 Analisi dei tessuti agro infiltrati	52
2.7.1 Estratti proteici	52
2.7.2 Quantificazione delle proteine	52
2.7.3 Saggio ELISA	52
2.7.4 Analisi di proteine su gel di poliacrilamide	53
2.7.5 Colorazione con <i>Brilliant Blue Coomassie</i>	53
2.7.6 Colorazione con nitrato d'argento (<i>Silver Staining</i>)	53
2.8 Analisi al microscopio elettronico	54
2.9 Purificazioni di virioni e VLP	54
2.10 Esperimenti di disassemblaggio <i>in vitro</i> di virioni purificati	54
2.10.1 Disassemblaggio <i>in vitro</i>	54
2.10.2 Cromatografia liquida ad alta risoluzione (FPLC)	55
2.10.3 Misure di <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS)	55
2.11 Realizzazione di modelli <i>in silico</i>	55
2.11.1 Realizzazione dei modelli tridimensionali della CP della wild-type	

e delle sue chimere mediante <i>Homology Modeling</i>	55
2.11.2 Realizzazione dei modelli <i>in silico</i> delle VLP	56
2.11.3 Analisi della superficie accessibile al solvente e dei contatti molecolari della VLP	56
Appendice A: Terreni	57
Appendice B: Soluzioni	57
CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE	60
3.1 Preparazione dei costrutti per l'espressione transiente della CP dell'AMCV	60
3.2 Espressione transiente della CP	61
3.2.1 Valutazione dell'effetto di tre diversi inibitori del <i>silencing</i> sui livelli d'espressione della CP	61
3.2.2 Confronto tra differenti sistemi di espressione	62
3.3 Purificazione delle VLP e analisi al microscopio elettronico	65
3.4 Scelta degli epitopi dell'HIV-1 per la creazione delle VLP chimeriche	66
3.5 Elaborazione dei modelli <i>in silico</i>	67
3.5.1 Sviluppo di modelli di VLP chimeriche	70
3.6 Realizzazione dei costrutti per l'espressione delle CP chimeriche	74
3.7 Espressione transiente delle CP chimeriche	74
3.7.1 Analisi dell'espressione della CP-2F5	74
3.7.2 Analisi dell'espressione delle CP-V3	77
3.8 Studi di <i>swelling in-vitro</i> del virus AMCV	79
3.8.1 Esperimenti di disassemblaggio del virus AMCV	79
3.8.2 Analisi FPLC	81
3.8.3 Analisi al microscopio elettronico	83
3.8.4 Misure di <i>Dynamic Light Scattering</i>	84
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	86
BIBLIOGRAFIA	87

"... Non vogliate negar l'esperienza
di retro al sol, del mondo sanza gente.
Considerate la vostra semenza
fatti non foste a viver come bruti
ma per seguir virtute e canoscenza"

(Dante Alighieri, Divina Commedia, Inferno canto XXVI, 116-120)

Lista abbreviazioni presenti nel testo

AMCV (Artichoke mottled crinkle virus) virus dell'arricciamento maculato del carciofo

CCMV (Cowpea clorotic mottle virus) virus della clorosi maculata del fagiolo dall'occhio

CMV (Cucumber mosaic virus) virus mosaico del cetriolo

CP (Coat Protein) proteine del capsido

CPMV (Cowpea mosaic virus) virus del mosaico del fagiolo dall'occhio

CVP (Chimeric Virus Particle) particelle virali chimeriche

HA (Hemagglutinin) emoagglutinina virale

HBcAg (Hepatitis B core antigen) l'antigene core dell'Epatite B

HBsAg (Hepatitis B surface antigen) l'antigene di superficie dell'Epatite B

HBV (Hepatitis B virus) virus dell'Epatite B

HCRSV (Hibiscus clorotic ringspot virus) virus dell'anello clorotico dell'ibisco

HCV (Hepatitis C virus) virus dell'epatite C

HIV (Human immunodeficiency virus) Virus dell'immunodeficienza umana

HPV (Human papilloma virus) papilloma virus umano

NDV (Newcastle disease virus) virus della malattia di Newcastle

NV (Norwalk virus) virus di Norwalk

PapMV (Papaya mosaic virus) virus del mosaico della papaya

PVX (potato virus X) virus X della patata

TBSV (Tomato bushy stunt virus) virus del rachitismo cespuglioso del pomodoro

TCV (Turnip crinkle virus) virus della piega della rapa

TMV (Tobacco mosaic virus) virus del mosaico del tabacco

TYMV (Turnip yellow mosaic virus) virus del mosaico giallo della rapa

VLP (Virus-Like-Particles,) particelle simil-virali

SCOPO DELLA TESI

La possibilità di utilizzare le piante come sistema di produzione di biofarmaci offre una serie di vantaggi rispetto ai tradizionali sistemi di espressione eterologa come batteri, lieviti e colture cellulari di insetto o mammifero (Streatfield and Howard, 2003). Infatti, le piante si sono rivelate dei sistemi facilmente manipolabili (in termini di trasformazioni e rigenerazione), con bassi costi di mantenimento ed il vantaggio di avere un apparato traduzionale tipico di cellule eucariotiche (Ma *et al.*, 2003). Grazie ai notevoli progressi nel campo delle biotecnologie vegetali, è stato possibile sviluppare nuovi sistemi di espressione e di *delivery* di antigeni e peptidi appartenenti a patogeni umani ed animali per la formulazione di vaccini di “nuova generazione”. Un’applicazione interessante riguarda l’impiego di virus vegetali come *carriers* di epitopi immunogenici. Numerosi studi hanno dimostrato che sequenze derivanti da proteine esogene possono essere fuse a proteine del capsido (CP) di diversi virus vegetali e che le CP chimeriche, espresse in pianta, possono originare particelle virali chimeriche (CVP) oppure, strutture macromolecolari simili a virus denominate *Virus Like Particles* (VLP) che espongono la sequenza esogena sulla loro superficie.

Scopo del progetto di ricerca di questa tesi di dottorato è la produzione in pianta di VLP chimeriche esprimenti epitopi immunogenici dell’involucro esterno (*envelope*) del virus HIV-1, utilizzando un *design* razionale che combini studi *in silico* e ricerca sperimentale. In particolare tale studio è stato condotto utilizzando la CP del virus dell’arricciamento maculato del carciofo (Artichoke Mottled Crinkle virus AMCV) (Tavazza *et al.*, 1994; Molinari *et al.*, 1998). A questo scopo, la sequenza codificante per la CP dell’AMCV è stata clonata in differenti vettori di espressione transiente allo scopo di selezionare quello in grado di fornire la resa più alta in tessuti vegetali. La produzione della proteina virale è stata ottenuta per agroinfiltrazione ed è stata rivelata e quantificata mediante saggi immunoenzimatici (ELISA). Inoltre, la formazione di VLP è stata visualizzata mediante microscopia elettronica.

Parte del lavoro ha riguardato la realizzazione di un modello *in silico* della VLP, necessario per l’individuazione di siti utili all’inserimento di sequenze eterologhe codificanti per peptidi immunogenici all’interno della CP virale.

Per quanto riguarda la scelta dei peptidi, l’interesse è stato rivolto a regioni altamente conservate appartenenti alle gp 41 e 120 della membrana esterna del virus HIV, in grado di indurre una risposta immunitaria neutralizzante nell’uomo. In particolare sono stati scelti,

l'epitopo 2F5 della gp41 e l'epitopo V3 della gp120. Una volta caratterizzata *in silico* la VLP-WT, sono stati realizzati i modelli bioinformatici relativi alle VLP chimeriche. Il primo ad essere realizzato è stato il modello VLP-2F5 per l'esposizione dell'epitopo 2F5 fuso all'estremità C-terminale della CP. Il costrutto codificante la proteina di fusione CP-2F5 è stato espresso in pianta mediante agroinfiltrazione e la produzione della proteina chimerica è stata verificata e quantificata mediante saggi ELISA. Analisi preliminari al microscopio elettronico hanno rivelato il corretto assemblaggio della particella simil-virale chimerica. Inoltre si è proceduto con lo studio bioinformatico della strategia per la fusione dell'epitopo V3. A questo scopo sono stati realizzati 6 modelli, in ciascuno dei quali la sequenza estranea è stata fusa in un punto diverso all'interno della CP. Sulla base dell'analisi *in silico* sono stati preparati 3 costrutti codificanti per diverse CP-V3 chimeriche corrispondenti a 3 dei 6 modelli bioinformatici. L'espressione dei costrutti chimerici è stata valutata tramite saggi ELISA.

La parte finale del lavoro è stata focalizzata sullo studio di fattori che possono influenzare la stabilità delle VLP. A questo proposito, sono stati effettuati esperimenti di disassemblaggio *in vitro* del virus AMCV, utilizzando diverse condizioni di forza ionica e pH. I prodotti ottenuti sono stati analizzati mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (FPLC), spettroscopia ottica (dynamic light scattering, DLS) e microscopia elettronica.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1. Definizione di vaccino e suo meccanismo di azione.

Un vaccino è un preparato contenente materiale costituito da microrganismi o parti di essi (antigeni), opportunamente trattati, in modo da perdere le proprietà infettive ma non la capacità di indurre una risposta immunitaria specifica, la cosiddetta immunità attiva, nel soggetto cui viene somministrato. La vaccinazione può essere “preventiva” capace quindi di stimolare una risposta immunitaria protettiva a lungo termine nei confronti di agenti patogeni (grazie alla capacità del sistema immunitario di “ricordare” gli antigeni con cui entra in contatto) o “terapeutica” in grado di debellare infezioni già in atto. L’immunità deriva dalla produzione di anticorpi (neutralizzanti) in grado di bloccare il patogeno nelle primissime fasi dell’infezione.

La prima forma di risposta immunitaria che l’organismo attiva quando entra in contatto per la prima volta con un patogeno/antigene è detta “immunità innata” o aspecifica (Medzhitov *et al.*, 2000) che comprende mediatori chimici (secrezioni mucosali e mediatori dell’infiammazione) e cellulari (monociti, macrofagi, cellule specializzate: linfociti T *Killer*). L’interazione del patogeno con le cellule dell’immunità innata comporta il suo inglobamento per fagocitosi. In questa fase della risposta immunitaria entrano in gioco oltre ai monociti e macrofagi anche cellule specializzate (linfociti T *Killer*) che riconoscono ed uccidono le cellule infettate (Figura 1).

Contemporaneamente alla risposta innata, si attiva nell’organismo un tipo di risposta più specifica costituita dall’immunità acquisita (detta anche “adattativa” o specifica). In questo tipo di risposta un ruolo fondamentale è svolto dalle cellule che presentano l’antigene (*Antigen Presenting Cells*, APC) tra cui macrofagi e cellule dendritiche (DC). Le APC, inglobano l’antigene, si allontanano dal tessuto in cui risiedono e migrano verso i linfonodi, seguendo uno stimolo chemiotattico. Durante questo tragitto sono sottoposte ad un cambiamento morfologico che le rende più adatte a svolgere il loro compito: la cellula ritrae le appendici tentacolari citoplasmatiche, se ne aveva, e aumenta le molecole di membrana per l’interfaccia con i linfociti T-*helper*. L’antigene è intanto degradato da enzimi litici nei lisosomi della cellula, e gli epitopi risultanti vengono inseriti negli appositi siti del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC).

La risposta immunitaria può essere “umorale”,cioè con produzione di anticorpi specifici o “cellulo-mediata” con proliferazione di cellule specializzate nel riconoscere e distruggere le cellule infettate dai patogeni (Figura1).

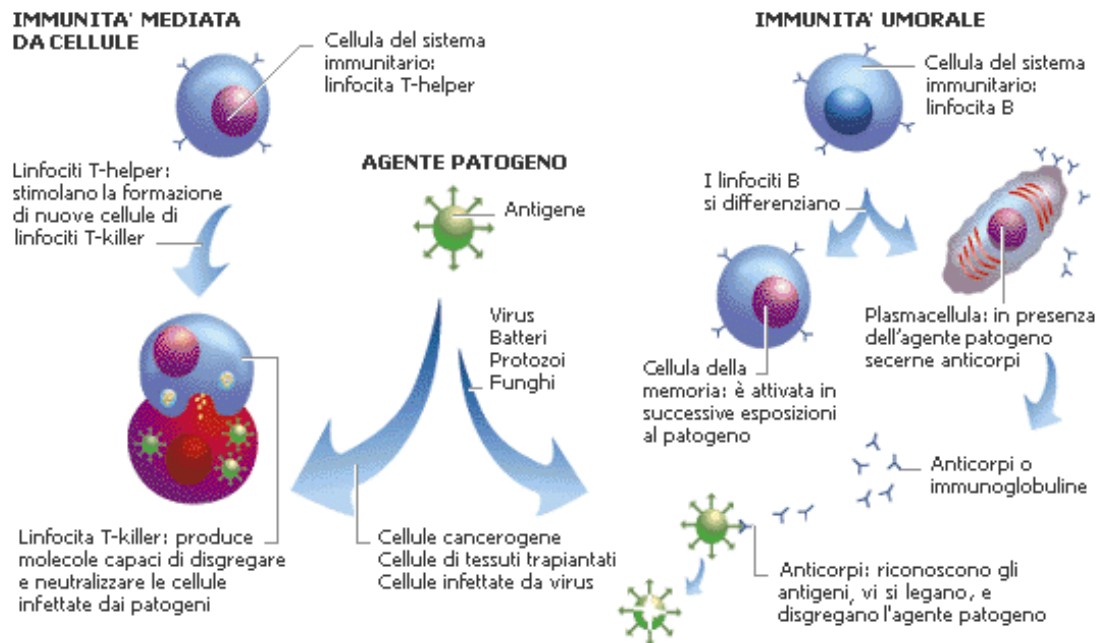


Figura 1 Principali meccanismi dell'immunità umorale e cellulo-mediata.

1.1 Tipologie di vaccini

Il primo vaccino venne realizzato da Edward Jenner (1749-1823) nel 1796 contro il vaiolo umano. Jenner, osservò che le persone che avevano sofferto di vaiolo bovino non contraevano il vaiolo umano e decise di verificare se un preparato ottenuto dalle lesioni cutanee degli animali infetti, poteva risultare efficace nell'indurre protezione nell'uomo. Il risultato fu sorprendente, infatti il materiale di origine bovina (vaccino) inoculato attraverso una piccola ferita appositamente creata, causava nel soggetto ricevente una forma lieve di vaiolo che lo lasciava immune alla malattia vera e propria. Nasce così il nome “vaccino”, dalla somministrazione del virus "vaccinia" o vaccino. Pasteur 100 anni più tardi introduce la vaccinazione mediante l'utilizzo dei vaccini attenuati, batteri o virus che mantengono la capacità di moltiplicarsi ma sono incapaci di provocare manifestazioni cliniche (Rappuoli *et al.*, 2004). Con i suoi studi, Louis Pasteur dimostrava che si poteva indurre immunità, più o meno duratura, utilizzando microrganismi omologhi (Jenner utilizzò microrganismi eterologi, virus di bovino per prevenire la malattia nell'uomo) inattivati. Sono nati così i vaccini inattivi, testati da Pasteur per il carbonchio, ed i vaccini attenuati, prodotti per la prima volta, dallo stesso autore nel 1885 contro il virus della

rabbia. Nonostante Pasteur non riuscì a conoscere in dettaglio i meccanismi alla base dell'attivazione della risposta immunitaria e dello stabilirsi della memoria, i suoi studi hanno rappresentato il punto di partenza della vaccinologia moderna. Nel diciannovesimo secolo fu introdotto l'uso di vaccini inattivati (batteri o virus uccisi) con mezzi fisici o chimici. Questi vaccini, considerati oggi come convenzionali, che hanno sicuramente rappresentato un traguardo fondamentale per il controllo e la lotta contro un gran numero di malattie animali ed umane, dal vaiolo alla rabbia passando dalle malattie suine, come l'afta epizootica e la peste suina classica, presentano tuttavia notevoli limitazioni. I problemi legati alla biosicurezza di queste formulazioni vaccinali sono ancora aperti e sono riconducibili da un lato alla possibile reversione del patogeno inattivato a virulento e dall'altro alla capacità di indurre risposte autoimmuni. Inoltre, di non minor importanza sono la bassa resa rispetto agli alti costi di produzione, dovuti anche all'incapacità di alcuni patogeni di riprodursi *in vitro* (Black *et al.*, 2010). Per cercare di dare una risposta a queste problematiche e grazie alle attuali conoscenze sulla risposta immunitaria agli agenti infettivi e allo sviluppo dell'ingegneria genetica, nel corso degli anni la vaccinologia moderna si è indirizzata verso la realizzazione di vaccini efficaci e più sicuri rispetto a quelli tradizionali. Inizia "l'era" dei così detti "vaccini ricombinanti" o "di nuova generazione", alcuni dei quali sono già presenti sul mercato (Hbvaxpro dell'Aventis Pasteur anti epatite B, Gardasil della Merk & Co. e Cavarix della GSK, entrambe vaccini anti papilloma umano) mentre altri sono in via di sperimentazione. Le formulazioni vaccinali ricombinanti si basano sull'identificazione di una o più proteine (antigene) del patogeno o di porzioni di antigeni (epitopi) in grado di indurre una risposta immunitaria protettiva. Il passo successivo consiste nel selezionare i geni corrispondenti e utilizzando l'ingegneria genetica, clonarli e farli esprimere in opportuni sistemi cellulari (cellule batteriche, di lievito e soprattutto d'insetto).

I vaccini ricombinanti possono essere classificati in: a) vaccini a subunità costituiti da una o più proteine (subunità) di un agente infettivo; b) vaccini peptidici basati sull'identificazione, nella struttura completa di una proteina, di epitopi (brevi segmenti proteici) o determinanti antigenici in grado di indurre una risposta immunitaria protettiva; c) vaccini inattivati mediante delezione dei geni che codificano proteine collegate alla virulenza ed ottenendo così ceppi attenuati in maniera stabile e sicura; d) vaccini a DNA in cui la sequenza codificante l'antigene viene veicolata nell'organismo mediante l'uso di opportuni plasmidi che funzionano come vettori che vengono captati dalle cellule animali

ed incorporati nel nucleo cellulare, permettendo l'espressione del gene estraneo e la produzione della proteina corrispondente (Figura 2).

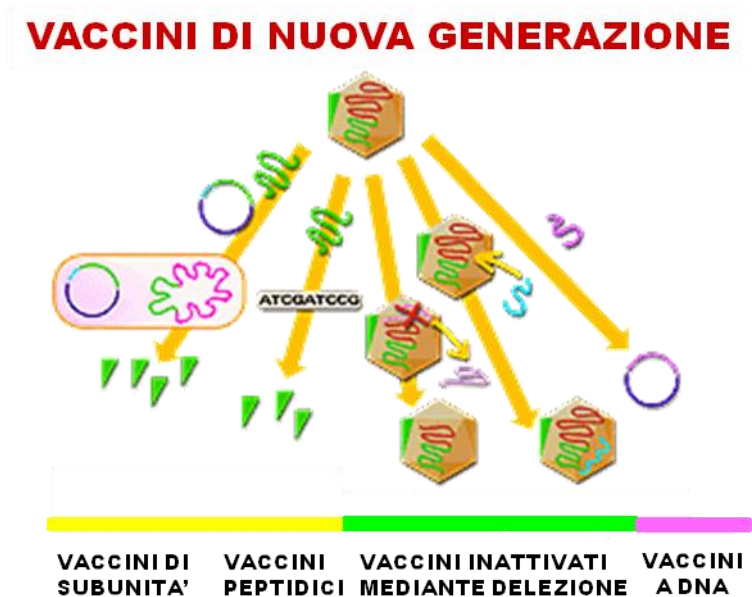


Figura 2. Rappresentazione schematica di tipi differenti di “vaccini di nuova generazione”.

Vaccini di subunità: si basano sulla produzione di una proteina o di più proteine di un agente infettivo senza utilizzare il microrganismo; vaccini peptidici: si basano sull'identificazione della proteina o delle proteine di un agente infettivo che siano in grado di indurre una risposta immunitaria protettiva simile a quella stimolata dall'agente infettivo completo, vengono selezionati i geni corrispondenti, clonati ed espressi in diversi sistemi; vaccini inattivati mediante delezione: mediante una delezione selettiva vengono eliminati geni codificanti per proteine di virulenza; vaccini a DNA: la sequenza codificante l'antigene viene veicolata nell'organismo mediante vettori, nel citoplasma il DNA viene trascritto e tradotto, ma non replicato.

1.1.1 Vaccini peptidici

Lo studio dei meccanismi molecolari di attivazione della risposta immunitaria indica che i peptidi, piuttosto che le proteine intere, siano i responsabili dell'attivazione dei linfociti T e B (Molnár *et al.*, 2009). In particolare, quando un organismo entra in contatto con un patogeno per la prima volta, la prima reazione che si innesca è il suo riconoscimento da parte di specifici recettori (immunoglobuline) su cellule specializzate del sistema immunitario. Il patogeno viene agganciato da immunoglobuline specifiche, internalizzato mediante fagocitosi e successivamente metabolizzato. Gli epitopi immunogenici vengono esposti sulla superficie cellulare in associazione con le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Il riconoscimento di questo complesso peptide-MHC è fondamentale per stimolare una risposta immunitaria duratura. Dalla conoscenza di questi processi è stato possibile dedurre che è quindi possibile stimolare una risposta immunitaria umorale o cellulo-mediata utilizzando opportuni peptidi, eliminando totalmente i problemi

di biosicurezza correlati all'impiego di vaccini vivi o attenuati. La selezione di peptidi da inserire in formulazioni vaccinali richiede la mappatura degli epitopi dell'antigene per identificare sequenze immunodominanti.

I fattori principali che vanno considerati nel disegnare un vaccino a base di peptidi sono i seguenti:

- gli anticorpi spesso riconoscono epitopi conformazionali e non lineari, quindi il peptide deve essere in grado di assumere la stessa conformazione che ha nella proteina intera;
- i singoli peptidi sono scarsamente immunogenici e devono essere associati a “carriers” e/o a sostanze (adiuvanti) in grado di stimolare una risposta immunitaria specifica contro il peptide.

Nel tentativo di mimare la struttura conformazionale (in particolare l'involucro virale) sono state sviluppate diverse strategie: utilizzo di peptidi ciclici, peptidi ramificati e altre strutture complesse multimeriche, così come i peptidi coniugati con altre molecole (Azizi *et al.*, 2007). Le miscele di peptidi o 'mimotopi' identificati nelle librerie combinatoriali di peptidi che potrebbero mimare le strutture rilevanti e potenzialmente indurre risposte immunitarie sono stati impiegati con successo in alcuni studi preclinici di vaccinazione (ad esempio, il virus sinciziale delle vie respiratorie, il morbillo e l'epatite C) (Knittelfelder *et al.*, 2009). Un altro grande ostacolo per i vaccini peptidici è la loro intrinseca bassa immunogenicità e quindi necessitano di vettori e/o adiuvanti per attivare la risposta immunitaria. Recentemente è stato dimostrato che in maniera analoga a quanto già evidenziato per i virus animali, alcune CP di virus vegetali sono degli ottimi sistemi di presentazione *display* di epitopi immunogenici (Kamarova *et al.*, 2010).

2. Particelle simil-virali

Le particelle simil-virali (VLP) sono strutture sopramolecolari che possono avere forma bastoncellare o icosaedrica con un diametro che oscilla tra i 25-100 nanometri. Le VLP sono costituite da copie multiple di una o più proteine strutturali di origine virale, definite genericamente proteine del capsido che si auto-assemblano spontaneamente anche in assenza del genoma virale, formando particelle del tutto simili al virus da cui derivano (Chackerian, 2007). Proteine capaci di formare VLP sono state identificate e caratterizzate in diversi tipi di virus, dai batterici a quelli animali e vegetali. Essendo strutturalmente simili al virus da cui derivano, queste strutture macromolecolari sono dei potenti

immunogeni, spesso antigenicamente indistinguibili dal virus da cui derivano (Jennings *et al.*, 2008). La somiglianza al patogeno corrispondente, accompagnata dall'assenza di informazione genetica con capacità replicativa al loro interno, rendono le VLP particolarmente interessanti per lo sviluppo di nuove piattaforme vaccinali (Maurer *et al.*, 2005). La tipica struttura densa ordinata e ripetitiva, simil-cristallina è in grado di stimolare un'efficiente risposta dei linfociti B. A livello molecolare, la presenza ripetuta e ordinata dello stesso epitopo garantisce il legame simultaneo con più di una molecola anticorpale sulla membrana dei linfociti B da cui dipende la loro attivazione (Bachmann *et al.*, 1993). E' stato anche calcolato il numero minimo di ripetizioni (20-25 epitopi) e la distanza ottimale tra un epitopo e l'altro (5-10 nm) necessari per l'attivazione dei linfociti B. Tali parametri sono perfettamente rispettati quando peptidi immunogenici vengono esposti sulla superficie di virus. Per spiegare tale fenomeno è stato ipotizzato che la co-evoluzione di certi patogeni e vertebrati avrebbe determinato la comparsa di una risposta immunitaria adattativa in grado di riconoscere rapidamente le tipiche strutture ordinate e ripetute della superficie di VLP (Bachmann and Zinkernagel 1997). In maniera del tutto analoga, anche l'attivazione dei linfociti T è favorita in presenza di strutture simil-virali. Infatti, l'attivazione dei linfociti T è mediato dalle cellule dendritiche (DC) che internalizzano il patogeno e anche in questo caso è stato evidenziato che la dimensione ottimale perché gli antigeni vengano fagocitati da DC è di circa 40 nm (valore che corrisponde esattamente al diametro delle VLP).

La grande immunogenicità delle VLP può anche essere sfruttata per ottenere una risposta immunitaria contro peptidi antigenici che non appartengono al virus da cui queste derivano. Come già descritto nel paragrafo dedicato ai vaccini peptici, una delle maggiori limitazioni nella progettazione di queste formulazioni vaccinali è rappresentata dalla scarsa immunogenicità degli epitopi estrapolati dal loro contesto proteico. Le VLP rappresentano in questo caso specifico un'ottima soluzione poichè oltre ad essere di per sé dei potenti immunogeni sono anche un ottimo sistema di presentazione di peptidi antigenici.

VLP chimeriche sono state ottenute da proteine strutturali di virus appartenenti a differenti famiglie dai batteriofagi ai virus sia animali che vegetali (Figura 3), attraverso la tecnologia del DNA ricombinante, modificando la sequenza genica della CP virale fondendola con la sequenza per l'epitopo designato per la formulazione del vaccino, in modo che le sequenze vengano tradotte e assemblate insieme a creare un'unica particella chimerica durante la sintesi *de novo* (Grgacic *et al.*, 2006). Questo efficiente sistema di presentazione di epitopi immunogenici presenta comunque delle limitazioni dovute

essenzialmente alle caratteristiche del peptide esogeno. In particolare, la composizione aminoacidica (da cui dipende il punto isoelettrico) e la lunghezza del peptide esogeno possono interferire con l'assemblaggio della VLP.

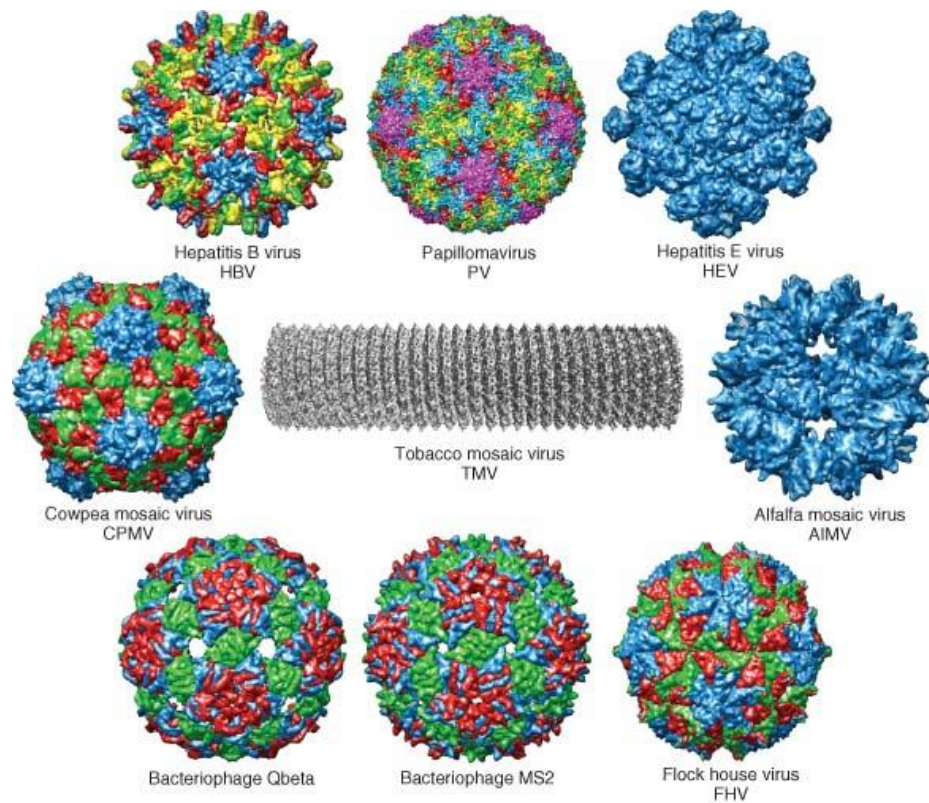


Figura 3. Esempi di virus e batteriofagi utilizzati per produrre VLP.

HBV: virus dell'epatite B; PV virus del papilloma; HEV: virus dell'epatite E; AIMV :virus del mosaico dell'erba medica; Bacteriophage MS2: batteriofago MS2; Bacteriophage Qbeta: batteriofago Qbeta; CPMV Virus del mosaico del fagiolo dell'occhio; TMV Virus del mosaico del tabacco; (Adattata da Plummer and Manchester 2010).

2.1 Produzione di VLP in pianta

Le VLP vengono espresse in maniera ricombinante in una grande varietà di tipi cellulari inclusi batteri, lieviti, cellule di insetto e di mammifero. Recentemente, è stata inoltre esplorata la possibilità di utilizzare le piante come sistema di espressione di VLP derivate sia da virus animali (Mason *et al.*, 1992) che vegetali (Natilla *et al.*, 2006). La pianta come biofabbrica di numerose proteine eterologhe d'interesse biomedico rappresenta un'ottima alternativa ai tradizionali sistemi di espressione utilizzati per la produzione di farmaci in termini sia di qualità del prodotto finale, che economici e di biosicurezza (Ma *et al.*, 2003; Rybicki, 2010). Per esempio, le cellule batteriche non sono dotate di un macchinario

enzimatico per le modifiche post-traduzionali e questo le rende non adatte per la sintesi di polipeptidi complessi. Cellule evolutivamente più complesse come i lieviti sono in grado di introdurre modifiche post-traduzionali ma spesso portano alla sintesi di un prodotto funzionale ma qualitativamente diverso dall'originale a causa della caratteristica iperglicosilazione. Le colture cellulari di insetto e di mammifero non solo sono le più difficili e dispendiose da mantenere in coltura, ma presentano anche il maggior rischio di contaminazione da parte di virus, tossine o prioni pericolosi per la salute umana. Molte delle problematiche elencate possono essere risolte grazie all'utilizzo di sistemi vegetali (Ma *et al.*, 2003; Rybicki, 2010). Infatti, nella cellula vegetale le proteine vanno incontro a modifiche post-traduzionali, come in altri eucarioti superiori, anche se vengono aggiunti preferenzialmente gruppi glicosidici caratteristici (come fucosio e xilosio) e sono praticamente assenti galattosio e acido sialico (Ma *et al.*, 2003). Un altro vantaggio riguarda i bassi costi di produzione e la possibilità di conservare e trasportare il prodotto a temperatura ambiente se si opera in modo che questo venga sintetizzato in tessuti di accumulo come tuberi o semi.

La produzione di VLP in pianta è resa possibile dal fatto che esistono diverse tecniche per la trasformazione delle cellule vegetali (Figura 4). La prima metodica messa a punto è stata la trasformazione stabile, che sfrutta la totipotenza e le capacità rigenerative della cellula vegetale. Le tecniche ad oggi più utilizzate prevedono la trasformazione genetica di espianti di tessuto e la rigenerazione di piante intere a partire da questi ultimi. In questo modo la sequenza di interesse è integrata nel genoma e la modificazione genetica è trasmessa alla progenie. Recentemente, sono stati messi a punto sistemi di trasformazione transiente basati sull'utilizzo di virus vegetali o dell'*agrobatterio*. La trasformazione transiente, viene effettuata su piante adulte, non comporta l'integrazione di sequenze geniche eterologhe nel genoma vegetale e pertanto, limita la produzione della proteina ricombinante alla singola pianta.

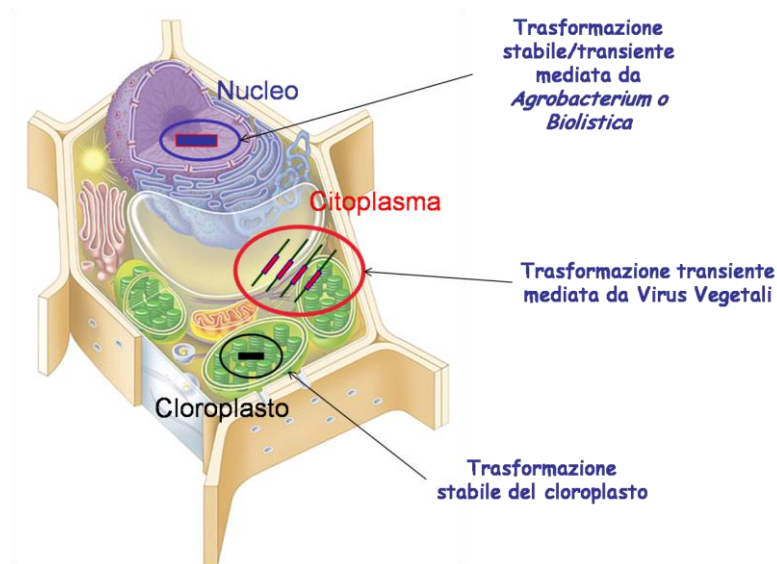


Figura 4. Strategie per la trasformazione della cellula vegetale.

Sia la trasformazione stabile che quella transiente basata sull'agroinfiltrazione sfruttano la naturale capacità del batterio patogeno *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) di trasferire stabilmente parte della propria informazione genetica all'interno della cellula vegetale. Questo batterio infetta normalmente piante dicotiledoni tra cui piante da frutto, pomodoro, soia, patata e molte altre (Lessard *et al.*, 2002), provocando la formazione di un tumore noto come “tumore del colletto”. La formazione tumorale è dovuta al trasferimento da parte del batterio di una regione di DNA chiamata T-DNA, dal plasmide Ti (*Tumor inducing*) al genoma nucleare della pianta. In particolare i geni vir (sempre localizzati sul plasmide Ti) sono responsabili dell'infezione della pianta, mentre il T-DNA è responsabile sia della patogenicità che dell'integrazione delle sequenze esogene nel genoma ospite. Studi più approfonditi hanno messo in evidenza che i geni vir possano funzionare anche in trans (quindi non devono essere necessariamente presenti sul frammento di DNA da trasferire) e che fondamentali per l'integrazione del T-DNA sono delle piccole sequenze non patogeniche alle sue estremità (*right border* RB e *left border* LB). Queste scoperte sono state sfruttate per realizzare vettori plasmidici non patogeni che vengono ampiamente utilizzati sia per la trasformazione stabile che per quella transiente.

Una tecnica di trasformazione stabile alternativa è rappresentata dal metodo biolistico. La tecnica si basa sull'uso di microproiettili d'oro o di tungsteno rivestiti con il DNA plasmidico di interesse, che vengono accelerati contro una cellula. La velocità dei microproiettili è sufficientemente alta da superare, senza danneggiare, la parete e la membrana cellulare (Ye *et al.*, 1990). Il DNA all'interno della cellula si potrà integrare così nel genoma nucleare. Un altro uso della tecnica biolistica è dato dalla possibilità di

trasformare il genoma del cloroplasto. La trasformazione plastidiale è una tecnica descritta da molti autori in letteratura (Maliga, 2004; Daniell, 1993). Tuttavia, rispetto alla trasformazione nucleare, che è oggi un processo routinario, le caratteristiche strutturali e metaboliche dei plastidi comportano un aumento delle difficoltà in tutte le fasi di trasformazione (Heifetz, 2000). A tutt'oggi solo alcuni protocolli sono disponibili per un numero limitato di specie, tra le quali tabacco, patata, riso e pomodoro. I vantaggi che questo nuovo sistema offre sono: aumento del grado di espressione della proteina di interesse di circa 10 volte rispetto alla trasformazione nucleare, sequestro della proteina nell'organello, assenza di effetti di posizione in quanto l'integrazione nel genoma plastidiale è sito-specifica, assenza di trasmissione indesiderata del transgene nel polline in quanto i plastidi sono ereditati per via materna. La trasformazione del cloroplasto ha anche i suoi svantaggi dovuti al fatto che questo è un organello di origine procariotica. Tra i limiti della trasformazione plastidiale rientrano alcune modifiche post-traduzionali che non avvengono nei plastidi per la mancanza degli enzimi necessari, come la glicosilazione e la miristilazione. La mancanza di queste modificazioni comporta che proteine che necessitano di glicosilazione o di altre modifiche non potranno essere espresse correttamente nell'ambiente plastidiale. Sia la trasformazione mediata da *A. tumefaciens*, sia quella con il metodo biolistico, richiedono la rigenerazione dei tessuti vegetali *in vitro*, che comporta lunghi tempi di attesa che variano a seconda della specie da trasformare e considerevoli investimenti di tempo e costi per il mantenimento delle piante *in vitro*, prima che l'espressione delle proteine possa essere analizzata (Fischer *and* Emans, 2000).

La trasformazione transiente presenta diversi vantaggi rispetto alla trasformazione stabile, primo tra tutti la rapidità, infatti non è richiesta la rigenerazione dei tessuti vegetali ed i risultati riguardo l'espressione proteica possono essere ottenuti in pochi giorni (Kapila *et al.*, 1997). I principali sistemi di espressione transiente sono il bombardamento tramite il metodo biolistico, l'infezione dei tessuti vegetali tramite vettori virali modificati e l'infiltrazione dei tessuti vegetali mediante agrobatterio (agroinfiltrazione). I livelli di espressione variano a seconda della tecnica utilizzata. Il bombardamento con il metodo biolistico raggiunge poche cellule e di conseguenza la resa è generalmente bassa (Christou, 1995). I vettori virali infettano molte cellule e la replicazione virale nel citoplasma genera numerose copie del trascritto, di conseguenza il livello di espressione del gene esogeno è elevato. La tecnica dell'agroinfiltrazione coinvolge un elevato numero di cellule e la trascrizione del T-DNA avviene nel nucleo delle cellule infettate. Poiché solitamente la quantità di proteina ricombinante ottenuta con questa metodica, può essere limitata

dall'innescarsi del silenziamento genico post-trascrizionale (Johansen *and* Carrington, 2001), si può ovviare a quest'effetto utilizzando inibitori del silenziamento genico di derivazione virale. Recentemente, sono stati messi a punto una serie di sistemi di espressione basati sulla co-agroinfiltrazione di tessuti vegetali con una miscela di due colture di agrobatterio differenti, una recante il gene di interesse e l'altra la sequenza codificante per un inibitore del silenziamento genico. In letteratura sono presenti una vasta serie di lavori in grado di documentare che ad esempio, l'espressione della proteina p19 del TBSV, porta ad un aumento di cinquanta volte dei livelli di espressione di diverse proteine ricombinanti (Voinnet *et al.*, 2003). Altri inibitori del silenziamento genico di derivazione virale sono la 2b del CMV (Roth *et al.*, 2004), la p25 del PVX (Hamilton *et al.*, 2002) e la p19 dell'AMCV clonata nel nostro laboratorio (Lombardi *et al.*, 2010).

La prima generazione di vettori virali era basata sull'utilizzo dell'intera sequenza del genoma virale alla quale veniva aggiunto il gene di interesse a valle di un promotore virale forte. In seguito, sono stati realizzati nuovi vettori che garantiscono alti livelli d'espressione ovviando sia alla possibile dispersione ambientale del virus ricombinante, che alla problematica connessa alla compatibilità della sequenza estranea con la *fitness* del virus. Tali vettori virali "di nuova generazione", sono stati costruiti privando il genoma virale di tutte quelle sequenze necessarie alla replicazione del virus ed al suo movimento e lasciando soltanto gli elementi che regolano la trascrizione. A questo proposito, un lavoro eccellente è stato realizzato da una *Company* tedesca, la Icon Genetics che ha prodotto un sistema di espressione transiente, denominato "magnICON^R", basato sulla scomposizione del genoma del TMV (Marillonet *et al.*, 2004). In questo modo sono stati progettati e realizzati i così detti "provettori" che contengono le sequenze virali e la sequenza di interesse su moduli separati, questi una volta trasferiti all'interno della cellula vegetale si assemblano grazie all'aiuto di una ricombinasi sito-specifica e danno luogo al vettore di espressione definitivo (Marillonet *et al.*, 2004). I pro-vettori vengono trasferiti all'interno del tessuto vegetale utilizzando l'agrobatterio. Questa innovativa metodologia ha consentito di ottenere rese molto elevate sia di proteine ad interesse farmaceutico, come antigeni F1 e V di *Yersinia pestis* (Santi *et al.*, 2006), che proteine "prova" come la GFP (Gleba *et al.*, 2005). Lomonosoff e collaboratori hanno sviluppato un'ulteriore generazione di vettori basata sul genoma del CPMV (Sainsbury *et al.*, 2008). I vettori ottenuti sono di piccole dimensioni (circa 5548bp) e quindi facilmente manipolabili, e contengono esclusivamente sequenze virali che potenziano l'espressione e la traduzione del gene esogeno. Questo nuovo sistema, chiamato CPMV-HT (*hyper-translatable Cowpea Mosaic Virus*) è stato

ottimizzato mediante la mutazione di particolari sequenze non codificanti presenti nel genoma virale. Gli esperimenti hanno dimostrato che è possibile ottenere rese di espressione fino al 30% delle proteine solubili totali (Sainsbury *et al.*, 2009). In tabella 1 sono riportati alcuni esempi relativi all'espressione transiente di biofarmaci in pianta.

Tabella 1. Esempi di particelle simil-virali derivate da virus animali prodotte in pianta.

Antigene	Sistema di espressione	Resa	Referenza
S-HBsAg	NB transgenico	0.01% TSP	Mason <i>et al.</i> , 1992
	ST transgenica	16 µg/g FW	Richter <i>et al.</i> , 2000
	Callo di lupino transgenico	150 ng/g FW	Kapusta <i>et al.</i> , 1999
	LS transgenica	5.5 ng/g FW	Kapusta <i>et al.</i> , 1999
	Cellule NB transgenico	2 µg/g FW-8 µg/g FW	Sunil Kumar <i>et al.</i> , 2003 Smith <i>et al.</i> , 2002
	SL transgenico	10 ng/g FW	Gao <i>et al.</i> , 2003
	Cellule SH transgenica	74 µg/g FW	Smith <i>et al.</i> , 2002
M-HBsAg	NB transgenica	394 ng/mg TSP	Huang <i>et al.</i> , 2005
	ST transgenica	15 ng/mg TSP 0.09% TSP	Ehsani, <i>et al.</i> , 1997 Joung <i>et al.</i> , 2004
VSPα-S-HBsAg	cellule di NT transgenico	226 ng/mg TSP	Sojikul <i>et al.</i> , 2003
GFP-HBsAg	NB transiente	25 ng/mgTSP 1g/kg FW	Huang <i>et al.</i> , 2004 Sainsbury <i>et al.</i> , 2008
HBsAg-HIV1	NB e AT transgeniche		Greco <i>et al.</i> , 2007
HBcAg	NT transgenico	24µg/g FW	Tsuda <i>et al.</i> , 1998
	PVX/NB	50 µg/g FW	Mechtcheriakova <i>et al.</i> , 2006
	CPMV-HT/VU	10 µg/g FW	Mechtcheriakova <i>et al.</i> , 2006; Sainsbury <i>et al.</i> , 2008
	MagnICON/NB	2mg/g FW	Huang <i>et al.</i> , 2006
NV	NT transgenico	0.23% TSP	Mason <i>et al.</i> , 1996
	ST	10–20 µg/g FW	Mason <i>et al.</i> , 1996
	SL transgenico	20–30 µg/g	Huang <i>et al.</i> , 2005
	MagnICON- BeYDV NB	0.86 mg/g FW 0,34 mg/g	Santi <i>et al.</i> , 2008 Huang <i>et al.</i> , 2009
HPV11-L1	ST	20 ng/g FW	Warzecha <i>et al.</i> , 2003
HPV16 L1	NT transgenico	0.5% of TSP	Biemelt <i>et al.</i> , 2003
	ST	0.2% of TSP	
	NB	2–4 µg/kg FW	Warzecha <i>et al.</i> , 2003
	NB transiente	17% TSP	Maclean <i>et al.</i> , 2007
	Cloroplasti NT transgenico	3 mg L1/g FW-24% TSP	Fernández-San Millán <i>et al.</i> , 2008, Lenzi <i>et al.</i> , 2008
HA(H5N1/H1N1)	NB transiente		D'Aoust <i>et al.</i> , 2008
	CPMV-HT NB		D'Aoust <i>et al.</i> , 2010
Pr55gag (HIV-1)	NB stabile -transiente	48 µg/kg FW	Meyers <i>et al.</i> , 2008
	cloroplasto NB transgenico	0,01-0,1% TSP- 28 mg/kg di FW	Scotti <i>et al.</i> , 2009
Pr55gag- RbcL	cloroplasto NT transgenico	363 mg/kg di FW	Scotti <i>et al.</i> , 2009
P17-P24 (HIV-1)	cloroplasto transiente NT	4,8µg/g FW	Meyers <i>et al.</i> , 2008

FW: peso fresco; HA: emoagglutinina del virus dell'influenza; HBcAg: antigene del core dell'epatite B; HBsAg: antigene di superficie dell' Epatite B; HIV: virus dell'immunodeficienza umana; HPV: papilloma virus umano; ND: dati non disponibili; NV: Norwalk Virus; TSP: proteine totali solubili. Piante utilizzate: AT *A. thaliana*; LS *Lactuca sativa*; NB *N. benthamiana*; NT *N. tabacum*; SH *Soja hispida*; SL *Solanum lycopersicum* ; ST *Solanum Tuberosum*; VU *Vigna unguiculata*.

2.2 VLP derivate da virus animali prodotte in pianta

Nel 1992 viene dimostrato, per la prima volta, che esprimendo stabilmente in piante di *N.tabacum* l'antigene di superficie dell'Epatite B si ottengono particelle sferiche assemblate del diametro di 22 nm del tutto paragonabili a quelle purificate dal siero umano o ottenute per via ricombinante in cellule di lievito (Mason *et al.*, 1992). Successivamente, esperimenti di immunizzazione in modelli murini hanno dimostrato che la risposta indotta dall'antigene prodotto in pianta era qualitativamente simile a quella ottenuta con l'HBsAg prodotto in lievito anche in seguito ad immunizzazione orale (Thanavala *et al.*, 1995; Kong *et al.*, 2001). Grazie alla capacità di queste particelle prodotte in pianta di stimolare alti livelli della risposta immunitaria in modelli murini, sono state effettuate due sperimentazioni cliniche umane. La prima è stata effettuata immunizzando oralmente 3 individui con 2 dosi di lattuga transgenica contenente 1 µg di HBsAg. I risultati della sperimentazione dimostrarono che in 2 dei 3 individui il titolo delle IgG anti HBsAg raggiungeva nel siero valori per i quali si ha una risposta protettiva verso questo antigene (Kapusta *et al.*, 2001). Ottimi risultati sono stati ottenuti con una successiva sperimentazione clinica nel 2005, che coinvolse un numero maggiore di individui (Thanavala *et al.*, 2005). La sperimentazione fu condotta somministrando, per ingestione, 100 gr di tuberi di patate crude per dose (contenenti ~850 µg di HBsAg). La sperimentazione è stata effettuata su 42 volontari già vaccinati con un vaccino anti HBsAg commerciale. L'analisi dei sieri evidenziò un incremento nel titolo di anticorpi specifici in 10 /16 individui che avevano ingerito tre dosi di antigene e in 9/17 volontari immunizzati con sole due dosi. Questi risultati ottenuti senza l'aggiunta di adiuvanti o di sostanze in grado di proteggere l'antigene dal pH acido dello stomaco, dimostrarono l'efficacia di un vaccino orale prodotto in piante edibili come componente di un programma di vaccinazione globale (Thanavala *et al.*, 2005).

Nel 2007 il gruppo di Greco tenta un approccio innovativo, esprimendo, in piante di *N.tabacum* e *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*) VLP chimeriche derivanti dalla fusione dell'HBsAg con epitopi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1). Il progetto è rivolto alla produzione di un vaccino bivalente visto che i due virus diffondono attraverso vie di trasmissione simili, e l'infezione da HBV si presenta nel 32% dei casi di malati di AIDS (Greco *et al.*, 2007).

Risultati interessanti sono stati ottenuti anche esprimendo in pianta l'antigene del core dell'epatite B. È stato dimostrato che questo antigene, prodotto per via ricombinante in una grande varietà di sistemi eterologhi, tra cui le piante, è in grado di stimolare un alto titolo

anticorpale, la cui risposta però non è protettiva contro HBV. Ciò rende questo virus un interessante carrier per il display di antigeni esogeni (Pumpens *et al.*, 1995). Alti livelli di espressione in pianta dell'HBcAg sono stati ottenuti, in piante di fagiolo dell'occhio, grazie ad una nuova generazione di vettori di espressione che utilizza la tecnologia dei virus scomposti (Sainsbury *et al.*, 2008). Immunizzazioni di modelli murini sia per via mucosale che per via intraperitoneale hanno dimostrato che queste VLP derivate da piante di *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*) sono in grado di evocare la produzione di ottimi titoli anticorpali senza l'utilizzo di nessun adiuvante (Huang *et al.*, 2006).

Il gruppo di Mason ha ottenuto anche piante transgeniche di tabacco e di patata che esprimevano la proteina del capsido del virus Norwalk (agente eziologico di gravissime epidemie di gastroenterite umana) (Mason *et al.*, 1996). In questo lavoro, gli autori verificano la capacità della proteina virale di auto-assemblarsi in VLP nella cellula vegetale ed inoltre ne valutano la capacità immunogenica in modelli murini. I risultati ottenuti evidenziano che l'immunizzazione orale con le VLP purificate da tabacco transgenico o la somministrazione di una quantità di tubero contenente la stessa concentrazione di VLP è in grado di stimolare la produzione di anticorpi specifici sia sierici che mucosali (Mason *et al.*, 1996). Anche in questo caso la sperimentazione clinica umana ha confermato i dati ottenuti in modelli murini (Tacket *et al.*, 2000). Tutti i lavori riportati sono basati sull'utilizzo di piante transgeniche, che come accennato in precedenza hanno lo svantaggio di richiedere tempi lunghi senza garantire un buon livello di produzione dell'antigene. Per queste ragioni, recentemente gli stessi gruppi di ricerca hanno utilizzato sistemi di espressione transiente basati sulla scomposizione di genomi virali (Santi *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009).

Diversi laboratori hanno prodotto la proteina L1 del papilloma virus umano (HPV L1) in pianta. Il gruppo di Mason ha sperimentato l'espressione in tuberi di patate transgeniche (Warzecha *et al.*, 2003), il gruppo di Rybicki in piante transgeniche di *N. tabacum* cv. Xanthi (Varsani *et al.*, 2003), ed il gruppo di Müller ha espresso L1 sia in piante di tabacco che in *Solanum tuberosum* (*S. tuberosum*) (Biemelt *et al.*, 2003). Immunizzazioni orali di modelli murini hanno dimostrato che le VLP di HPV prodotte in patate transgeniche sono immunogeniche (Warzecha *et al.*, 2003; Biemelt *et al.*, 2003). Nel 2007 il gruppo di Rybicki riesce in un sostanziale aumento dell'espressione utilizzando un sistema di espressione transiente mediato da *A. tumefaciens* in piante di *N. benthamiana*. Queste VLP si sono rivelate altamente immunogeniche, elicitando un alto titolo di anticorpi neutralizzanti (Maclean *et al.*, 2007). Nel 2008 due gruppi esprimono L1 in cloroplasti di

tabacco (Fernández-San Millán *et al.*, 2008) (Lenzi *et al.*, 2008). Questi lavori rappresentano i primi esempi di VLP prodotte per via transplastomica.

Un altro importante esempio è rappresentato dalla produzione di VLP del virus dell'influenza in pianta, ad opera di un'azienda canadese, la Medicago. In questo lavoro, la sequenza codificante l'emoagglutinina virale (HA) derivante da 2 ceppi diversi (H5N1 e H1N1) è stata espressa, per via transiente, in piante di *N. benthamiana*. Entrambe gli antigeni H5 e H1 si accumulano ad alti livelli nelle foglie di piante agroinfiltrate (D'Aoust *et al.*, 2008). Studi immunologici, per valutare il potenziale di queste particelle nell'induzione di una risposta immunitaria, sono stati effettuati sia in topi che in furetti. In seguito la Medicago ha ottenuto l'autorizzazione da parte della sanità canadese ad iniziare la fase di sperimentazione clinica su 48 volontari umani (ancora in atto) e ha portato la produzione delle VLP su larga scala (D'Aoust *et al.*, 2010) utilizzando il sistema di espressione CPMV-HT) (Sainsbury *et al.*, 2008).

Recentemente si è tentato di produrre in pianta anche VLP del virus HIV-1 utilizzando un precursore poliproteico Pr55^{gag}, che forma il complesso maggiore di proteine strutturali, ben conservato attraverso differenti sottotipi di HIV-1 (Freed, 1998). In un primo tentativo, utilizzando la tecnica di trasformazione nucleare sia stabile che transiente, sono stati ottenuti bassi livelli di espressione di Pr55^{gag} (Meyers *et al.*, 2008). Una resa maggiore è stata conseguita, dagli stessi autori, ricorrendo alla trasformazione transiente del cloroplasto utilizzando un gene codificante per una Gag tronca (P17-P24). Anche se la proteina P17-P24 non è risultata immunogenica in modelli murini, è stata in grado di evocare risposte cellulari e umorali in topi precedentemente trattati con un vaccino Gag a DNA (Meyers *et al.*, 2008). In seguito, Scotti e collaboratori, sulla base di esperimenti preliminari effettuati utilizzando un sistema di espressione transiente mediato da *A. tumefaciens*, hanno prodotto piante transgeniche stabili che esprimono Pr55^{gag} nel cloroplasto. Analisi al microscopio elettronico hanno dimostrato che le proteine Gag sono in grado di assemblare in VLP (Scotti *et al.*, 2009). Le VLP Pr55^{Gag} prodotte in pianta hanno mostrato immunogenicità considerevole nei topi vaccinati per via intraperitoneale (Scotti *et al.*, 2010). Gli esempi riportati e molti altri lavori elencati nella Tabella 1, dimostrano che le cellule vegetali sono in grado di offrire l'ambiente ideale per la formazione di VLP.

2.3 VLP chimeriche derivate da virus vegetali

Nel corso degli anni sono stati pubblicati molti lavori riguardo la capacità delle proteine di rivestimento di virus vegetali come *carrier* di peptidi immunigenici (Komarova *et al.*, 2010). Le particelle virali chimeriche (*Chimeric Virus Particle CVP*) così generate sono virus geneticamente modificati che mantengono la capacità di replicarsi e di infettare tessuto vegetale in maniera del tutto analoga alla controparte selvatica. Queste caratteristiche pongono dei problemi di bio-sicurezza, a partire dalla remota possibile mutazione delle CVP a patogeni umani, fino ad arrivare a problemi come la loro dispersione nell'ambiente.

Da tempo è stato dimostrato che in maniera analoga a quanto già evidenziato per i virus animali, alcune CP di virus vegetali sono in grado di autoassemblare in VLP, non solo in cellule vegetali, ma anche in quelle animali e batteriche. Inoltre, negli ultimi anni sono stati pubblicati un certo numero di lavori (Tabella 2) in cui è stata dimostrata la validità dell'uso di proteine strutturali di virus vegetali per la produzione di VLP chimeriche. Questa nuova applicazione rappresenta senza dubbio una strategia promettente e sicura per la produzione di vaccini peptidici.

Nei paragrafi successivi saranno trattati separatamente gli esempi di VLP chimeriche di virus vegetali, sulla base delle caratteristiche strutturali (bastoncellari, filamentosi ed icosaedrici) dei virus vegetali utilizzati (Figura 5).

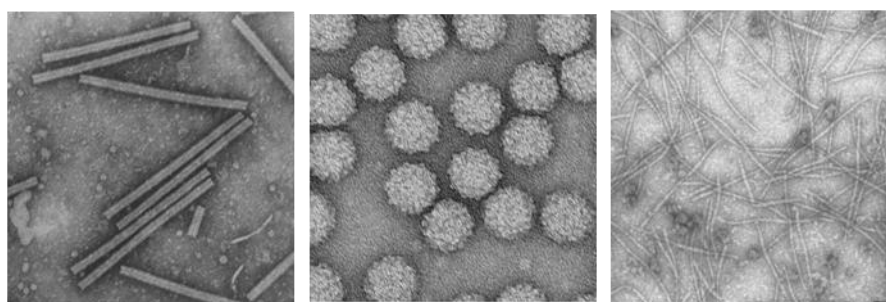


Figura 5 Foto al microscopio elettronico di virus vegetali con diversa simmetria. A) Virus del mosaico del tabacco TMV, virus filamentoso. B) virus del mosaico dell'Arricciamento maculato del carciofo, virus icosaedrico. C) virus X della patata PVX, virus filamentoso (Lico *et al.*, risultati non pubblicati).

2.3.1 VLP chimeriche da virus vegetali icosaedrici

Il primo studio è stato condotto utilizzando la CP del CMV, virus icosaedrico appartenente al genere *Cucumovirus*, famiglia *Bromoviridae*. VLP chimeriche che espongono epitopi neutralizzanti derivati dal virus della malattia di Newcastle (agente eziologico di

un'importante patologia che colpisce uccelli domestici e polli) sono state prodotte in piante di *N. benthamiana* (Natilla *et al.*, 2006). In particolare per la fusione alla CP del CMV sono stati presi in considerazione due epitopi neutralizzanti di NDV, di 17 aminoacidi (epitopo F) e 8 aminoacidi (epitopo HN) rispettivamente (Toyoda *et al.*, 1988; Chambers *et al.*, 1988). I due epitopi sono stati fusi tra loro (F-HN) e successivamente inseriti in un *loop* interno della CP. L'espressione della CP chimerica è stata ottenuta mediante il sistema transiente basato sull'uso di un vettore derivato dal PVX (Baulcumbe *et al.*, 1995). L'analisi al microscopio elettronico delle VLP prodotte ha evidenziato che le subunità proteiche chimeriche assemblano in singoli virioni morfologicamente simili e indistinguibili da particelle di CMV (Natilla *et al.*, 2006). Qualche anno dopo, lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato, che quelle stesse VLP purificate erano in grado di elicitare una risposta anticorpale specifica. In particolare, saggi immunologici condotti su polli domestici hanno dimostrato che le chimere esponenti l'epitopo HN del NDV stimolano, senza l'aggiunta di adiuvanti, la produzione di anticorpi specifici capaci di riconoscere virioni NDV (Natilla *et al.*, 2008).

Un altro esempio di VLP chimeriche derivate da un virus icosaedrico è quello riportato da Kumar e collaboratori nel 2009 (Kumar *et al.*, 2009), in cui la CP utilizzata è quella del TBSV, appartenente al genere *Tombusvirus*, famiglia *Tombusviridae*. In questo caso un epitopo di 16 aminoacidi della catena A della ricina (*ricin toxin A-chain* RTA), potente citotossina naturale, è stato fuso in posizione carbossi-terminale della CP e la proteina chimerica è stata espressa in cellule d'insetto (Kumar *et al.*, 2009). La proteina carrier utilizzata è stata deleta dei primi 52 aminoacidi (CPΔN52), poichè in un lavoro precedente era stato dimostrato che le VLP originate dalla forma deleta della CP del TBSV erano più stabili di quelle prodotte dall'intera CP (Hsu *et al.*, 2006). Studi al microscopio elettronico hanno rivelato il corretto assemblaggio delle VLP chimeriche e mediante esperimenti di criomicroscopia e ricostruzione di immagini è stata identificata la collocazione e l'orientamento spaziale dell'epitopo esogeno (Kumar *et al.*, 2009). Infine le VLP purificate sono state utilizzate in studi immunologici in modelli murini e l'analisi dei sieri ha evidenziato la produzione di anticorpi specifici contro l'epitopo di interesse, dimostrando così l'efficacia della piattaforma vaccinale rappresentata dalle VLP derivate dal TBSV (Kumar *et al.*, 2009).

Tabella 2. Esempi di particelle simil-virali chimeriche derivate da virus vegetali.

Virus vegetale	Antigene	Sistema di espressione	Referenza
CMV	NDV	<i>N.benthamiana</i>	Natilla <i>et al.</i> , 2006- Natilla <i>et al.</i> , 2008
TBSV	RTA	<i>S. frugiperda</i> (cellule di insetto)	Kumar <i>et al.</i> , 2009
PapMV	E2 (HCV)	<i>E. coli</i>	Denis <i>et al.</i> , 2007
	M2 e	<i>E. coli</i>	Denis <i>et al.</i> , 2008
	gp100, M1	<i>E. coli</i>	Leclerc <i>et al.</i> , 2007
	P33-LCMV	<i>E. coli</i>	Lacasse <i>et al.</i> , 2008

CMV: virus del mosaico del cetriolo; HCV: virus dell'epatite C; epitopo della gp100 del melanoma; LCMV: virus linfocitario choriomeningitis; MaMV: virus del mosaico della malva; M1,M2: epitopi del virus dell'influenza A; NDV: virus della malattia di Newcastle; PapMV: virus del mosaico della papaya; PPV: virus del vaiolo della prugna; PVX: virus X della patata; RTA: catena A della ricina; TBSV: virus del rachitismo cespuglioso del pomodoro.

2.3.2 VLP chimeriche da virus vegetali filamentosi

Studi eccellenti sono stati condotti sul PapMV, appartenente al genere *Potexvirus*, famiglia *Alphaflexiviridae*. In questo caso, le VLP chimeriche sono state ottenute mediante espressione della proteina virale in cellule batteriche. Il primo epitopo ad essere fuso, in posizione carbossi-terminale è stato l'E2 della glicoproteina dell'involucro esterno del virus dell'epatite C (Denis *et al.*, 2007). L'epitopo E2 è contenuto all'interno di una regione della glicoproteina virale, riconosciuta da tre anticorpi la cui funzione è fondamentale nell'impedire il legame dell'HCV al suo recettore sulle cellule umane (Lechner *et al.*, 1998). Studi immunologici condotti in modelli murini hanno mostrato che le VLP chimeriche sono in grado di stimolare una risposta umorale persistente contro l'epitopo HCV E2. Inoltre, per verificare che l'efficacia dell'antigene fosse dovuta alla sua struttura, un gruppo sperimentale di animali è stato trattato con la forma monomerica della CP chimerica. In questo caso, l'analisi dei sieri murini non ha rivelato alcun tipo di risposta immunitaria (Denis *et al.*, 2007). Riassumendo, in questo lavoro, per la prima volta, è stata valutata la funzione della struttura delle VLP derivate da un virus vegetale, nell'innescare una risposta umorale come già dimostrato per alcuni virus animali (Thanavala *et al.*, 1995; Kong *et al.*, 2001). In un secondo tempo, nello stesso laboratorio, sono state prodotte VLP (derivanti sempre dal PapMV) che espongono l'epitopo M2e appartenente alla proteina M2 del virus dell'influenza A. L'M2e è conservato in tutti i ceppi virali A e la proteina M2 in forma tetramerica forma un canale ionico di transmembrana che media la penetrazione del virus per endocitosi. In questo lavoro, i topi immunizzati con le VLP chimeriche (VLP-CP-M2e) sono stati sottoposti ad esperimenti di sfida (challenge) con il virus infuenzale. I risultati ottenuti hanno dimostrato che le VLP-CP-M2e sono in grado di stimolare protezione in assenza di adiuvanti, dimostrando la capacità di VLP derivate da un virus

vegetale di stimolare anche una risposta citotossica, oltre che una risposta anticorpale (Denis *et al.*, 2008).

Sempre utilizzando il PapMV, uno studio molto importante è stato effettuato da Leclerc nel 2007 allo scopo di produrre un vaccino antitumorale (Leclerc *et al.*, 2007). In questo caso, sono stati fusi alla CP due epitopi, il primo appartenente alla glicoproteina gp100 del melanoma ed il secondo della matrice M1 del virus dell'influenza. Le VLP prodotte in *E.coli*, sono state utilizzate in esperimenti su cellule umane in coltura. In particolare sono state utilizzate cellule che presentano l'antigene (*Antigen-Presenting Cells*, APC) che sono fondamentali nello stimolare la produzione di linfociti T e quindi una risposta citotossica. Gli autori dimostrano che le VLP chimeriche derivate dal PapMV sono in grado di stimolare l'espansione di linfociti T citotossici anche nell'uomo (Leclerc *et al.*, 2007).

Molti altri lavori che riguardano il PapMV e virus simili sono stati pubblicati (Tabella 2) ad ulteriore conferma della validità di questa piattaforma per la produzione di vaccini.

3. Il virus dell'Arricciamento maculato del carciofo

Il virus dell'arricciamento maculato del carciofo è un virus vegetale appartenente al genere dei *Tombusvirus*, famiglia *Tombusviridae* (Figura 6A). Il genoma è costituito da una singola molecola di RNA a polarità positiva (single strand RNA+) contenente 4776 nucleotidi codificanti per 5 schemi di lettura aperte (*Open Reading Frame* ORF) (Molinari *et al.*, 1998) (Figura 5B).

Per i membri del genere *Tombusvirus* la strategia di replicazione è basata sulla traduzione diretta dell'RNA genomico dei geni 5' prossimali (proteine di 33 e 92 kDa) che hanno funzione di RNA polimerasi RNA dipendente, e la traduzione dei geni a valle attraverso la formazione di due RNA sub-genomici (Figura 5B).

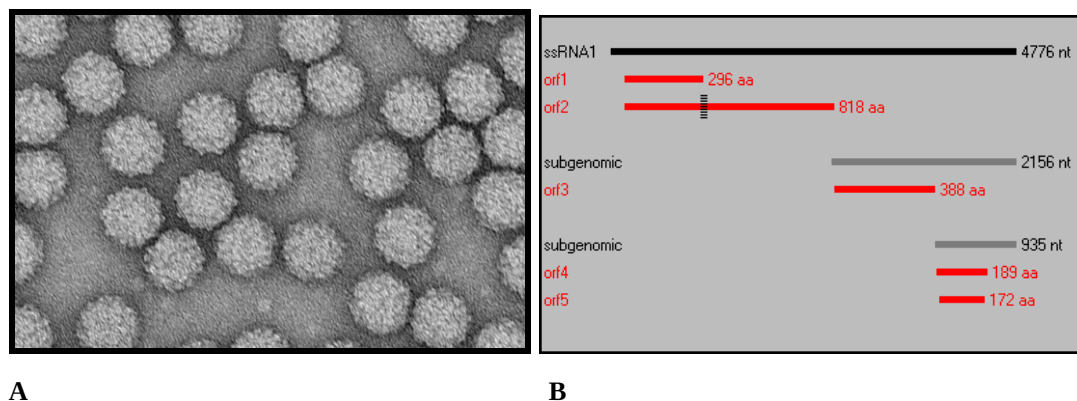


Figura 6. Il virus dell'Arricciamento Maculato del Carciofo.

A) Foto al microscopio elettronico particelle virali purificate; B) Rappresentazione schematica del genoma virale costituito da una singola molecola di RNA a polarità positiva (ssRNA1) contenente 4776 nucleotidi codificanti per 5 *open reading frame* (orf). orf1: codifica per un prodotto di 296 amminoacidi, la p33, una proteina di 33 kDa con funzione di polimerasi; orf2: codifica una proteina di circa 800 amminoacidi, la p92, una proteina di 92 kDa, prodotta a partire dal sito di anti-terminazione della orf1 e contiene dei motivi appartenenti alle RNA polimerasi RNA dipendente, le orf1 e 2, entrambe tradotte dall'RNA genomico, formano il complesso della RNA polimerasi virale; orf3: tradotta a partire dall'RNA subgenomico1 (*subgenomic* 2156) codifica per una proteina di circa 390 amminoacidi, la proteina del capsido di 41kDa; le orf 4 e 5 sono tradotte a partire da una seconda molecola di RNA subgenomico (*subgenomic* 935nt). La orf4 codifica per una proteina 189 amminoacidi, p21, proteina del movimento; la orf 5 codifica per una proteina di 172 amminoacidi, la p19, svolge la funzione di inibitore del silenziamento genico post-trascrizionale

La molecola di RNA che costituisce il genoma virale è racchiusa all'interno di particelle icosaedriche del diametro di 30 nm, formate dalla ripetizione di 180 volte la stessa proteina di rivestimento virale (CP).

Nei paragrafi successivi verranno trattate in dettaglio le caratteristiche strutturali dei *Tombusvirus* perchè l'obiettivo principale del lavoro di questa tesi ha riguardato l'ottenimento di VLP chimeriche derivate dal virus AMCV.

3.1 Struttura dei *Tombusvirus*

La proteina del capsido dei *Tombusvirus* presenta diversi domini strutturali: un dominio R (*Random*, R) interno, disordinato nella struttura, una regione a (*arm*) che connette R con il dominio S (*Shell*, S), il quale forma il rivestimento virale, ed infine il dominio P (*Protuding*, P) che protude dalla superficie (Figura 7A).

Il capsido è di tipo icosaedrico costituito da 180 subunità asimmetriche (rappresentate in Figura 7C dai triangoli neri che appaiono ingranditi nella 7B) ciascuna delle quali è costituita da tre molecole identiche di CP (indicate in Figura 7B con le lettere A, B, C). Le tre molecole di CP che formano la subunità asimmetrica sono definite semi-equivalenti poichè presentano tra loro delle differenze nella struttura secondaria dovuta all'interazione con la molecola di CP adiacente.

La struttura del TBSV determinata, per la prima volta da Stephen Harrison e suoi collaboratori dell'Università di Harvard (Harrison *et al.*, 1978, Olson *et al.*, 1983), viene presa come riferimento per le elaborazioni bioinformatiche di virus appartenenti alla stessa famiglia per i quali non sono ancora disponibili dati cristallografici. Questo virus, analogamente all'AMCV, è costituito da 180 subunità asimmetriche. La caratterizzazione della struttura del TBSV ha consentito di comprendere che durante l'assemblaggio della particella virale, la CP con conformazione A può interagire soltanto con una molecola di CP in conformazione B, e che CP di conformazione C possono interagire soltanto tra loro, dando luogo a due tipi di dimeri A/B e C/C (Figura 7C).

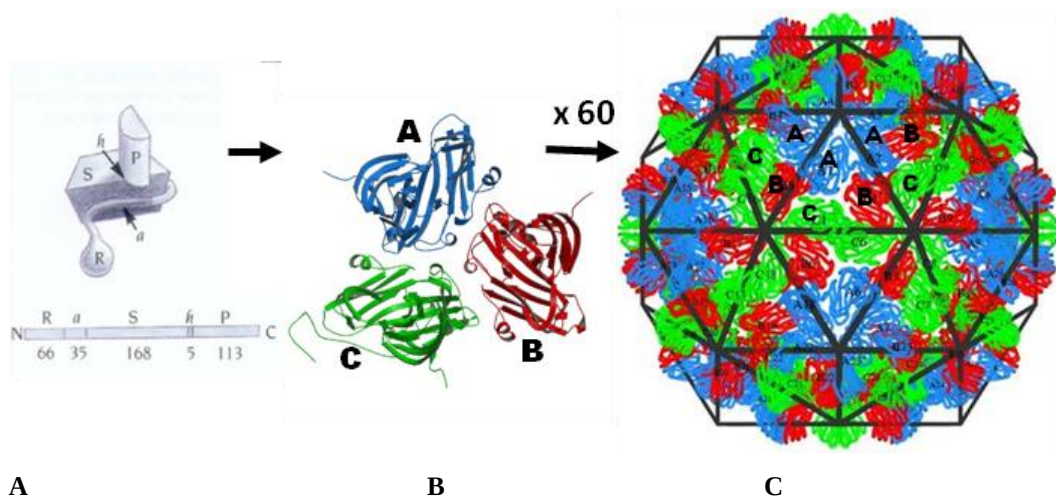


Figura 7. Struttura del virus icosaedrico TBSV

A) Domini strutturali della CP del TBSV: partendo dall'estremità N-terminale troviamo il dominio R (*Random*, R) interno, disordinato nella struttura che contiene siti di legame con l'RNA virale, una braccia (arm, a) che connette il dominio R con il dominio S (*Shell*, S), il quale forma il pavimento del capside virale, ed infine il dominio P (*Protruding*, P) che sporge verso l'esterno del capside; B) subunità asimmetrica: con A, B e C sono indicate le molecole quasiequivalenti di CP; C) Virione: 60 ripetizioni della subunità asimmetrica formano la particella virale icosaedrica completa. (Adattato da Kakani *et al.*, 2001)

4. Elaborazione di modelli *in silico* di virus vegetali

Un' accurata conoscenza delle interazioni proteina-proteina, alla base dell'assemblaggio del capside, è di cruciale importanza qualora si voglia procedere a modifiche genetiche per l'inserimento di sequenze eterologhe. In tal senso una buona progettazione di VLP chimeriche dovrebbe avvalersi di un approccio predittivo che in campo computazionale è noto come "structure-based design" in grado di fornire metodi rapidi e razionali per selezionare le posizioni sulla superficie della CP adatte per l'inserimento di uno o più epitopi senza incidere sull'autoassemblaggio e la stabilità della particella virale.

Un simile approccio si basa sulla conoscenza della struttura tridimensionale, a partire dalla quale, è possibile analizzare, mediante meccanica molecolare e calcoli elettrostatici (Reddy *et al.*, 1998), le interazioni covalenti e non, tra le diverse associazioni proteina-proteina cruciali per il corretto assemblaggio virale. Per questo tipo di studi la conoscenza della struttura terziaria della CP riveste un'importanza fondamentale. Alcune delle strutture proteiche del capsido dei virus vegetali icosaedrici sono state ottenute mediante cristallografia a raggi X. Come già accennato nel precedente paragrafo, Stephen Harrison e suoi collaboratori dell'Università di Harvard, hanno per primi determinato la struttura T=3 della subunità proteica del TBSV (Harrison *et al.*, 1978). Tuttavia non per tutti i virus vegetali è stata determinata la struttura cristallografica ad alta risoluzione. Qualora non si disponga di questo tipo di dati, si può procedere alla predizione della struttura terziaria della proteina partendo dalla sua sequenza amminoacidica. Una delle strategie per la determinazione della struttura terziaria di una proteina è la realizzazione di un modello per omologia utilizzando come template una proteina la cui struttura cristallografica è nota (*homology modeling*). Il termine omologia è utilizzato in un contesto biologico per definire la somiglianza basandosi su comuni fattori genetici: due proteine sono omologhe se i loro geni si sono evoluti da un gene ancestrale comune. Proteine omologhe sono riconosciute in base ad una somiglianza staticamente significativa nella loro sequenza amminoacidica. Se siamo interessati al modello tridimensionale di una proteina (proteina *target*), la prima operazione che dobbiamo compiere è di verificare se esiste una proteina di struttura nota (proteina template) che abbia una sequenza amminoacidica simile a quella della proteina *target*. Ci si aspetta che due proteine omologhe, cioè derivanti da uno stesso progenitore per un processo evolutivo, abbiano struttura simile, in quanto durante l'evoluzione sono accettate e trasmesse solo mutazioni che non distruggono la funzione, e quindi la struttura di una proteina. Le sequenze di due proteine omologhe saranno simili, in quanto derivanti da un progenitore comune. Ne consegue che la similarità di due sequenze è un'indicazione della loro omologia e quindi della loro similarità strutturale. In pratica esiste una relazione tra similarità di due sequenze proteiche e la somiglianza tra le rispettive strutture tridimensionali ed è ampiamente dimostrato che la similarità tra le strutture delle catene principali aumenta in maniera predicibile all'aumentare della similarità della sequenza amminoacidica.

Nel *modeling* per omologia, è possibile valutare a priori l'affidabilità del modello che dipende, fondamentalmente, dalla similarità di sequenza tra la proteina "target" e quella del

templato, e quindi è possibile decidere a priori se il modello sarà sufficientemente affidabile per lo scopo per cui si intende usarlo.

5. Fattori che regolano la stabilità dei virioni

5.1 Ruolo strutturale e funzionale dell'RNA

Lo studio del ruolo dell'RNA genomico nell'assemblaggio dei virioni è ad oggi oggetto di numerosi studi. Infatti, nonostante gli enormi progressi nella determinazione ad alta risoluzione (mediante la cristallografia) della struttura di molti virus vegetali, il ruolo strutturale dell'RNA ed in particolare i dettagli molecolari delle interazioni RNA-CP non sono stati ancora pienamente chiariti. L'utilizzo di tecniche sperimentali, come la cristallografia elettronica ad alta risoluzione, hanno permesso la descrizione accurata della struttura e la funzione delle proteine capsidiche ma l'informazione riguardante la componente degli acidi nucleici è molto più difficile da ottenere. Tuttavia esistono esempi di virus per i quali è stata ottenuta parte della struttura cristallografica dei genomi ad alta o moderata risoluzione (Chen *et al.*, 1989, Larson *et al.*, 1993, Larson *et al.*, 2005). Inoltre, studi di biochimica e genetica hanno fatto luce sull'importanza della formazione di complessi ribonucleoproteici per avviare il processo di assemblaggio. Un lavoro molto interessante che correla l'assemblaggio delle proteine di rivestimento virali e l'RNA per la formazione di capsidi icosaedrici è stato condotto durante gli anni ottanta dal gruppo di Sorger dell'Università di Harvard (Sorger *et al.*, 1986). Nello studio è stato effettuato il disassemblaggio di virioni purificati del TCV, in condizioni di pH basico ed alta forza ionica. I prodotti di questa dissociazione sono stati dimeri liberi della proteina di rivestimento virale (CP), dei complessi ribonucleoproteici (RP, ciascuno dei quali è costituito da RNA e sei subunità di CP) ed infine un'altra specie proteica meno rappresentata, chiamata dagli autori p80 (dimero formato da due proteine del rivestimento virale legate in maniera covalente). Una volta separate le varie frazioni, il riassemblaggio del TCV è stato realizzato in condizioni fisiologiche per il virus (tampone sodio acetato pH6) sia a partire da CP e complessi RP che da CP ed RNA libero. L'analisi al microscopio elettronico ha evidenziato che l'assemblaggio procede come una crescita continua del rivestimento virale da una struttura iniziale, piuttosto che dalla formazione di intermedi distinti e gli autori ipotizzano che il complesso-RP possa funzionare come un sorta di nucleo di primario assemblaggio (Sorger *et al.*, 1986).

Alcuni gruppi di ricerca si sono occupati di studiare l'eventuale regione di interazione tra RNA e CP. Nei virus vegetali icosaedrici la struttura della CP possiede un dominio N-

terminale, chiamato R, rivolto verso l'interno del capsido virale (Figura 7A) e caratterizzato dalla presenza di un'alta percentuale di aminoacidi basici. Questo dominio basico è stato dimostrato essere responsabile dell'interazione con l'RNA virale.

Un lavoro a sostegno dell'importanza del dominio basico della CP è stato effettuato da Bernard Michels sul TYMV *tymovirus* della famiglia delle *Tymoviridae*, il cui capsido è composto di 180 copie di un singolo tipo di proteina di rivestimento che forma una struttura icosaedrica (Michels *et al.*, 1999). Nello studio riportato sono stati generati mutanti per delezione della CP in cui sono stati eliminati porzioni differenti del dominio N-terminale. I risultati hanno evidenziato che rimuovendo soltanto una parte dei residui basici l'assemblaggio avviene ma i virioni presentano una eterogeneità di struttura che va da una struttura irregolare al tipico icosaedro (Michels *et al.*, 1999).

Studi simili sono stati condotti anche sui *Tombusvirus*, in particolare sul TBSV. Nel 2006 è stato pubblicato un lavoro sulla produzione di VLP del TBSV in cellule di insetto. Negli esperimenti oltre l'intera sequenza della CP, per la produzione delle VLP vengono utilizzati mutanti per delezione della regione basica del dominio R (Hsu *et al.*, 2006). Delezioni progressive del dominio R della CP danno vita a strutture più piccole fino ad arrivare al mancato assemblaggio, evidenziando anche in questo caso che per la corretta formazione di VLP è necessario parte del dominio R, in particolare sembra che debba essere mantenuta almeno una sequenza di 7 amminoacidi basici.

5.2 Effetto di pH, forza ionica e ioni divalenti sull'assemblaggio delle particelle virali

Diversi studi hanno determinato l'importanza di altri fattori, oltre l'RNA, nella formazione del capsido virale. La struttura quaternaria di alcuni virus vegetali può andare incontro a cambiamenti conformazionali, che comportano un'espansione (swelling) del virione, quando vengono rimossi gli ioni divalenti o aumentato il pH (Liu *et al.*, 2003, Oda *et al.*, 2000). In questo campo uno dei virus più studiati è il CCMV, che è stabile a pH 5, ma subisce un'espansione radiale del 10% quando il valore di pH è aumentato fino a 7.0 o in assenza di cationi bivalenti (Perez *et al.*, 2000, Tama and Brooks, 2002). Questa espansione, che si ritiene dar luogo ad un intermedio conformazionale durante l'infezione, causa la comparsa di 60 cavità sulla superficie del capsido virale. Molti virus vegetali, compresi il TBSV (Olson *et al.*, 1983) e il TCV (Sorger *et al.*, 1986), mostrano proprietà simili. Particelle di CCMV si dissociano a rilasciare RNA virale ad un pH superiore a 7.0, così da fornire un meccanismo semplice per separare l'acido nucleico virale dalla sua proteina di rivestimento (CP) (Fox *et al.*, 1998). Inoltre, il disassemblaggio del virione

sembra essere reversibile in specifiche condizioni in vitro. Ad esempio, può essere riassemblato, in vitro, a partire da RNA e CP a pH 7.0 (Zhao *et al.*, 1995). In assenza di RNA virale, la CP può formare particelle simil-virali vuote a pH 5 (Bancroft *et al.*, 1968). Sia il virus contenente RNA che la VLP vuota assemblati in vitro sono strutturalmente identici al capsido del virus nativo (Fox *et al.*, 1998). Il CCMV costituisce un sistema modello per gli studi di assemblaggio-disassemblaggio virale, dato che è stato il primo virus sferico ad essere riassemblato in vitro in una forma infettiva, a partire dai suoi componenti (CP ed RNA) purificati (Bancroft and Hiebert, 1967, Hiebert and Bancroft, 1969, Bancroft *et al.*, 1968, 1969, Hiebert *et al.*, 1968). Più recentemente, il CCMV è stato studiato in vitro come sistema modello per ottenere una migliore comprensione delle interazioni proteina-proteina e proteina-RNA che regolano il disassemblaggio e il riassemblaggio e la stabilità del virus (Zhao *et al.*, 1995, Fox *et al.*, 1998, Douglas and Young, 1998).

5.3 Studio della stabilità virale e applicazioni in campo biotecnologico

La comprensione dei meccanismi (interazione RNA- proteina, pH, forza ionica e cationi divalenti) che regolano l'assemblaggio dei virus vegetali e ne influenzano la stabilità costituisce un campo di ricerca aperto, che si potrebbe rivelare fondamentale per poter sfruttare a pieno le potenzialità di queste nanoparticelle. Ad esempio, l'assemblaggio e il disassemblaggio *in vitro* per la formazione di VLP potrebbe essere sfruttato per la creazione di potenziali “contenitori” per *drug-delivery* o terapia genica oltre che come sistema di presentazione di antigeni eterologhi (Grasso *et al.*, 2010).

Tutti i virus impacchettano e trasportano acido nucleico virale e come tali potrebbero essere trasformati in contenitori da poter caricare con una vasta gamma di molecole sintetiche (Young *et al.*, 2008). Le subunità di CP possono essere manipolate geneticamente, chimicamente, o entrambi senza influenzare l'architettura complessiva del virione, dando origine ad un nuovo sistema per il trasporto di molecole farmaceutiche. La cavità interna dei virus vegetali fornisce un ambiente ideale per veicolare nanomateriali all'interno del corpo umano (Figura 8) (Young *et al.*, 2008). Concettualmente, possono essere presi in considerazione due diversi approcci per intrappolare molecole ospiti all'interno del capsido. In un approccio, le molecole ospiti sono intrappolate durante il processo di assemblaggio del capsido. Nel secondo approccio, la molecola di interesse è intrappolata nel capsido già assemblato (Young *et al.*, 2008). Esistono in letteratura lavori in cui CP di virus vegetali si sono mostrate capaci di incapsulare molecole estranee, in

particolare è stato dimostrato che VLP vuote derivate dal CCMV siano in grado di incapsulare in vitro anioni organici. Osservazioni al microscopio elettronico hanno dimostrato che queste VLP derivate dal CCMV hanno le stesse dimensioni del CCMV nativo (Douglas and Young, 1998). Un altro studio riguarda VLP derivate da HCRSV (Ren *et al.*, 2006). In questo studio si è tentato di sviluppare metodi per rimuovere l'RNA virale nativo dal capsido per riassemblare VLP in vitro a partire da CP purificate per valutare la capacità di queste particelle di accogliere composti esogeni di diversa massa molecolare, utilizzabili in particolare per il *delivery* di farmaci costituiti da molecole anioniche.

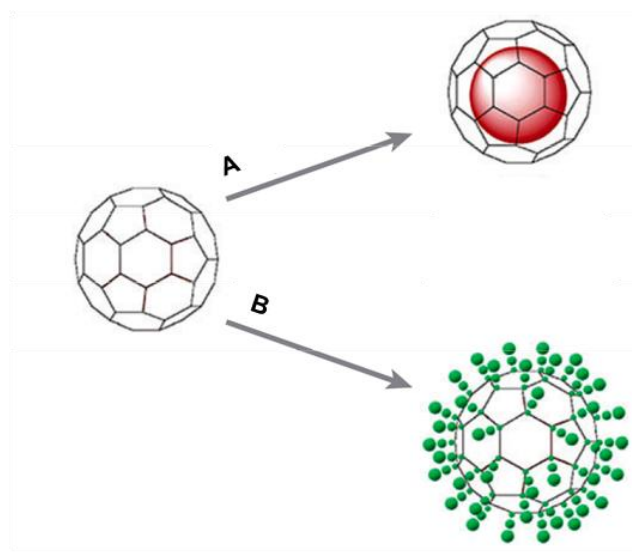


Figura 8. Rappresentazione schematica dei possibili utilizzi del capsido di virus vegetali icosaedrici. La CP può essere ingegnerizzata senza alterare la sua capacità di autoassemblarsi in VLP per formare contenitori (A) o per esporre epitopi immunogenici (B). (modificato da Young *et al.*, 2008).

6. Il virus dell'immunodeficienza umana, HIV

L'HIV è un lentivirus della famiglia Retroviridae, conosciuto soprattutto per essere l'agente eziologico della Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (*Acquired Immune Deficiency Syndrome AIDS*) (Levy *et al.*, 2007). Questo virus ha un diametro di circa 100-150 nm. La superficie glicopeptidica, denominata envelope, racchiude un nucleocapside contenente materiale genetico in forma di RNA codificante 9 geni. 3 di questi geni sono fondamentali per la replicazione (Gag, Pol, Env) e gli altri 6, cosiddetti accessori, sono coinvolti sia nella regolazione del ciclo replicativo (Tat e Rev) che nell'infettività dei virioni (Vif, Vpu, Nef, Vpr). Le due glicoproteine presenti nella membrana esterna del virus, gp120 e gp41, responsabili del riconoscimento del recettore CD4 e i co-recettori CCR5 o CXCR4 sulla membrana della cellula ospite, sono codificate da Env. Le cellule umane che esprimono i recettori di superficie CD4 possono essere

infettate dall'HIV. Queste cellule includono i macrofagi, i linfociti T e le cellule dendritiche (Haase *et al.*, 1999). Al fine di infettare, la cellula bersaglio la membrana dell'HIV deve interagire con la membrana di questa cellula attraverso l'interazione della gp120 con il recettore sulla superficie cellulare CD4 (Figura 9). Una volta che questo legame è stabilito, la gp120 subisce un cambiamento conformazionale che facilita il suo legame con una delle due molecole corecettore delle chemochine, CCR5 o CXCR4 (Levy *et al.*, 2007) (Figura 9).

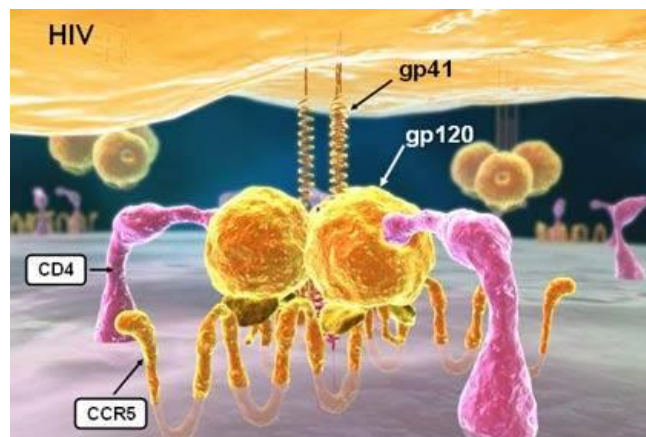


Figura 9. Rappresentazione grafica del contatto tra il virus HIV e la cellula “target”.

L'interazione tra la gp120 ed il recettore CD4 facilita il successivo legame anche con i corecettori CCR5 o CXCR4. L'interazione successiva con la gp41 è fondamentale perché avvenga la fusione tra il virus e la membrana cellulare. (<http://www.stanford.edu/~rabriggs/hiv/hiv.html>)

L'interazione con i recettori CD4 è importante perché il virus possa legarsi alla membrana della cellula bersaglio, ma l'interazione successiva con la gp41 è fondamentale perché avvenga la fusione tra l'involucro virale e la membrana cellulare. Nelle fasi successive dell'infezione, il nucleo contenente RNA virale, la trascrittasi inversa e l'integrasi sono liberati all'interno del citoplasma cellulare. L'RNA virale è trascritto in DNA dalla trascrittasi inversa virale e migra verso il nucleo della cellula, dove viene inserito nel DNA cromosomico della cellula ospite dall'integrasi virale. A questo punto l'infezione è irreversibile, essendo la cellula ora in grado di produrre virioni (Levy *et al.*, 2007). Dopo il processo di infezione iniziale segue una fase di infezione acuta (Simon *et al.*, 2006; Mehendru *et al.*, 2004), durante la quale c'è un alto rischio di trasmissione (Quinn *et al.*, 2000). Successivamente i livelli di virus diminuiscono ma non si esauriscono del tutto, con conseguente latenza clinica e infezioni asintomatiche (Pilcher *et al.*, 2004). Questo stato

può evolvere verso una fase sintomatica clinica (di solito diversi anni dopo la fase iniziale di infezione), designato da AIDS, caratterizzato da diminuzione dei linfociti T CD4 positivi e l'aumento della carica virale (Levy *et al.*, 2007). La variabilità genetica cui va incontro il virus durante l'infezione rappresenta un vero e proprio collo di bottiglia della ricerca di un vaccino efficace, poichè gli anticorpi neutralizzanti generati in seguito al primo contatto del virus con il sistema immunitario non sono in grado di legarsi alla successiva generazione di virioni (Lackner *et al.*, 2007).

6.1 Sviluppo di un vaccino contro l'HIV-1

La realizzazione di un vaccino anti-HIV rappresenta un obiettivo prioritario della ricerca sull'AIDS. Una vasta serie di evidenze suggerisce che sia una risposta umorale che cellulomediata debba essere attivata per conferire immunità al virus. Le difficoltà incontrate nel mettere a punto un vaccino tradizionale, basato su virus inattivati o attenuati, ha spinto ad incentrare gli sforzi per l'ottenimento di vaccini ricombinanti a subunità (Whitney and Ruprecht 2004). In particolar modo sono in corso studi per la produzione di vaccini multicomponente comprendenti sia proteine strutturali (gp41 e gp120) che regolatorie (Nef, Tat), in grado di stimolare una risposta immunitaria efficace. Inoltre, il tipo di trasmissione prevalentemente sessuale dell'infezione mette in luce un altro aspetto fondamentale nella formulazione di un vaccino, e cioè la necessità di indurre immunità a livello mucosale. I risultati della fase III della sperimentazione clinica in cui è prevista la somministrazione di un vaccino sperimentale multi componente (composto dalle proteine gp120, Gag, Pol e Nef) ha portato a risultati promettenti (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009).

Tra le proteine strutturali, un grande interesse è rivolto alle glicoproteine di membrana gp120 e gp41. Entrambe possiedono epitopi riconosciuti da anticorpi neutralizzanti (in grado di indurre la produzione di anticorpi neutralizzanti) altamente conservati in numerosi isolati primari (Figura 10) (Moore *et al.*, 2001). Tali epitopi sono stati oggetto di numerosi studi volti all'ottenimento di particelle virali chimeriche derivate da virus vegetali.

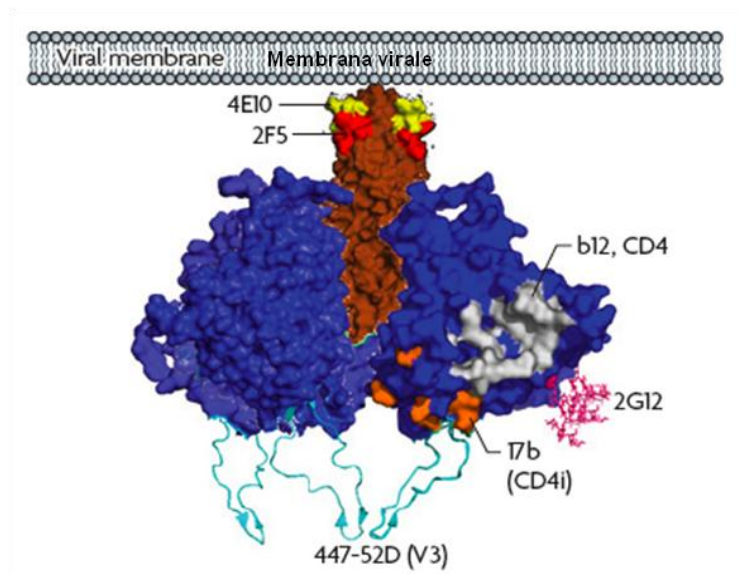


Figura 10. Modello bioinformatico che illustra il complesso formato dalle glicoproteine di membrana gp120 e gp41 del virus HIV-1. In figura sono riportate la localizzazione ed il nome degli epitopi neutralizzanti 2G12 , b12 , CD4i (CD4-induced), V3 della gp120 (viola) e (2F5 e 4E10) della gp41 (marrone). Gli epitopi 2F5 e 4E10 sono localizzati nella regione prossimale esterna della gp41. (Karlsson Hedestam *et al.*, 2008).

Nel 1997 un peptide di 13 aminoacidi, derivato dal loop V3 di HIV-1 (Figura10), è stato fuso in posizione C-terminale alla CP del TBSV (Joelson *et al.*, 1997). Il loop V3 è una regione molto estesa di circa 40 amminoacidi (la lunghezza è variabile a seconda dell'isolato di HIV utilizzato) (Stanfield *et al.*, 2003), ma è noto che la sequenza “core” in grado di stimolare una risposta immunitaria neutralizzante può essere ristretta ad un frammento di 13-14 residui, la cui sequenza varia leggermente tra ceppi diversi di HIV-1 (Huang *et al.*, 2005). L'architettura del TBSV ha consentito il “display” della sequenza esogena con produzione di virus chimerici in grado di replicarsi ad un livello simile alle particelle virali di tipo selvatico. Inoltre, in studi immunologici, i virus chimerici purificati hanno stimolato, in topi, la produzione di anticorpi specifici contro l'epitopo V3 (Joelson *et al.*, 1997). In un altro lavoro è stato utilizzato il CPMV come *carrier* di un peptide di 22 amminoacidi della proteina transmembrana gp41. L'immunizzazione di modelli murini sia per via orale che intranasale ha stimolato una forte risposta anticorpale (Durrani *et al.*, 1998). Nel 2001, Marusic e collaboratori hanno fuso l'epitopo 2F5 della gp41 all'estremità N-terminale della CP del PVX (Marusic *et al.*, 2001). Il 2F5 è un epitopo di 6 amminoacidi (ELDKWA), situato nella regione prossimale della glicoproteina di membrana gp41 (Figura 10) (Muster *et al.*, 1993) ed è riconosciuto dall'anticorpo monoclonale umano neutralizzante 2F5 (Purtsher *et al.*, 1994). L'immunizzazione di topi, sia per via nasale che intraperitoneale, con particelle chimeriche virali PVX-2F5 ha stimolato una forte risposta

umorale con produzione di immunoglobuline di tipo IgA, fondamentali per la difesa a livello delle mucose, senza l'aggiunta di adiuvanti. Inoltre, nello stesso lavoro è stata dimostrata la capacità neutralizzante *in vitro* sia degli anticorpi murini che di anticorpi umani ottenuti immunizzando topi hu-PBL-SCID (modello murino uomo-topo) (Marusic *et al.*, 2001).

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Ceppi batterici

Escherichia coli

Ceppo XL1-Blue, genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsd R17 SupE44 relA1 lac* [F' *pro AB lacIq ZΔM15 Tn10 (tetR)*], resistente alla tetraciclina. Mantenuto congelato a -80°C in terreno selettivo Luria-Bertani (LB), contenente glicerolo al 20% e tetraciclina (10 µg/ml). Coltivato in piastre di Petri in terreno solido LB/agar o in LB brodo. La temperatura di crescita utilizzata è di 37°C.

Agrobacterium tumefaciens

Ceppo LBA4404: (Hoekema *et al.*, 1983). Mantenuto congelato a -80°C in terreno selettivo Luria-Bertani (LB) contenente glicerolo al 20% e rifampicina (50 µg/ml).

Ceppo GV3101: VirG⁺ Rif^r pMP90 (Gmr). Mantenuto congelato a -80°C in terreno (LB) selettivo contenente glicerolo al 20%, rifampicina (50 µg/ml) e gentamicina (50 µg/ml).

I ceppi di *A. tumefaciens* sono stati coltivati in piastre di Petri su terreno selettivo solido LB/agar o in LB brodo. La temperatura di crescita è di 28°C.

2.2 Vettori utilizzati

2.2.1 Vettori utilizzati per la realizzazione dei costrutti

pGEM-NOS

Il plasmide pGEM-Nos (Figura 11) è stato derivato dal vettore commerciale pGEM[®]-4Z (Promega Corporation), le sue caratteristiche principali sono:

- la selezione veloce dei cloni ricombinanti attraverso lo *screening* blu / bianco (*lac Z*);
- un sito multiplo di clonaggio (MCS);
- i promotori SP6 e T7 della RNA polimerasi utili per la trascrizione *in vitro*;
- il gene per la resistenza all'ampicillina (Amp^R);
- il terminatore della nopalina sintasi di *A. tumefaciens* (Nos).

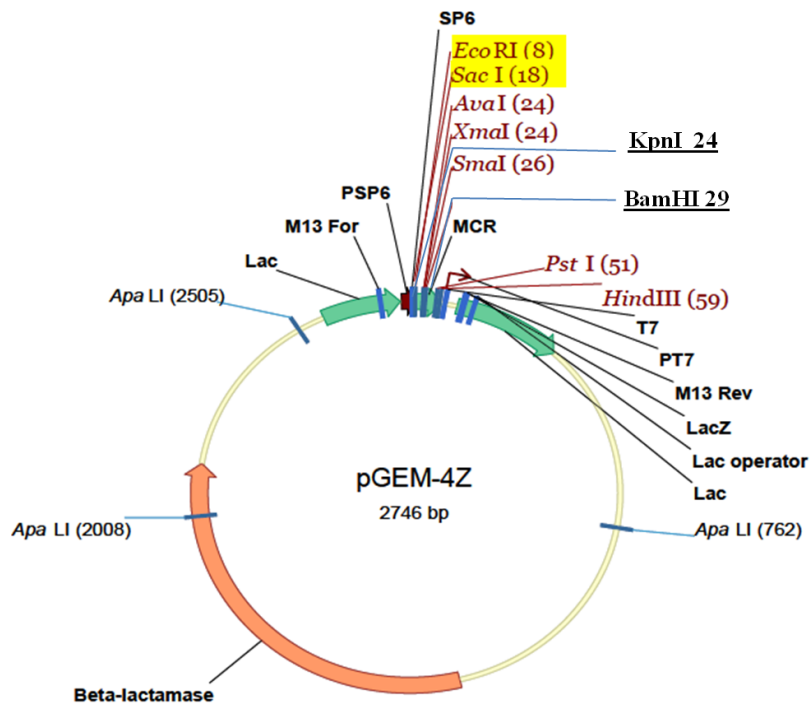


Figura 11. Vettore pGEM-4Z.

Sono sottolineati i siti *BamHI-KpnI*, utilizzati per inserire la sequenza della CP di AMCV ed ottenere il plasmide pGEM-Nos-CP (paragrafo 2.4.19). Sono evidenziati in giallo i siti di restrizione *EcoRI-SacI*, utilizzati per inserire la sequenza di terminazione del gene della nopalina sintasi, Nos, ed ottenere il plasmide pGEM-Nos. Tali siti sono stati utilizzati per la realizzazione dei costrutti CP chimerici (paragrafo 2.4.20).

pBIΩ-Nef

Il vettore binario pBIΩ-Nef (Figura 12) è stato ottenuto mediante modificazione del vettore commerciale pBI121 (Clontech laboratories, USA), caratterizzato dalla presenza, tra le regioni *borders* (LB e RB), di una cassetta di espressione appositamente configurata per favorire l'integrazione e l'espressione della sequenza eterologa all'interno del genoma della pianta ospite. Partendo dall'estremità 5' la cassetta comprende i seguenti elementi:

- il promotore del gene *Nos* codificante la Nopalina Sintasi di *A. tumefaciens* (Depicker *et al.*, 1982);
- la sequenza del gene *nptII* codificante la Neomicina Fosfotransferasi II (Beck *et al.*, 1982) che conferisce resistenza alla kanamicina;
- il promotore costitutivo forte 35S del Virus del Mosaico del Cavolfiore (*Cauliflower Mosaic Virus*, CaMV) (Guilley *et al.*, 1982);

- la sequenza Ω 5' leader del TMV che funziona come *enhancer* traduzionale (Gallie *et al.*, 2002);
- la sequenza codificante il gene Nef;
- la sequenza terminatrice del gene *nos*.

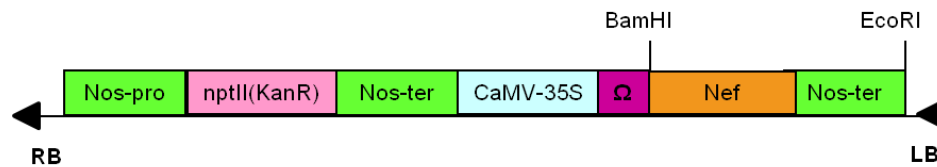


Figura 12. Rappresentazione schematica della cassetta di espressione del vettore pBIΩ-Nef.

RB e LB: bordo destro e bordo sinistro della regione trasponibile; Nos-pro e Nos-ter: rispettivamente promotore e terminatore del gene per la nopalina sintasi; nptII: gene codificante per la neomicina fosfotransferasi, che conferisce resistenza alla kanamicina (KanR); Ω : enhancer traduzionale del TMV; CaMV-35S: promotore 35S del CaMV. I siti di restrizione *BamHI-EcoRI* sono stati utilizzati per la rimozione del frammento Nef -Nos-ter ed il clonaggio delle sequenze di interesse.

Sistema magnICON^R

Il sistema per l'espressione in pianta messo a punto dalla ICON Genetics è basato sulla scomposizione del genoma del TMV (Figura 13) (Marillonet *et al.*, 2004; Marillonet *et al.*, 2005). Due pro-vettori che contengono rispettivamente le sequenze regolatorie (Figura 13, provettore 5', nel nostro caso pICH17388) e la sequenza di interesse (Figura 13, provettore 3', nel nostro caso pICH11599) all'interno di RB e LB *borders*. I due pro-vettori si assemblano all'interno della cellula ospite grazie ad una ricombinasi sito-specifica (situata su di un terzo pro-vettore) originando il vettore per l'espressione del gene di interesse (Figura 13, pICH-Cyto). Esistono diversi provettori 5' che differiscono per il tipo di sequenza segnale che viene fusa al gene di interesse, quindi è possibile indirizzare la proteina eterologa nel compartimento cellulare desiderato. Nel nostro caso è stato scelto di far esprimere la CP dell'AMCV nel citoplasma utilizzando il provettore 5' pICH17388.

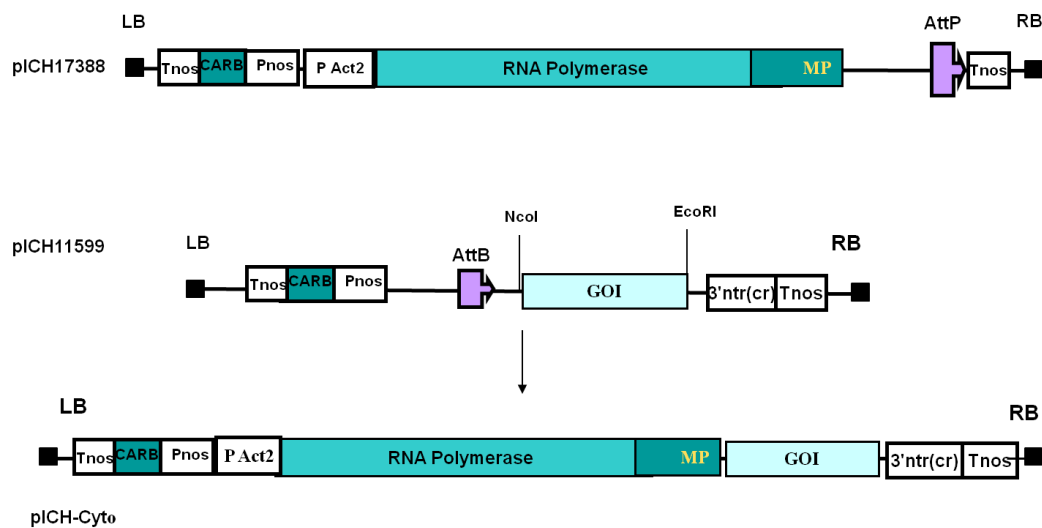


Figura 13. Rappresentazione schematica del sistema ICON.

Il provettore 5' (pICH 17388) (mostrato in alto) contiene: LB e RB: bordi di destra e di sinistra; Tnos: il terminatore della nopalina sintasi di *A. tumefaciens*; Pnos: il promotore della nopalina sintasi di *A. tumefaciens*; P Act2: la sequenza codificante il peptide segnale per l'espressione nel citosol; RNA Polymerase: la sequenza codificante la RNA polimerasi virale; MP: la sequenza codificante la proteina di movimento virale. Il provettore 3' (pICH11599), contiene: LB e RB: bordi di destra e di sinistra; Tnos il terminatore della nopalina sintasi di *A. tumefaciens*; Pnos il promotore della nopalina sintasi di *A. tumefaciens*; CARB: il gene che conferisce resistenza alla carbenicillina, per la selezione delle cellule trasformate; AttB: sequenza necessaria per la ricombinazione virale; siti multipli per la clonazione, di cui sono mostrati *NcoI* ed *EcoRI* utilizzati nel presente progetto di tesi (non viene riportata l'intera sequenza dei siti di clonazione multipla poiché il vettore è coperto da brevetto); GOI: *gene of interest*, gene di interesse; . Utilizzando il vettore 14011 contenente la sequenza codificante per l'integrasi virale, i due vettori pICH11599 e pICH 7388 ricombinano, in pianta, in un unico costrutto (PICH-Cyto), che contiene: LB e RB i bordi di destra e di sinistra; Tnos: il terminatore della nopalina sintasi di *A. tumefaciens*; Pnos: il promotore della nopalina sintasi di *A. tumefaciens*; CARB: il gene che conferisce resistenza alla carbenicillina, per la selezione delle cellule trasformate; RNA Polymerase: la sequenze codificanti la la RNA polimerasi virale; MP: la sequenza codificante la proteina di movimento virale; GOI *gene of interest*, gene di interesse (Marillonnet *et al.*, 2004).

Sistema (CPMV-HT)

Il sistema (CPMV-HT) è costituito dal vettore pEAQ-HT messo a punto utilizzando l'RNA-2 del CPMV (Figura 14) (Sainsbury *et al.*, 2008). Il vettore contiene:

- i bordi di destra e bordo di sinistra (LB e RB);
- regioni 5' della sequenza leader e 3' della regione non tradotta (UTR) di RNA-2;
- sito multiplo di clonaggio (MCS);
- sequenza codificante per la proteina p19 del TBSV;

- la sequenza del gene *nptII* codificante la Neomicina Fosfotransferasi II (Beck *et al.*, 1982) che conferisce resistenza alla kanamicina.

Questo sistema prevede il clonaggio di un gene di interesse tra il 5' della sequenza leader e il 3' della regione non tradotta (UTR) di RNA-2, in modo da emulare una molecola di mRNA per una traduzione efficiente

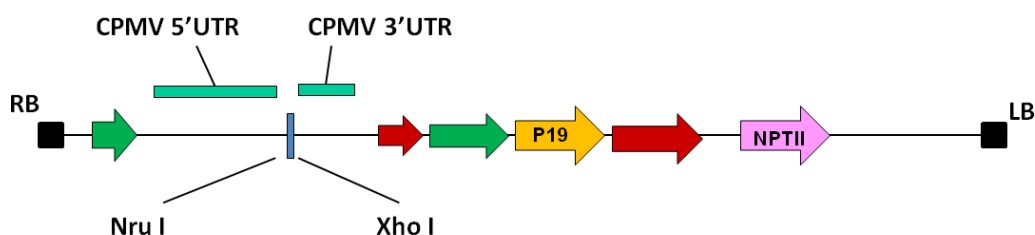


Figura 14. Rappresentazione schematica del vettore pEAQ-HT.

RB e LB: bordo destro e bordo sinistro della regione trasponibile; CPMV 5'UTR, CPMV 3' UTR: rispettivamente regioni 5' della sequenza leader e 3' della regione non tradotta (UTR) di RNA-2; p19: sequenza codificante per la proteina p19 del TBSV, inibitore del *silencing*; NPTII: gene codificante per la neomicina fosfotransferasi, che conferisce resistenza alla kanamicina; Sono indicati i siti *NruI-XhoI*, utilizzati per il clonaggio della sequenza codificante la CP di AMCV (non viene riportata l'intera sequenza dei siti di clonazione multipli poiché il vettore è coperto da brevetto).

2.2.2 Costrutti contenenti gli inibitori del *silencing*

Il costrutto pBIΩ-p19 (Figura15), contenente la sequenza codificante per l'inibitore del *silencing* p19AMCV è stato precedentemente realizzato nei laboratori dell'ENEA (Lombardi *et al.*, 2009).

I costrutti pBin61-p19, contenente la sequenza codificante per la p19TBSV (Voinnet *et al.*, 2003) e pBin61-p25, contenente la sequenza codificante per la p25PVX (Voinnet *et al.* 2000), sono stati gentilmente forniti dal Prof David Baulcombe (Università di Cambridge) (Figura 15).

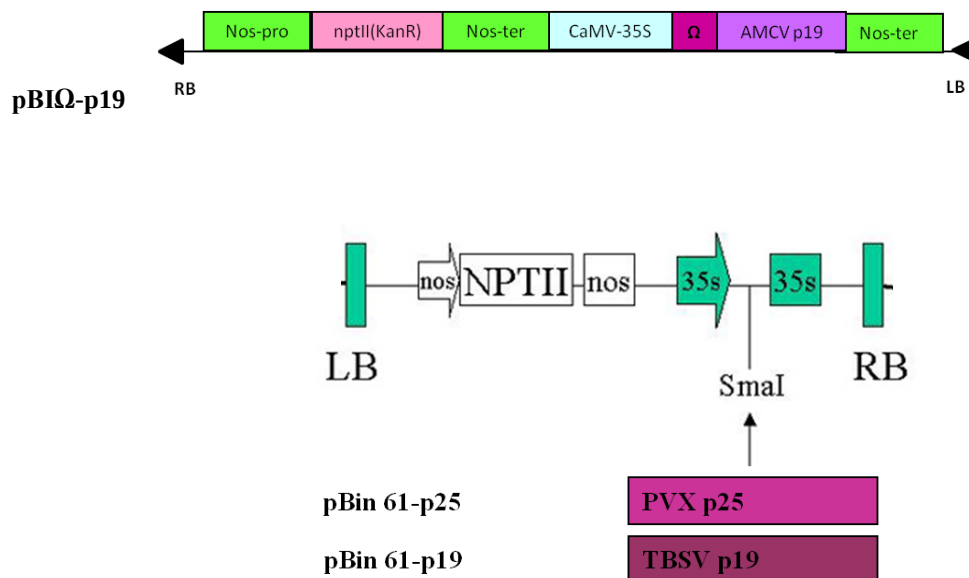


Figura 15. Inibitori del *silencing* utilizzati per la realizzazione del progetto.

pBIΩ-p19 contenente sequenza codificante per la p19AMCV (Lombardi *et al.*, 2009). RB e LB: bordo destro e bordo sinistro della regione trasponibile; Nos-pro e Nos-ter: rispettivamente promotore e terminatore del gene per la nopalina sintasi; NPTII: gene codificante per la neomicina fosfotransferasi, che conferisce resistenza alla kanamicina; Ω: enhancer traduzionale; CaMV 35S: promotore costitutivo forte. pBin61-p19: vettore binario contenente la sequenza codificante per la p19TBSV (Voinnet *et al.*, 2003); pBin61-p25: vettore binario contenente la sequenza codificante per la p25PVX (Voinnet *et al.*, 2000).

2.3 Letture spettrofotometriche

- La concentrazione degli acidi nucleici (DNA e RNA) è stata determinata, su campioni diluiti in un volume finale di 500 µl di acqua bidistillata (H₂O bd), mediante letture alle lunghezze d'onda di 260 e 280 nm, utilizzando cuvette di quarzo.
- La concentrazione di proteine presenti negli estratti di tessuti vegetali è stata valutata utilizzando il metodo Bradford (Bradford *et al.*, 1976) (paragrafo 2.7.2), alla lunghezza d'onda di 595 nm, utilizzando cuvette in plastica.
- La crescita di cellule batteriche in sospensione è stata determinata trasferendo 1ml dell'inoculo in cuvette di plastica e misurando la torbidità del campione alla lunghezza d'onda di 600 nm.

2.4 Clonaggi

2.4.1 Elettroforesi su gel d'agarosio per RNA

Campioni di RNA sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% in tampone TBE 1X. Al campione di RNA da analizzare (1µg) sono stati aggiunti 3 volumi di tampone di denaturazione. Il campione è stato quindi incubato per 10' a 65°C e raffreddato in ghiaccio per 5'. Prima del caricamento è stato aggiunto un uguale volume di tampone di caricamento.

2.4.2 RT-PCR

La retrotrascrizione dell'RNA in cDNA e la sua successiva amplificazione sono state eseguite separatamente. L'RNA è stato prima trattato con DNAsi (Promega) incubando a 37°C per 30 minuti, e successivamente a 65°C per 10 minuti. Quindi l'RNA è stato sottoposto alla reazione di retrotrascrizione per 1ora e 10 minuti a 42°C, utilizzando il protocollo riportato in tabella:

RNA stampo	1µg di RNA totale
dNTP	0.2mM dATP, 0.2mM dCTP, 0.2mM dGTP, 0.2mM dTTP
oligo-dT ₁₅	1 µl (0.5 µg/ µl Promega)
Inibitore porcino dell'RNasi	0.3 µl (36.3U/ µl Pharmacia)
Tampone RT 10X	2µl (500 mM Tris-HCl pH 8.3, 750 mM KCl, 30 mM MgCl ₂ , 100 mM ditiotreitolo)
Enzima RT	0.5µl di enzima RT (200U/ µl; Moloney Murine Leukemia Virus M-MULV, New England Biolabs)

Il cDNA così ottenuto è stato utilizzato per l'amplificazione mediante PCR di frammenti contenenti le sequenze di interesse.

2.4.4 Amplificazione del DNA mediante PCR

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 fase gli oligonucleotidi d'innescio (oligo diretto e oligo reverso) appaiano alla singola elica del DNA alla temperatura specifica (temperatura di *melting*) per ciascuna coppia di oligonucleotidi; la terza fase di polimerizzazione del DNA avviene a 72°C ad opera della DNA polimerasi. Le tre fasi vengono ripetute per un numero

di cicli tale da consentire l'amplificazione specifica del frammento di DNA. La DNA polimerasi utilizzata in tutte le amplificazioni è stata la Pfu Turbo (Stratagene), che essendo una DNA polimerasi ad alta fedeltà evita l'introduzione di errori durante i cicli di amplificazione.

Condizioni di PCR utilizzate sono:

Cicli	Temperatura	Tempo
1	94°C	5'
	94°C	50''
	Temperatura di <i>melting</i>	Variabile
30	72°C	1'/Kb
1	72°C	7'

La reazione condotta in un volume di 50 µl conteneva:

DNA stampo	1-50ng
MgCl ₂	1 mM
dNTPs	0.2mM
Oligo diretto	0.2 mM
Oligo reverso	0.2 mM
Tampone 10X	1X
<i>Pfu</i> Turbo (Stratagene)	1U

2.4.5 PCR sovrapposta

La PCR sovrapposta (*overlap extension PCR*, OE-PCR) è una tecnica capace di amplificare un segmento di DNA a partire da due templati la cui sequenza si sovrappone parzialmente (Ho *et al.*, 1989). Per ottenere il prodotto finale rappresentato da un frammento di DNA che è uguale alla somma dei due di partenza, è necessario eseguire due reazioni di PCR distinte. La prima, di soli 10 cicli, viene effettuata, in assenza di oligonucleotidi, unendo alla miscela di reazione i due templati che funzioneranno da innesco reciproco portando alla sintesi di un certo numero di molecole la cui lunghezza è pari alla somma dei due DNA innesco (Figura 16). La seconda reazione viene eseguita utilizzando soltanto un'aliquota della prima (di solito 10 µl di 50 µl totali) con aggiunta di una miscela contenente tampone, dNTP e oligonucleotidi la cui sequenza è complementare alle estremità del frammento ottenuto dalla prima reazione e che di solito contengono anche le sequenza codificanti per opportuni siti di restrizione.

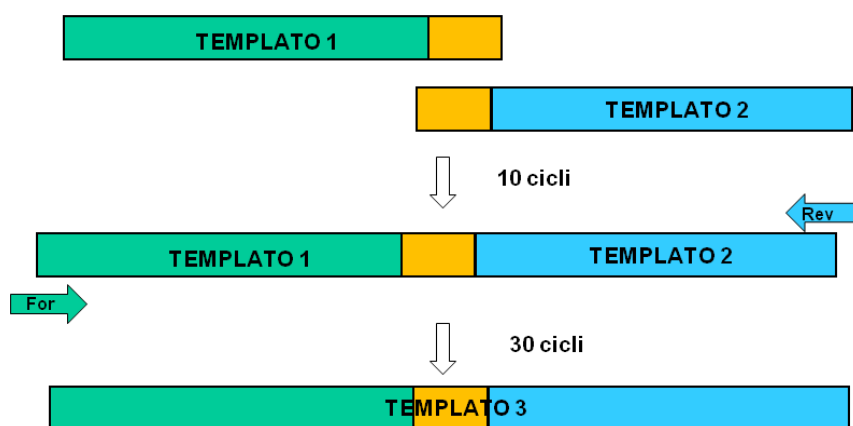


Figura 16. Rappresentazione schematica della reazione di PCR sovrapposta.

Durante la prima reazione di PCR vengono effettuati 10 cicli di amplificazione. Nella miscela di reazione non sono aggiunti gli oligonucleotidi poichè sono gli stessi DNA templati che funzionano come primers. Nella seconda reazione di PCR vengono effettuati 30 cicli di amplificazione e nella miscela di reazione vengono aggiunti gli oligonucleotidi (For e Rev). In arancione è evidenziata la regione di sovrapposizione presente tra il TEMPLATO 1 e il TEMPLATO 2. Freccia verde For (*Forward*): oligonucleotide complementare alla regione 5' del frammento finale indicato con TEMPLATO 3; Freccia blu Rev (*Reverse*): oligonucleotide complementare alla regione 3' del TEMPLATO 3.

Anche per questo tipo di PCR è stata utilizzata la DNA polimerasi Pfu Turbo. Le condizioni utilizzate per la prima reazione di PCR eseguita in un volume finale di 50µl, sono le seguenti:

Templati	5-50ng (equimolari)
dNTP	0.2mM
Tampone 10X	5µl
<i>Pfu</i>	2.5 U

Le condizioni utilizzate per la seconda reazione di PCR eseguita in un volume finale di 50µl, sono le seguenti:

Templati	10µl della prima reazione
dNTP	0.2mM
Primer forward	0.2mM
Primer reverse	0.2mM
Tampone 10X	5µl
<i>Pfu</i>	2.5 U

2.4.6 Sintesi degli oligonucleotidi e geni sintetici

Gli oligonucleotidi usati per le reazioni di PCR (Tabella 3) sono stati sintetizzati dalla ditta Sigma Genosys e disegnati utilizzando il programma Vector NTI (Invitrogen Corporation,

USA). I geni sintetici utilizzati in due clonaggi sono stati sintetizzati dalle ditte Genscript Corporation e Primm.

Tabella 3. Oligonucleotidi utilizzati

Nome	Sequenza
CPBamHIfor	<u>CGCGGATCC</u> ATGGCAATGGTAAAGAGAAA
CPKpnIrev	<u>GGGGTACCT</u> CACTAAATTAAAGAGACATCGTTC
CPNcoIfor	<u>CATGCC</u> ATGGCAATGGTAAAGAGAAAT
CPEcoIrev	<u>CCGGAATTCT</u> CACTAAATTAAAGAGACATCG
CPNruIfor	<u>CTTGGTCGCGA</u> ATGGCAATGGTAAAGAGAAATAAT
CPXhoIrev	<u>CCGCTCGAGT</u> CACTAAATTAAAGAGACATCGTTC
XmaICPfor	TCCCCCGGGTACATCCTGTTAACC
CP2F5rev	<u>CTAAGCCC</u> ACTTATCAAGTTCAATTAAAGAGACATCGTTCTG
Sac2F5rev	<u>CGAGCTCT</u> CAAGCCCCTTATCAAGTTCAATTA
Oligo1for	CGACAGAACGATGTCTCTTTAATTGGTGGAGGCGGTTCAAA GAGGATTCATATTGGTCCT
Oligo1rev	AGGACCAATATGAATCCTCTTTGAACCGCCTCCACCAATTA AAGAGACATCGTTCTGTCTG
Oligo2rev	<u>TGAACCGCCTCCACCA</u> ATTAAAGAGACATCGTTCTGTCTG
Oligo3rev	<u>AGTAGTATAAAAAGCTCTACC</u> AGGACCAATATGAATCCTCT TTG
Oligo4rev	<u>CGAGCTCTCACTA</u> AGTAGTATAAAAAGCTCTACCAG

La regione della sequenza nucleotidica che non si appaia al template è stata sottolineata. I due primer utilizzati per la PCR sono definiti forward (for) e reverse (rev), a seconda che siano complementari al filamento 5'→3' o a quello inverso 3'→5'.

2.4.7 Appaiamento in vitro di oligonucleotidi

Due µg di oligonucleotide senso e 2 µg di oligonucleotide antisenso sono stati miscelati in un'unica provetta da 1.5 ml in un volume finale di 40 µl di H₂O bd. Per denaturare eventuali strutture secondarie ed appaiamenti errati tra le basi degli oligonucleotidi, la provetta è stata trasferita in un bagno di acqua a 100°C per 5', e lasciata raffreddare lentamente a temperatura ambiente per consentire l'appaiamento.

2.4.8 Purificazione dei frammenti ottenuti mediante PCR

I frammenti di DNA amplificati mediante PCR sono stati purificati utilizzando il kit commerciale *PCR Extraction Kit* (QIAGEN) secondo il protocollo raccomandato dalla casa produttrice, e successivamente analizzati su gel d'agarosio.

2.4.9 Estrazione e purificazione di DNA da gel d'agarosio

I frammenti di DNA recuperati da gel d'agarosio sono stati purificati utilizzando il kit commerciale *Gel Extraction Kit* (QIAGEN) secondo il protocollo raccomandato dalla casa produttrice.

2.4.10 Restrizioni di DNA

Il DNA plasmidico e i frammenti di DNA da clonare sono stati digeriti seguendo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice (New England Biolabs, UK) degli enzimi. Le digestioni preparative di plasmide sono state effettuate utilizzando 10 µg di DNA, mentre le digestioni analitiche sono state effettuate utilizzando 1-2 µg di DNA.

2.4.11 Reazione di defosforilazione

Per evitare la ricircularizzazione del vettore “scarico” in seguito a ligazione, il DNA plasmidico ristretto è stato trattato con fosfatasi alcalina che catalizza la defosforilazione del 5' fosfato. La reazione è stata effettuata in un volume di 30 µl, utilizzando 0.5 U di fosfatasi alcalina (Antarctic Phosphatase, NEB, UK) per 1 µg di DNA seguendo le indicazioni della casa madre.

2.4.12 Reazione di ligazione

I plasmidi ed i frammenti di DNA da clonare, digeriti con gli opportuni enzimi di restrizione, sono stati uniti in una provetta da 1.5 ml in un rapporto molare plasmide:inserto di 1:6. La reazione è stata eseguita utilizzando l'enzima T4 DNA ligasi secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice (New England Biolabs, UK).

2.4.13 Preparazione di cellule batteriche competenti ed elettroporazione

Una singola colonia è stata prelevata dopo una notte di crescita a 37°C (*E. coli*) o 28°C (*A. tumefaciens*) su terreno solido (LB agar), inoculata in 30 ml di terreno liquido (LB brodo) ed incubata 16-18 ore in agitazione costante (250 rotazioni per minuto, RPM). Il giorno successivo, 3 ml di coltura sono stati utilizzati per effettuare un inoculo in 500 ml di

terreno liquido. La crescita batterica è stata fermata al raggiungimento di un valore OD₆₀₀ pari a 0.6 (fase esponenziale di crescita). La coltura è stata raffreddata rapidamente in ghiaccio, trasferita in tubi di polipropilene da 500 ml e centrifugata a 9000 x g per 10' a 4°C. Dopo la centrifugazione, il sopranatante è stato scartato e le cellule risospese in 500ml di H₂O bidistillata sterile fredda e nuovamente centrifugato come descritto. Questo passaggio è stato ripetuto 2 volte, diminuendo a ciascun passaggio la quantità di H₂O utilizzata (250 ml e 50 ml). L'ultimo precipitato cellulare è stato risospeso in 1.5 ml di H₂O contenente glicerolo al 10%. Aliquote di 50 µl di sospensione cellulare sono state trasferite in provette sterili da 1.5 ml, congelate rapidamente in azoto liquido e conservate a -80°C.

2.4.14 Elettroporazione

Le aliquote di cellule competenti sono state scongelate in ghiaccio e successivamente è stato aggiunto il DNA da trasfettare (1 µl di prodotto di ligazione o 2-5 ng di plasmide purificato), è seguita una incubazione in ghiaccio per 2'-3'. Ciascun campione è stato trasferito in cuvette per l'elettroporazione da 2 mm (Gene Pulsar, Bio-Rad) pre-raffreddate in ghiaccio. L'apparato per l'elettroporazione usato (Gene pulser Bio-Rad) è stato settato con i seguenti parametri: resistenza 200Ω, Potenziale elettrico 2.5 KV, Capacitanza 25 µF. Dopo l'impulso elettrico, è stato immediatamente aggiunto 1 ml di LB a ciascuna cuvetta, la coltura batterica elettroporata è stata trasferita in una provetta da 13 ml ed incubata a 37°C (*E. coli*) o 28°C (*A. tumefaciens*) in lenta agitazione per un'ora. Al termine aliquote di cellule (20µl e 100 µl) sono state piastrate su terreno selettivo (LB/agar) ed incubate a 37°C (*E. coli*) o 28°C (*A. tumefaciens*).

2.4.15 Caratterizzazione dei ricombinanti batterici mediante PCR

La reazione di PCR applicata direttamente sulle colonie batteriche (Sandhu *et al.*, 1989), permette di individuare rapidamente le cellule trasformate con i vettori ricombinanti.

Le condizioni di PCR utilizzate sono:

Cicli	Temperatura	Tempo
1	94°C	10'
30	94°C	50''
	Temperatura di <i>melting</i>	50''
	72°C	1'/Kb
1	72°C	7'

I prodotti di reazione sono stati analizzati su gel di agarosio.

2.4.16 Minipreparazione di DNA plasmidico

Una singola colonia batterica è stata inoculata in terreno liquido (LB contenete l'antibiotico opportuno) e incubata a 37°C in agitazione costante (250 RPM) per 16-18 ore. Il DNA plasmidico è stato purificato utilizzando il kit commerciale *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

2.4.17 Sequenziamento

Il sequenziamento del DNA plasmidico è stato eseguito dal C.R.I.B.I. (Centro di Ricerca Interdipartimentale e di Servizi di Biotecnologie Innovative, Università di Padova).

2.4.18 Preparazione di DNA plasmidico su larga scala

Una singola colonia batterica è stata inoculata in 3 ml di terreno liquido (LB contenente l'antibiotico opportuno) e incubata a 37°C in agitazione costante (250 RPM) per 8 ore. Un ml della precoltura è stato utilizzato per effettuare un inoculo di 500 ml che è stato incubato a 37°C in agitazione (250 RPM) per 16-18 ore. Il giorno successivo, il plasmide è stato purificato utilizzando il kit commerciale *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN, Germania) secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

2.4.19 Preparazione dei costrutti genici per l'espressione della CP di AMCV in pianta

Clonaggio nel vettore pBIΩ-Nef

L'RNA virale dell'AMCV, estratto da virioni purificati, è stato retrotrascritto in cDNA e amplificato mediante RT-PCR. La sequenza codificante per la CP (NCBI Reference Sequence: NC_001339.1) è stata amplificata a partire dal cDNA virale utilizzando gli oligonucleotidi CPBamHIfor e CPKpnIrev (Tabella 3). Tali oligonucleotidi hanno permesso di aggiungere alle estremità 5' e 3' del gene le sequenze riconosciute dagli enzimi di restrizione *BamHI* e *KpnI*, necessari per il clonaggio nel vettore intermedio pGEM-Nos (paragrafo 2.2.1, Figura 11). Utilizzando tale vettore la sequenza codificante per la CP è stata fusa alla sequenza del terminatore Nos, ottenendo così il vettore pGEM-Nos-CP (Figura 17). Successivamente il frammento di estremità *BamHI* e *EcoRI* proveniente dal vettore pGEM-Nos-CP è stato clonato nel vettore binario pBIΩ-Nef (paragrafo 2.2.1, Figura 12) ristretto con gli stessi enzimi, ottenendo il vettore pBIΩ-CP (Figura 17).

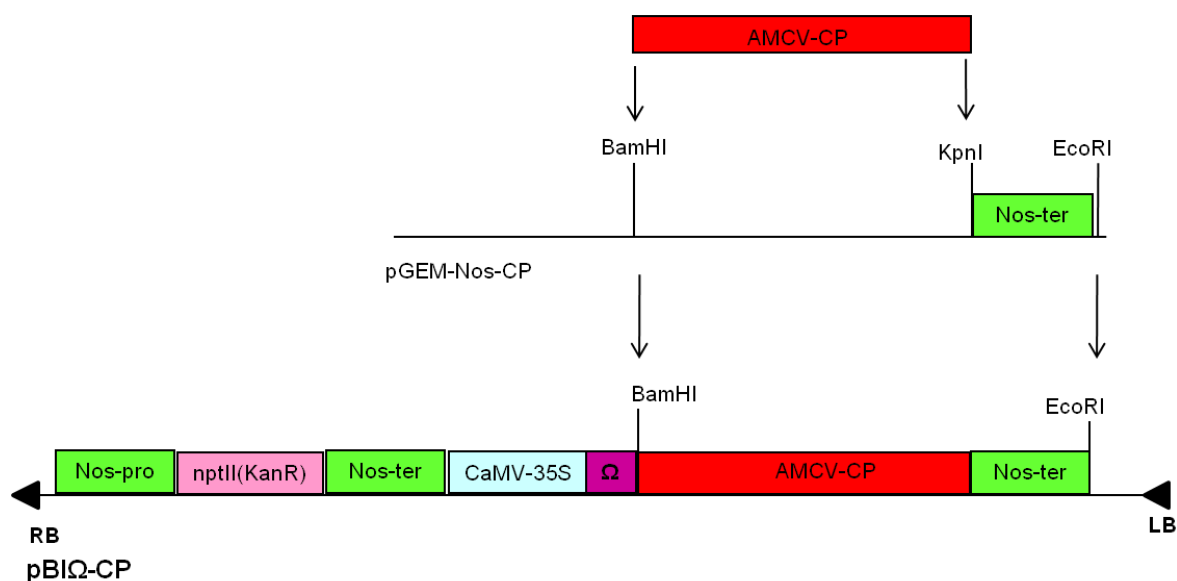


Figura 17. Rappresentazione schematica del clonaggio del gene codificante la CP di AMC nel vettore pBIΩ-Nef. Il gene codificante per la CP di AMCV (AMCV-CP) è stato clonato nel vettore intermedio pGEM-Nos utilizzando i siti di restrizione *Bam*HI e *Kpn*I, ottenendo il vettore pGEM-Nos-CP. Successivamente, il frammento di estremità *Bam*HI e *Eco*RI del vettore pGEM-Nos-CP è stato clonato nel vettore binario pBIΩ-Nef ristretto con gli stessi enzimi, ottenendo il vettore pBIΩ-CP.

Clonaggio nel sistema di espressione ICON

Il gene codificante la CP è stato amplificato, mediante PCR, con gli oligonucleotidi CPNcoIfor e CPEcoRIrev (Tabella 3) a partire dal vettore intermedio pGEM-Nos-CP per aggiungere alle estremità 5'e 3' della sequenza i siti di restrizione *Nco*I e *Eco*RI necessari per il clonaggio nel vettore pICH11599 (paragrafo 2.2.1, Figura 13). IL frammento così ottenuto è stato clonato nel vettore pICH11599 ottenendo il costrutto pICH11599-CP (Figura 18).

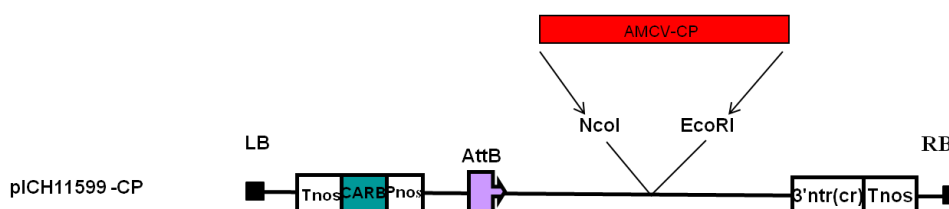


Figura 18. Rappresentazione schematica della realizzazione del costrutto pICH11599-CP

Il gene codificante per la CP di AMCV è stato clonata con enzimi di restrizione *Nco*I, *Eco*RI nel vettore pICH11599.

Clonaggio nel sistema di espressione CPMV-HT (costituito dal vettore pEAQ-HT).

Il gene codificante la CP è stato amplificato mediante PCR, con gli oligonucleotidi CPNruIfor e CPXhoIrev (Tabella 3) a partire dal vettore intermedio pGEM-Nos-CP per aggiungere alle estremità della sequenza i siti di restrizione (*NruI* e *XhoI*) necessari per il clonaggio nel vettore pEAQT-HT (paragrafo 2.2.1, Figura 14) digerito con enzimi di restrizione *NruI* e *XhoI*.

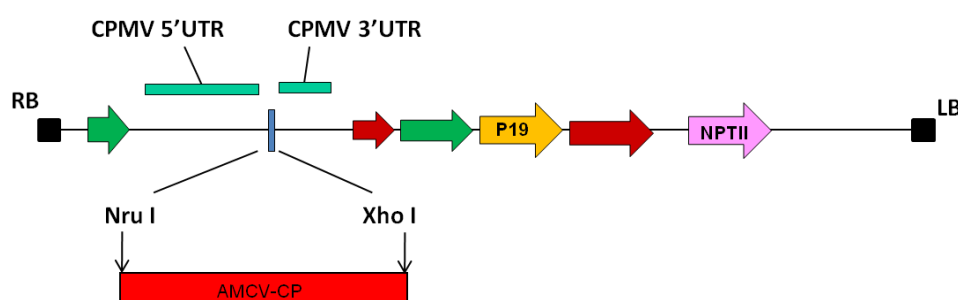


Figura 19. Rappresentazione schematica del clonaggio nel vettore pEAQ-HT. Il gene codificante per la CP di AMCV è stato clonato nel vettore pEAQ-HT utilizzando i siti di restrizione *NcoI*, *XhoI*.

2.4.20 Realizzazione dei costrutti chimerici

pBIΩ-CP-2F5

Parte della regione codificante per la CP è stata amplificata dal plasmide pGEM-Nos-CP (Figura 17) utilizzando gli oligonucleotidi Xma1CPfor e CP2F5rev (Tabella 3). L'uso dell'oligonucleotide CP2F5rev ha permesso di aggiungere all'estremità 3' del gene la sequenza di 18 nucleotidi codificante per l'epitopo lineare 2F5 (ELDKWA). La sequenza così ottenuta è stata amplificata nuovamente mediante PCR utilizzando gli oligonucleotidi Xma1CPfor e Sac2F5rev (Tabella 3) con i quali è stato aggiunto all'estremità 3' del gene il sito di restrizione *SacI*. La sequenza così ottenuta è stata clonata nel vettore intermedio pGEM-Nos-CP ristretto con gli enzimi *XmaI* e *SacI* (Figura 20). Successivamente, l'intera sequenza CP-2F5 così ottenuta è stata tagliata con enzimi di restrizione *BamHI*, *EcoRI* e sostituita nel vettore pBIΩ-CP, tagliato con medesimi enzimi di restrizione, si è così ottenuto il costrutto pBIΩ-CP-2F5 (Figura 20).

pBIΩ-CP-V3pos1

La strategia per il clonaggio della sequenza codificante il *loop* V3 all'interno della CP in posizione 1 ha previsto l'utilizzo dei siti unici di restrizione (*EcoRV* e *XmaI*) interni alla sequenza della CP virale. Per effettuare il clonaggio è stato utilizzato un frammento di DNA sintetico di 162 paia di basi contenente la fusione tra la sequenza codificante la regione di 14 amminoacidi del peptide V3(KRIHIGPGRAFYTTC) e parte della sequenza della CP compresa fra i 2 siti unici di restrizione *EcoRV* e *XmaI* (Figura 20). Il frammento sintetizzato è stato clonato nel vettore intermedio pGEM-Nos-CP utilizzando i siti unici di restrizione *EcoRV* e *XmaI* interni alla sequenza virale. Successivamente, l'intera sequenza CP-V3pos1 così ottenuta è stata tagliata con enzimi di restrizione *BamHI*, *EcoRI* e sostituita nel vettore pBIΩ-CP, tagliato con medesimi enzimi di restrizione, si è così ottenuto il costrutto pBIΩ-CP-V3pos1 (Figura 20).

pBIΩ-CP-V3pos3

Il costrutto contenente la sequenza V3 fusa alla CP nella posizione tre, è stato ottenuto con una strategia simile a quella descritta per la posizione 1. Il frammento di 358 paia di basi contenente la fusione tra epitopo V3 e parte della CP compresa tra i siti unici di restrizione *XmaI* e *SacI* è stato sintetizzato. La sequenza ottenuta è stata clonata nel vettore intermedio pGEM-Nos-CP utilizzando il sito unico di restrizione *XmaI* interno alla sequenza virale e il sito *SacI*, presente sul vettore. Successivamente, l'intera sequenza CP-V3pos3 ottenuta è stata tagliata con enzimi di restrizione *BamHI*, *EcoRI* e sostituita nel pBIΩ-CP, tagliato con medesimi enzimi di restrizione, si è così ottenuto il costrutto pBIΩ-CP-V3pos3 (Figura 20).

pBIΩ-CP-V3Cter

La strategia scelta per la realizzazione di questo costrutto, ha previsto l'appaiamento *in vitro* (paragrafo 2.4.7) dei due oligonucleotidi sintetici Oligo1dir e Oligo1Rev (Tabella 3) contenenti la sequenza di 48 pb codificante per il peptide V3. In seguito, il frammento a doppio filamento ottenuto è stato utilizzato in reazioni di PCR sovrapposte (paragrafo 2.4.5, Figura 16, Tabella3) che hanno consentito di ottenere l'inserito (360 paia di basi) di estremità *XmaI* e *SacI*, contenente parte della CP, un peptide linker (costituito da 4 glicine e una serina) ed il peptide V3 con estremità *SacI*. La sequenza CP-V3Cter così ottenuta è stata clonata nel vettore intermedio pGEM-Nos-CP, utilizzando il sito unico di restrizione *XmaI* interno alla sequenza virale e *SacI*, presente sul vettore (Figura 20). Infine, il

frammento di estremità *Bam*HI, *Eco*RI ottenuto dal vettore intermedio è stato clonato nel pBIΩ-CP, tagliato con medesimi enzimi di restrizione, ottenendo il costrutto pBIΩ-CP-V3Cter (Figura 20).

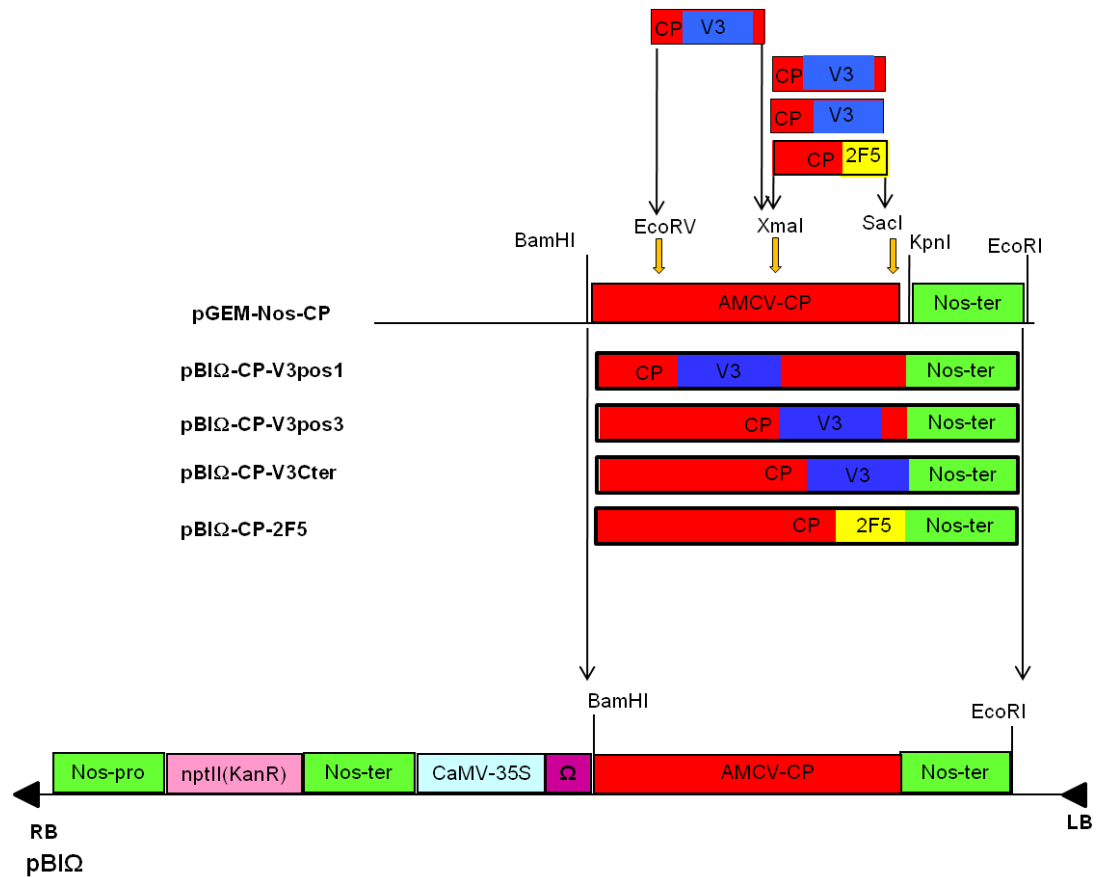


Figura 20. Realizzazione dei costrutti chimerici.

La realizzazione di tutti i costrutti chimerici ha previsto un passaggio nel vettore intermedio pGEM-Nos-CP. Il costrutto CP-V3pos1 è stato clonato utilizzando i siti per gli enzimi di restrizione *Eco*RV e *Xma*I, interni alla sequenza della CP. I costrutti CP-V3pos3, CP-V3Cter, CP-2F5 sono stati clonati utilizzando il sito per l'enzima di restrizione *Xma*I, interno alla sequenza della CP, e il sito *Sac*I, presente nel vettore pGEM-Nos-CP. Le cassette di espressione contenenti le sequenze codificanti le CP chimeriche sono state sostituite nel vettore pBIΩ-CP utilizzando i siti di restrizione *Bam*HI-*Eco*RI.

2.5 Agroinfiltrazioni di Piante di *Nicotiana benthamiana*

2.5.1 Condizioni di crescita delle piante

Le piante di *N. benthamiana* sono state allevate in serra ad una temperatura di 25°C con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

2.5.2 Agroinfiltrazione

Piante di *N. benthamiana* di sei settimane sono state infiltrate utilizzando colture di agrobatterio preparate come descritto. Una singola colonia di agrobatterio ricombinante è stata inoculata in 20 ml di LB contenente gli antibiotici richiesti. L'inoculo batterico è stato incubato a 28°C per 12-16 ore. Le cellule batteriche sono state precipitate a 5000 x g per 5 min e risospese nel tampone per agroinfiltrazione, in modo da ottenere una densità ottica $OD_{600} = 0.6$. Sono state utilizzate piante di ~6 settimane.

L'infiltrazione su piccola scala è stata eseguita con una siringa senza ago praticando delle piccole ferite, con un bisturi, sulla pagina inferiore della foglia. Per l'agroinfiltrazione su larga scala è stato utilizzato il vuoto. In dettaglio, le piante (la sola regione contenente le foglie) vengono immerse (capovolte) in 500-1000 ml della soluzione di agroinfiltrazione e sottoposte ad una pressione pari a 10 mm Hg utilizzando una pompa da vuoto Savant VP190. In figura 21 è riportata una rappresentazione schematica della preparazione delle differenti miscele di ceppi di agrobatterio ricombinante utilizzati per le agroinfiltrazioni. Nel caso del sistema CPMV-HT dato che la sequenza codificante per l'inibitore del *silencing* è contenuta all'interno del vettore pEAQT-HT-CP, l'agroinfiltrazione è stata eseguita utilizzando una sola coltura di agrobatterio.

Tutti i tessuti agroinfiltrati sono stati campionati dopo 9 giorni, congelati in azoto liquido e mantenuti a -80 °C per le successive analisi ELISA (Paragrafi 2.7.3).



Figura 21. Rappresentazione schematica della preparazione delle miscele di agrobatterio ricombinante. A) Miscela di agrobatteri ricombinanti per i vari costrutti (pBIΩ-X) e differenti inibitori del silencing. B) Sistema ICON.

2.6 Infezione di piante di *N. benthamiana* con il virus AMCV

Per l'infezione sono state utilizzate piante di ~4 settimane. Due foglie per ciascuna pianta sono state cosparse con carburo di silicio (Carborundum, VWR BDH Prolabo) e infettate con 50 µg di virione purificato diluito in 50 µl di 0.05M tampone sodio acetato (NaCH₃COO) pH 5.0. La superficie delle foglie è stata quindi delicatamente abrasa per favorire l'ingresso dei virioni nelle cellule del mesofillo fogliare.

2.7 Analisi dei tessuti agroinfiltrati

2.7.1 Estratti proteici

Gli estratti proteici sono stati ottenuti omogeneizzando i tessuti agroinfiltrati, utilizzando un omogeneizzatore Ultra-Turrax T25 (IKA). Circa 300 mg di tessuto vegetale polverizzato in azoto liquido sono stati trasferiti in una provetta da 2 ml contenente 300 µl di PBS 1X addizionato con 12 µl di inibitori delle proteasi (Complete™ EDTA Free, Roche). Il campione è stato centrifugato a 20000 xg a 4°C per 30'. Il supernatante è stato trasferito in una nuova provetta e la concentrazione proteica è stata determinata mediante saggio Bradford.

2.7.2 Quantificazione delle proteine

La concentrazione delle proteine totali presenti negli estratti vegetali è stata determinata con il metodo di Bradford (Bradford, 1976) che si basa sulla modificazione del picco massimo di assorbimento, della luce visibile, del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 a seguito del legame con le proteine in soluzione. Per il saggio è stato utilizzato il kit Micro Assay (Bio-Rad). Tutte le reazioni colorimetriche sono state lette allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm e la concentrazione dei campioni è stata determinata con il metodo dei minimi quadrati facendo riferimento ad una retta di titolazione ottenuta utilizzando quantità crescenti di sieroalbumina bovina (BSA).

2.7.3 Saggio ELISA (*enzyme-linked immunoasorbent assay*)

Piastre di polistirene da 96 pozzetti (Maxisorp, Nunc) sono state incubate a 37°C con 100 µl di estratto proteico di foglie agroinfiltrate contenente 50/100 µg di proteine totali. Dopo tre lavaggi con PBST e 2 con PBS 1X, è stata aggiunta la soluzione bloccante PBSM, e la piastra è stata incubata a 37°C per 2 h. A seconda dell'estratto proteico analizzato sono stati utilizzati anticorpi primari e secondari differenti. In particolare sono stati utilizzati: a) l'anticorpo monoclonale murino F8 (mAb F8), specifico per il CP dell'AMCV (Tavladoraki *et al.*, 1993), diluito 1:1000 in PBSM, rilevato dall'anticorpo secondario *anti-mouse* (A3562, Sigma) diluito 1:2500 in PBSM; b) l'anticorpo monoclonale umano 2F5 (mAb 2F5, EVA 3063, NIBSC Programme Eva centre for AIDS Reagents) specifico per l'epitopo 2F5 (Purtscher *et al.*, 1994), rilevato dall'anticorpo secondario *anti-human* (A9544, Sigma) diluito 1:5000 in PBSM; c) due anticorpi monoclonali umani anti-V3 (ARP 3023 e 3024, NIBSC Programme Eva centre for AIDS Reagents) (Gorny *et al.*,

1991) diluiti 1:150, in grado di riconoscere due regioni differenti, all'interno dell'epitopo V3, rilevati dal secondario *anti-human* (A9544, Sigma) diluito 1:5000 in PBSM. Le incubazioni dopo l'aggiunta dell'anticorpo primario e secondario sono state effettuate a 37°C per 2 h e 1h rispettivamente. Come controllo negativo è stato utilizzato l'estratto proveniente da piante non infiltrate. Come controlli positivi sono stati utilizzati: a) 300 ng di virus AMCV purificato; b) 8 ng del peptide contenente la sequenza dell'epitopo 2F5; c) 100 ng del peptide ciclizzato (EVA 7019, NIBSC Programme Eva centre for AIDS Reagents) contenenti la sequenza dell'epitopo V3. Come soluzione di sviluppo è stato utilizzato il substrato per la fosfatasi alcalina il p-nitrofenilfosfato (pNPP, Sigma Aldrich P7998). La lettura è stata effettuata mediante un lettore ELISA (TECAN) a 405nm.

2.7.4 Analisi di proteine su gel di poliacrilamide

I gel di poliacrilammide sono stati preparati come descritto da Laemmli (Laemmli *et al.*, 1980). Prima del caricamento è stato aggiunto a ciascun campione il tampone di caricamento. I campioni sono stati bolliti a 100 °C per 5 minuti. L'elettroforesi è stata condotta a 150 mV costanti nel tampone di corsa. Le proteine sono state colorate con nitrato d'argento (paragrafo 2.7.6) o con *Brillant Blue Coomassie* (paragrafo 2.7.5).

2.7.5 Colorazione con *Brillant Blue Coomassie*

La colorazione con il colorante *Brillant Blue Coomassie* viene eseguita incubando il gel di poliacrilammide nella soluzione *Coomassie* di lavoro per un tempo variabile dai 30 minuti ad 1 ora a temperatura ambiente. Il gel viene successivamente incubato nella soluzione decolorante fino alla completa rimozione del colorante in eccesso e alla contemporanea comparsa delle bande.

2.7.6 Colorazione con nitrato d'argento (*Silver Staining*)

Questa colorazione si basa sul metodo di Blum (Blum *et al.*, 1987) e permette di visualizzare quantità minime di proteina, fino a circa 2 ng per singola banda. Il gel è stato fissato per 30' nella soluzione di fissaggio alla quale sono stati aggiunti 50 µl di formaldeide al 37% (HCOH 0.02% finale), lavato per due volte per 10 minuti in etanolo al 50% e lasciato per 1 minuto in 100 ml della soluzione di pretrattamento. In seguito il gel è stato lavato per tre volte in H₂O per 20 secondi, tenuto per 10 minuti in 100 ml nella soluzione di nitrato d'argento e sviluppato nella soluzione di sviluppo fino all'intensità desiderata. Lo sviluppo è stato interrotto mettendo il gel nella soluzione di stop.

2.8 Analisi al microscopio elettronico

Tutte le analisi al microscopio elettronico sono state realizzate nei laboratori del Prof. George P. Lomonossoff (John Innes Centre, Norwich, UK). Il microscopio elettronico utilizzato è un EM Tecnai20 FEI collegato ad una macchina fotografica digitale AMT XR60. Per la visualizzazione, i campioni sono stati colorati con acetato di uranile al 2.0%. Per la visualizzazione delle VLP chimeriche e non è stata utilizzata una tecnica molto sensibile definita *immunosorbent electron microscopy* (ISEM). In questa metodica l'estratto grezzo viene incubato su apposite griglie preventivamente ricoperte con l'anticorpo specifico. Per la visualizzazione delle VLP WT è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale murino mAb F8 (Tavladoraki *et al.*, 1993), mentre per le VLP chimeriche l'anticorpo monoclonale umano mAb 2F5 (Purtscher *et al.*, 1994).

2.9 Purificazioni di virioni e VLP

Il protocollo per la purificazione dei virioni e delle VLPs è stato adattato da Desvoyes (Desvoyes *et al.*, 2002). In breve, foglie infettate di *N.benthamiana* campionate a 7 giorni dall'infezione o foglie agroinfiltrate campionate a 9 giorni dall'infiltrazione, sono state triturate in azoto liquido mediante l'uso di un mortaio. Per l'estrazione sono stati utilizzati da 5 a 10 ml/g di 0.05M tampone sodio acetato (NaCH_3COO) pH 5.0. Il supernatante è stato caricato su un cuscino di 2 cm di saccarosio al 40% e in seguito centrifugato a 80000 x g per 3h alla temperatura di 4°C. Il precipitato così ottenuto è stato risospeso in tampone sodio acetato 0.05 M pH 5.0.

2.10 Esperimenti di disassemblaggio *in vitro* di virioni purificati

2.10.1 Disassemblaggio *in vitro*

Tutti gli esperimenti sono stati condotti utilizzando 3 mg di virus purificato in tampone 0.05 M sodio acetato pH 5.0. Le incubazioni con i diversi tamponi riportati in Tabella 4 sono state eseguite mediante dialisi in cassette "Slide-A-Lyser" (Pierce) per 16-18 ore a 4°C (Michel *et al.*, 2006). L'RNA è stato precipitato mediante l'utilizzo di sali o semplice ultracentrifugazione a seconda del protocollo utilizzato.

Tabella 4 Protocolli utilizzati negli esperimenti di disassemblaggio dei virioni purificati

	Tampone	Rimozione dell' RNA	Bibliografia
3	1.0M NaCl, 0.05M Tris HCL pH 7.5, 0.001M EDTA, 0.001M DTT	Mediante precipitazione: uguale volume di 4M CaCl ₂ , incubazione 15' a 4°C, 12000 x g 15'.	(Ren <i>et al.</i> , 2006)
4	0.5M NaCl, 0.1M Tris HCl, 0.005 M EDTA pH 8.0	L'RNA non è stato rimosso ed il campione è stato analizzato tal quale.	(Sorger <i>et al.</i> , 1986)

2.10.2 Cromatografia liquida ad alta risoluzione (*Fast protein liquid chromatography* FPLC)

Il campione è stato frazionato utilizzando una colonna Superdex™ 200 5/150 GL (GE Healthcare) (velocità di flusso 0.3 mL/min) utilizzando lo strumento ΔKTA FPLC P920 (GE Healthcare). Sono state raccolte in tutto 9 frazioni del volume di 500 µl, tramite un collettore di frazioni (FRAC-920). Il virus AMCV purificato è stato utilizzato come controllo. Come marcatori di peso molecolare sono state utilizzate una ribonucleasi di 13.7 kDa e ovalbumina di 44.0 kDa.

2.10.3 Misure di *Dynamic Light Scattering* (DLS).

Le dimensioni delle particelle contenute nel campione trattato con il tampone 4 sono state calcolate mediante spettroscopia ottica o DLS (Aljabali *et al.*, 2010). Prima di effettuare l'analisi i campioni sono stati filtrati utilizzando un filtro di 0.1 µm. Lo strumento ha effettuato 10 misure ogni 10 secondi, i valori riportati rappresentano una media di 3 esperimenti consecutivi.

2.11 Realizzazione di modelli *in silico*

2.11.1 Realizzazione dei modelli tridimensionali della CP della wild-type e delle sue chimere mediante *Homology Modeling*

Le strutture tridimensionali utilizzate come template per la costruzione dei modelli della CP wild-type e delle sue chimere sono state ottenute interrogando il portale che ospita la banca dati delle macromolecole biologiche (Brookhaven Protein Data Bank, PDB) (Berman *et al.*, 2002). Il miglior template è risultato essere la CP del Tomato Bushy Stunt virus (TBSV, 2TBV.pdb) appartenente alla stessa famiglia di virus dell'AMCV, la cui struttura è

stata ben caratterizzata (Harrison *et al.*, 1978; Olson *et al.*, 1983) e la cui CP mostra il 71,2% di identità di sequenza con la CP dell'AMCV. Per costruire i modelli strutturali delle CP chimeriche, oltre alla CP del TBSV, sono stati utilizzati ulteriori template recanti le coordinate tridimensionali degli epitopi d'interesse. In particolare i template utilizzati sono: l'epitopo 2F5 della proteina di rivestimento gp41 dell'HIV-1 (1TJG(Q).pdb), l'epitopo V3 della proteina gp120 dell'HIV-1 riconosciuto dall'anticorpo umano monoclonale neutralizzante Fab 447-52D (1Q1J(Q).pdb, 1NIZ(A).pdb) e dall'anticorpo umano monoclonale neutralizzante Fab 50.1 (1GGI(P).pdb). Le sequenze sono state allineate mediante CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) e i modelli sono stati generati mediante Modeller v 9.4 (Fiser *and* Sali 2003).

Per ogni CP wild-type e chimerica è stato chiesto a Modeller di generare 30 modelli. Di ogni modello è stata valutata la stereochimica mediante PROCHECK e la qualità energetica mediante il potenziale statistico DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) fornito da Modeller. La similarità e l'accuratezza strutturale sono state calcolate misurando la *root mean square deviation* (rmsd, deviazione quadratica media) tra gli atomi C α del modello ottenuto con gli atomi C α della struttura del template TBSV.

2.11.2 Realizzazione dei modelli *in silico* delle VLP

Le particelle simil-virali sono state realizzate applicando alle singole CP dell'AMCV la matrice di coordinate roto-traslazionale che corrisponde a T=3, ottenuta dalla banca dati dei virus icosaedrici (VIPERdb) (URL: <http://viperdb.scripps.edu>).

2.11.3 Analisi della superficie accessibile al solvente e dei contatti molecolari della VLP

Per individuare i siti adatti all'inserimento dell'epitopo V3, la struttura della VLP wild-type dell'AMCV è stata analizzata nel dettaglio. L'accessibilità al solvente dei residui amminoacidici della particella virale è stata calcolata mediante algoritmi implementati in WHAT-IF (Vriend *et al.*, 1990) (ACCESS) che si basano sull'uso di una sonda sferica con un raggio pari a 1.4 Å, paragonabile a quello di una molecola di acqua. Vengono considerati accessibili al solvente quegli atomi la cui superficie di Van der Waals viene toccata dalla sonda che è stata fatta scorrere lungo la superficie della particella. I contatti atomici instaurati da residui appartenenti a diverse CP ed importanti per la stabilità dell'intera particella simil-virale sono stati calcolati utilizzando algoritmi presenti in WHAT-IF (ANACON).

Appendice A: Terreni

LB:

triptone	1%
estratto di lievito	0.5%
NaCl	1%

LBA (LB agar):

Agar	1.5%
------	------

LB

Tutti i terreni sono autoclavati a 121°C, per 15 minuti.

Soluzione per agroinfiltrazione

MES pH 5.5	10 mM
MgCl ₂	10 mM

filtrata con filtri sterili da 0,22 µm.

Appendice B: Soluzioni

Soluzioni per DNA e RNA

Acido etilendiaminotetracetico (EDTA) 0.5 M pH8.0

Na ₂ EDTA	0.5 M
pH 8	
Tris HCl	1 M pH 7.5
Tris Base	1 M

Portare a pH 7.5 con HCl

Souzione di caricamento per DNA

glicerolo	30 %
bromofenolo blu (BFB)	0.1 %
xilene cianolo	0.1 %

TAE 50x

Tris Base	2 M
acido acetico glaciale	5.7 %
EDTA 0.5 M pH 8	50 mM

Tampone di eluizione e mantenimento del DNA (TE)

Tris HCl pH 7.5	10 mM
-----------------	-------

Soluzione di pretrattamento

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2 mM

Soluzione di Nitrato d'argento

AgNO_3 15 mM

HCOH 0.03%

Soluzione di sviluppo

Na_2CO_3 200 mM

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 40 μM

HCOH 0.02%

PBS 10x

NaCl 1.3 M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ 70 mM

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 30 mM

pH 7.3

PBST

Tween 0.1%

PBS10X 1X

Soluzione bloccante (PBSM)

Latte scremato in polvere 5%

PBS 10X 1X

Tampone di lavaggio

PBS 10x 1X

Tween 0.1%

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Preparazione dei costrutti per l'espressione transiente della CP dell'AMCV

Allo scopo di ottimizzare l'espressione della proteina del capsido (CP) dell'AMCV, il gene *cp* è stato clonato in tre differenti sistemi d'espressione transiente. Come descritto in dettaglio nel capitolo Materiali e Metodi, i sistemi di espressione presi in considerazione sono stati quello messo a punto dall'ICON Genetics (Marillonet *et al.*, 2004; Marillonet *et al.*, 2005), il CPMV-HT (Sainsbury *et al.*, 2008). Inoltre è stato valutato l'effetto di tre diversi inibitori del *silencing* post-trascrizionale, p19AMCV, p19TBSV e p25PVX, le cui sequenze sono contenute rispettivamente nei vettori pBIΩ-p19, pBin61-p19, pBin61-p25 (Figura 22) utilizzati in co-agroinfiltrazione con il vettore pBIΩ-CP, messo a punto nel nostro laboratorio (Marusic *et al.*, 2007).

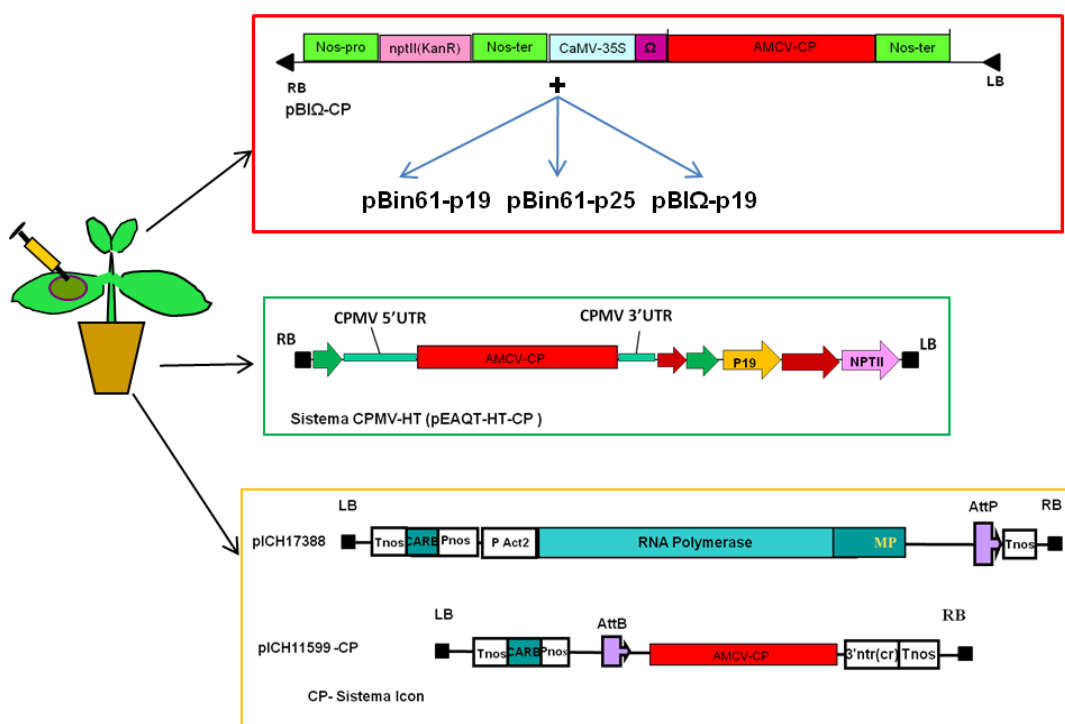


Figura 22. Rappresentazione schematica delle agroinfiltrazioni effettuate

Nel riquadro rosso (in alto) sono riportate le combinazioni di colture di agrobatteri ricombinanti utilizzate per valutare l'effetto di tre diversi inibitori del *silencing* (p19TBSV, p25PVX, p19AMCV). pBIΩ-CP/p19AMCV, pBIΩ-CP/p19TBSV, pBIΩ-CP/p25PVX: : tre differenti miscele di agrobatteri recanti tutte il vettore pBIΩ-CP in combinazione con le colture contenenti rispettivamente i vettori pBin61-p19, pBin61-p25, pBIΩ-p19. Nel riquadro verde (centrale) è schematizzata l'agroinfiltrazione realizzata con sistema CPMV-HT (pEAQT-HT) mentre nel riquadro giallo (in basso) quella con il sistema ICON (costituito dai vettori pICH11599-CP e pICH17388, i due pro-vettori si assemblano all'interno della cellula ospite grazie ad una ricombinasi sito-specifica situata su di un terzo pro-vettore).

3.2 Espressione transiente della CP

Al fine di valutare quale fosse il sistema d'espressione in grado di fornire il più alto livello di CP, piante di *N. benthamiana* (di sei settimane) sono state agroinfiltrate utilizzando le combinazioni riportate in figura 22. Per individuare il picco di espressione, le foglie sono state campionate a 3, 5, 7 e 9 giorni dopo l'infiltrazione (dpi) e l'estratto proteico è stato analizzato mediante saggio immunoenzimatico (ELISA).

3.2.1 Valutazione dell'effetto di tre diversi inibitori del *silencing* sui livelli d'espressione della CP

Per valutare e confrontare l'effetto di tre diversi inibitori del *silencing*, p19AMCV, p19TBSV, p25PVX, sono stati analizzati e confrontati gli estratti di foglie provenienti da piante agroinfiltrate utilizzando le combinazioni pBIQ-CP/p19TBSV, pBIQ-CP/p25PVX e pBIQ-CP/p19AMCV (Figura 22).

I campioni prelevati a tempi diversi (3, 5, 7, 9 dpi) sono stati analizzati mediante saggio ELISA utilizzando l'anticorpo monoclonale murino mAb F8 specifico per la CP dell'AMCV in conformazione nativa (Tavladoraki *et al.*, 1993). I risultati indicano che la co-infiltrazione con i tre diversi inibitori del *silencing* aumenta, come atteso, i livelli di espressione della CP a 9 dpi rispetto all'infiltrazione con il solo pBIQ-CP (Figura 23). Un confronto tra le tre diverse combinazioni (pBIQ-CP/p19AMCV, pBIQ-CP/p19TBSV, pBIQ-CP/p25PVX) evidenzia che livelli di espressione della CP ottenuti con p19AMCV e p19TBSV sono leggermente più elevati rispetto a quelli ottenuti utilizzando l'inibitore del *silencing* p25PVX (Figura 23). Per questa ragione è stato deciso effettuare un ELISA quantitativo per valutare in termini di percentuale di espressione della CP rispetto alle proteine totali solubili (% TSP) l'incremento dovuto all'aggiunta della p19AMCV. I risultati hanno evidenziato che la co-infiltrazione con la p19AMCV determina un aumento di circa tre volte dell'espressione transiente della CP, passando da un valore dello 0.5% TSP a quello dell' 1.5% TSP (Circelli *et al.*, 2010).

Questo risultato non sorprende visto che gli effetti positivi della p19TBSV sull'espressione transiente in pianta sono noti da tempo (Voinnet *et al.*, 2003). Inoltre, i risultati ottenuti sono in accordo con quanto già osservato in studi condotti sull'espressione transiente della proteina Nef del virus HIV-1 in pianta (Lombardi *et al.*, 2009), dove è stato evidenziato che l'incremento, statisticamente significativo, dell'espressione ottenuto impiegando gli stessi inibitori del *silencing* (p19AMCV, p19TBSV e p25PVX) era rispettivamente di 4.4, 3.0 e 2.2 volte.

Sulla base delle indicazioni sperimentali e considerato che la p19AMCV è stata clonata e caratterizzata nel nostro laboratorio (Lombardi *et al.*, 2009), si è deciso di utilizzare la combinazione pBIQ-CP/p19AMCV nel confronto con gli altri sistemi di espressione (CPMV-HT e ICON).

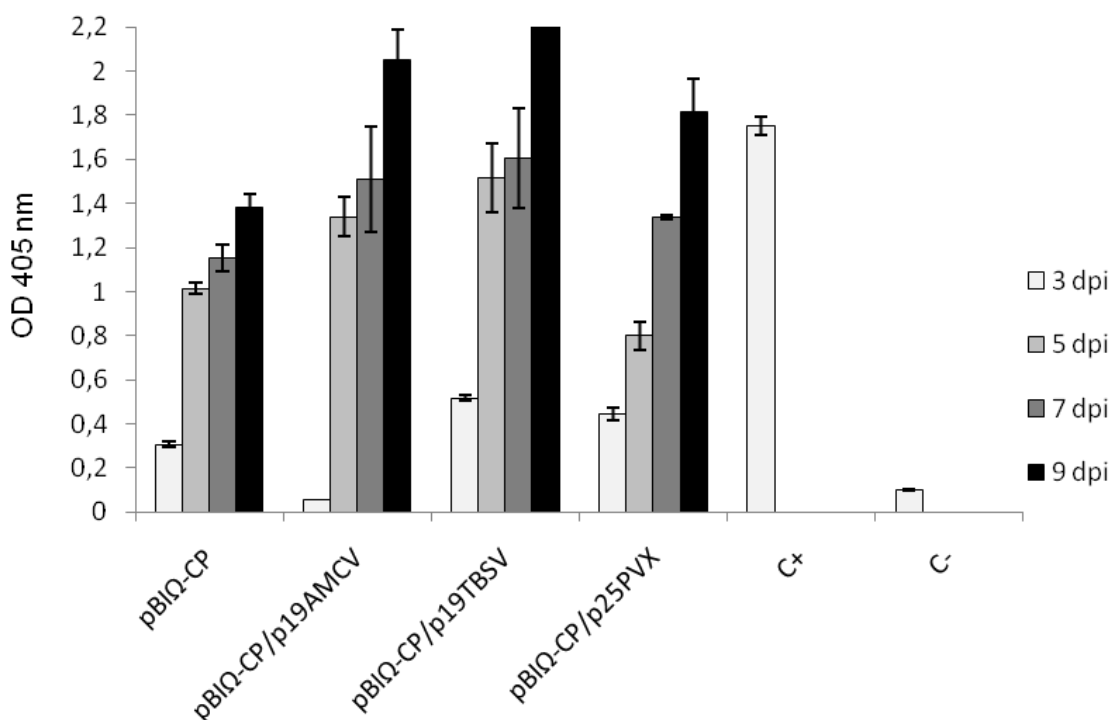


Figura 23. Analisi dell'effetto di diversi inibitori del *silencing* sull'espressione della CP dell'AMCV.

I livelli di espressione della CP nei campioni prelevati a diversi dpi (3, 5, 7, 9), sono stati valutati mediante saggio ELISA utilizzando il mAb F8, specifico per la CP dell'AMCV in conformazione nativa.

pBIQ-CP: estratto di foglie agroinfiltrate con il solo costrutto pBIQ-CP; pBIQ-CP /p19AMCV: estratto di foglie agroinfiltrate con la combinazione pBIQ-CP/p19AMCV; pBIQ-CP/p19TBSV: estratto di foglie agroinfiltrate con la combinazione pBIQ-CP/p19TBSV; pBIQ-CP/p25PVX: estratto di foglie agroinfiltrate con la combinazione pBIQ-CP/p25PVX; C+: 200 ng di virus AMCV purificato. C-: estratto di foglie non agroinfiltrate. Gli estratti proteici totali sono stati normalizzati rispetto al contenuto di proteine totali solubili. I valori di OD₄₀₅ sono la media ($\pm$ D.S.) di quelli ottenuti in tre esperimenti indipendenti.

3.2.2 Confronto tra differenti sistemi di espressione

Per stabilire se la combinazione pBIQ-CP/p19AMCV (Figura 22) fosse quella più idonea per ottenere il massimo livello di espressione transiente della CP, si è proceduto al confronto con i due sistemi di espressione ICON e CPMV-HT (Capitolo Materiali e Metodi 2.2.1) ottenuti in concessione dalla ICON Genetics e dalla PBL Technology rispettivamente.

Le agroinfiltrazioni di piante *N.benthamiana*, sono state eseguite come descritto (Capitolo Materiali e Metodi paragrafo 2.5.2). Le foglie agroinfiltrate sono state campionate a 5, 7 e 9 dpi. Gli estratti proteici sono stati analizzati mediante saggio ELISA utilizzando l'anticorpo monoclonale mAb F8. In figura 24 è riportato l'istogramma relativo al confronto tra i sistemi pBIQ-CP/p19AMCV e CP-Sistema ICON. I risultati indicano chiaramente che i livelli di espressione utilizzando la combinazione pBIQ-CP/p19 AMCV sono significativamente più elevati di quelli ottenuti con il CP-Sistema ICON.

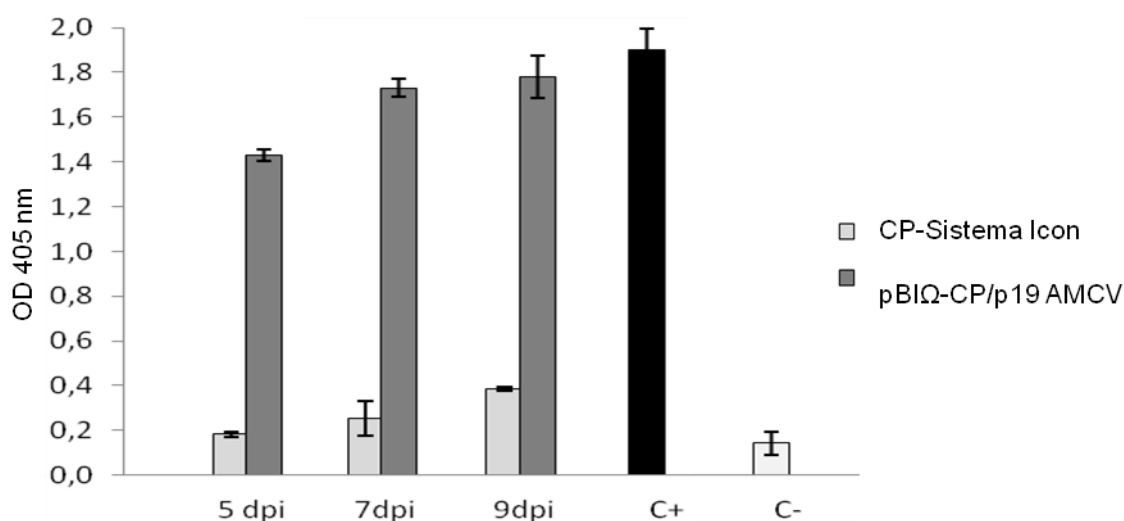


Figura 24. Confronto tra CP-Sistema ICON e pBIQ-CP/p19AMCV.

I livelli di espressione della CP nei campioni prelevati a diversi dpi (5, 7, 9), sono stati valutati mediante saggio ELISA utilizzando il mAb F8, specifico per la CP dell'AMCV in conformazione nativa. C+: 200 ng di virus AMCV purificato. C-: estratto di foglie non agroinfiltrate. Gli estratti proteici totali sono stati normalizzati rispetto al contenuto di proteine totali solubili. I valori di OD₄₀₅ sono la media ($\pm$ D.S.) di quelli ottenuti in tre esperimenti indipendenti.

Infine è stato effettuato il confronto del nostro sistema (pBIQ-CP/p19AMCV) con il sistema CPMV-HT-CP (Figura 22). Anche in questo caso, gli estratti di foglie agroinfiltrate e campionate a 5, 7, 9 dpi, sono stati analizzati mediante saggio ELISA. I risultati sono mostrati in figura 25. A differenza di quanto riscontrato per il sistema ICON, in questo caso i livelli di espressione della CP ottenuti con i due sistemi non differiscono significativamente. Infatti, a parità di contenuto proteico totale sono stati registrati valori di OD₄₀₅ di 2 e 1,8 nei campioni di foglie prelevati a 9 dpi e infiltrate rispettivamente con pBIQ-CP/p19AMCV e CPMV-HT-CP.

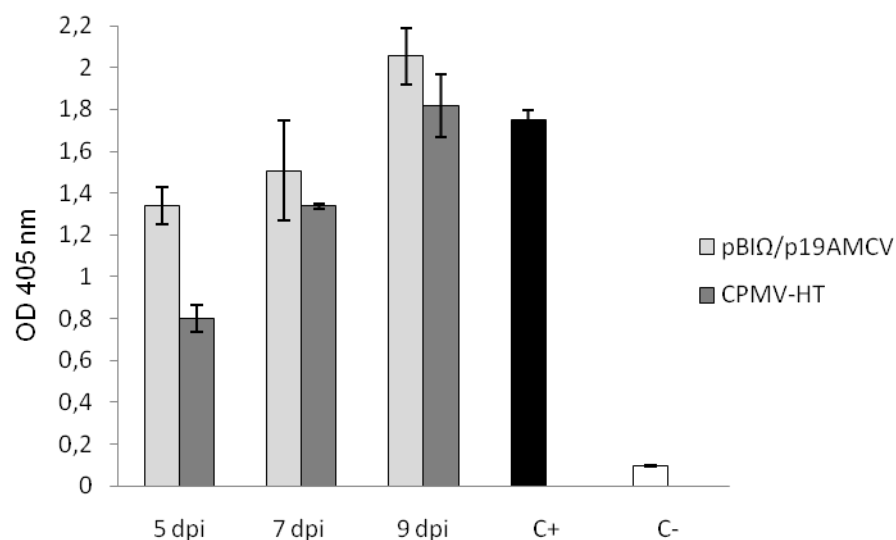


Figura 25. Confronto tra i sistemi di espressione CPMV-HT-CP e pBIΩ-CP/p19AMCV.

I livelli di espressione della CP nei campioni prelevati a diversi dpi (5, 7, 9), sono stati valutati mediante saggio ELISA utilizzando il mAb F8, specifico per la CP dell'AMCV in conformazione nativa. C+: 200 ng di virus AMCV purificato. C-: estratto di foglie non agroinfiltrate. Gli estratti proteici totali sono stati normalizzati rispetto al contenuto di proteine totali solubili. I valori di OD₄₀₅ sono la media ($\pm$ D.S.) di quelli ottenuti in tre esperimenti indipendenti.

Il basso livello di espressione ottenuto con CP-Sistema ICON potrebbe essere dovuto al fatto che in questo caso la trascrizione e traduzione del gene di interesse si realizza soltanto quando all'interno della stessa cellula si ha la presenza contemporanea dei tre componenti necessari (i due pro-vettori 3'-5' e il vettore che porta il gene per la ricombinasi) (Marillonet *et al.*, 2004). Inoltre è noto che le condizioni di agroinfiltrazione (concentrazione di agrobatterio) ed i tempi scelti per il campionamento quando si utilizza il sistema ICON, devono essere calibrati sulla proteina d'interesse. Infatti, nei vari lavori pubblicati i protocolli di agroinfiltrazione utilizzati non sono mai gli stessi ed in particolare le concentrazioni di agrobatterio utilizzate e il tempo di rilevamento del picco di espressione variano notevolmente (Marillonet *et al.*, 2005; Santi *et al.*, 2006). I risultati ottenuti con il CPMV-HT-CP non sorprendono, visto che questo sistema sfrutta l'utilizzo della p19TBSV per incrementare i livelli di espressione, in maniera del tutto analoga al pBIΩ-CP/p19AMCV messo a punto nel nostro laboratorio.

Sulla base dei risultati ottenuti, la successiva produzione su larga scala, sia della CP *wild type* (WT) che delle CP chimeriche, è stata effettuata co-agroinfiltrando piante di *N.benthamiana* con la combinazione pBIΩ-CP/p19AMCV.

3.3 Purificazione delle VLP e analisi al microscopio elettronico

Il saggio ELISA effettuato utilizzando l'anticorpo monoclonale mAb F8 ha consentito di stabilire che la CP si esprime in pianta in conformazione nativa. Tuttavia questo tipo di analisi non fornisce alcuna indicazione riguardo l'eventuale assemblaggio di VLP. Per questa ragione, dopo aver eseguito un'agroinfiltrazione su larga scala (Capitolo Materiali e Metodi paragrafo 2.5.2), si è proceduto alla purificazione delle VLP da tessuti infiltrati mediante cuscino di saccarosio (Capitolo Materiali e Metodi paragrafo 2.9). Il campione ottenuto è stato analizzato mediante microscopia elettronica a trasmissione. La colorazione con acetato di uranile ha rivelato la presenza di particelle simil-virali (Figura 26B) di dimensioni e morfologia del tutto simile ai virioni di AMCV purificati da foglie infette (Figura 26A).

I risultati riportati dimostrano per la prima volta che la CP dell'AMCV espressa per via transiente in pianta è in grado di autoassemblarsi in VLP. Infatti, nonostante siano stati pubblicati lavori condotti sulla CP del TSBV (appartenente alla stessa famiglia e genere dell'AMCV) e sulla caratterizzazione delle VLP generate da mutanti per delezione della CP e CP chimeriche, tutti gli studi sono stati fatti in cellule di insetto (Hsu *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2009).

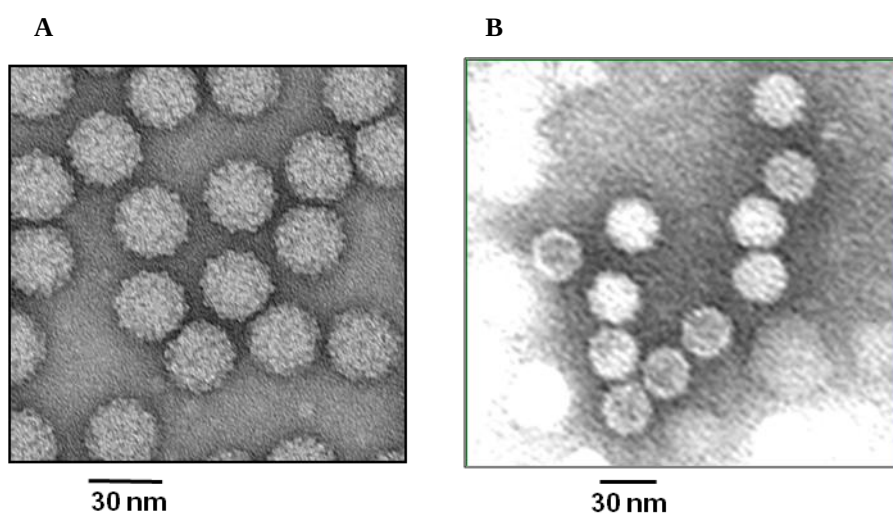


Figura 26. Fotografia al microscopio elettronico.

A) Particelle virali di AMCV; B) VLP WT ottenute mediante purificazione su cuscino di saccarosio.

3.4 Scelta degli epitopi dell'HIV-1 per la creazione delle VLP chimeriche

Le proteine strutturali dell'involucro virale dell'HIV sono considerate degli ottimi candidati per lo sviluppo di un vaccino ricombinante, poiché sono in grado di indurre la produzione di anticorpi neutralizzanti, in grado di bloccare il virus nelle primissime fasi

dell'infezione. La nostra attenzione si è focalizzata su due epitopi molto conservati in diversi isolati, situati sulle glicoproteine gp41e gp120 dell'involucro esterno di HIV-1. In particolare, sono stati selezionati l'epitopo lineare 2F5, costituito da una sequenza di 6 amminoacidi (ELDKWA), situato nella regione prossimale della gp41 (Muster *et al.*, 1993), riconosciuto dall'anticorpo monoclonale umano neutralizzante 2F5 (Purtscher *et al.*,1994) e una porzione del *loop* V3, regione della gp120 in grado di interagire con le molecole di superficie della cellula target (Huang *et al.*2005) (Figura 27).

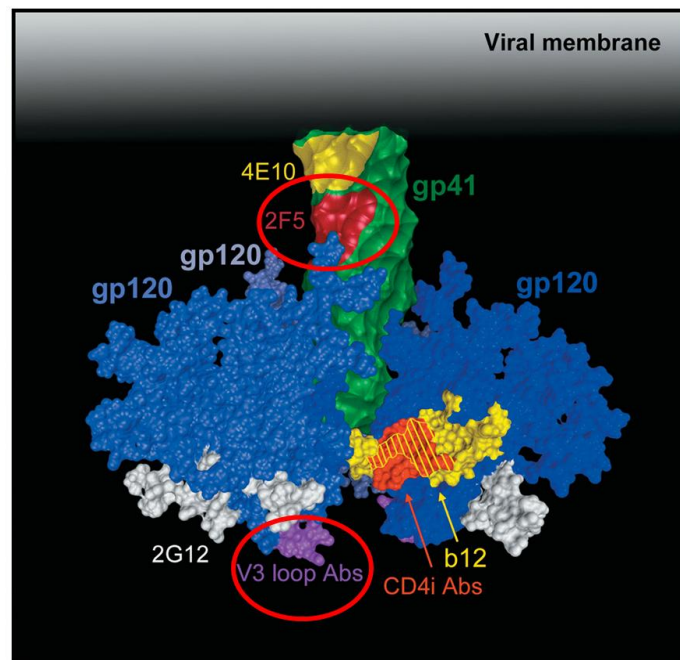


Figura 27. Modello dell'involucro virale di HIV-1 in cui sono mostrate la posizione degli epitopi riconosciuti da anticorpi neutralizzanti mAbs. I tre monomeri di gp120 sono rappresentati in blu, la gp41 in verde. Cerchiati in rosso l'epitopo 2F5 e il loop V3. (adattata da Burton *et al.*, 2004)

Il *loop* V3 è una regione di circa 30-35 aminoacidi, ma è noto che la sequenza “core” in grado di stimolare una risposta immunitaria neutralizzante può essere ristretta a 14 aminoacidi (KRIHIGPGRAFYTT), contenente due epitopi neutralizzanti conservati (KRIHI e HIGPGR) (Huang *et al.*2005).

L'epitopo 2F5 è stato oggetto di studio nel nostro laboratorio (Marusic *et al.*, 2001). In questo lavoro, la fusione del 2F5e all'estremità N-terminale della CP del virus X della patata (PVX) ha consentito la produzione di particelle virali chimeriche (CVP) che esponevano sulla loro superficie il peptide immunogenico. L'immunizzazione di modelli murini con le CVP (purificate da tessuto fogliare infetto) sia per via intraperitoneale che

intranasale ha indotto una risposta anticorpale neutralizzante sia in topi normali che umanizzati (Hu-PBL-SCID) (Marusic *et al.*, 2001).

Nonostante gli eccellenti risultati, l'utilizzo di CVP, quindi di particelle capaci di replicarsi solleva notevoli problemi di impatto ambientale e biosicurezza (Sainsbury *et al.*, 2010), da qui l'esigenza di sviluppare sistemi di presentazione di epitopi immunogenici alternativi e più sicuri come le VLP.

3.5 Elaborazione dei modelli *in silico*

Questa parte della tesi è stata concepita e coordinata dalla Dr.ssa Caterina Arcangeli dell'ENEA. L'elaborazione del modello bioinformatico della VLP *wild type* è stata di fondamentale importanza per l'individuazione di siti, all'interno della CP virale, utili per l'inserimento delle sequenze eterologhe (epitopi d'interesse) senza perturbare il corretto assemblaggio delle particelle simil-virali. La realizzazione dei modelli è stata eseguita utilizzando un approccio computazionale noto come *structure-based design*. In questo tipo di studi la conoscenza della struttura terziaria di una proteina riveste un'importanza fondamentale. Infatti, il disegno computazionale è possibile qualora si disponga di dati strutturali riguardanti la proteina d'interesse o in alternativa di proteine simili. Nel nostro caso, poichè la CP dell'AMCV non è stata ancora cristallizzata, si è proceduto alla predizione della struttura terziaria della proteina partendo dalla sua sequenza amminoacidica seguendo un approccio noto come *homology modeling*. Questa strategia consente la determinazione della struttura terziaria di una proteina X (proteina *target*), utilizzando come riferimento una proteina omologa a struttura nota (proteina *templato*). La ricerca in banca dati di proteine del capsido di altri *Tombusvirus*, la cui struttura fosse stata determinata ad alta risoluzione, e il successivo allineamento hanno mostrato che la sequenza con la somiglianza più elevata appartiene alla CP del TBSV con il 71,2% di identità sull'intera sequenza amminoacidica della CP (Figura 28).

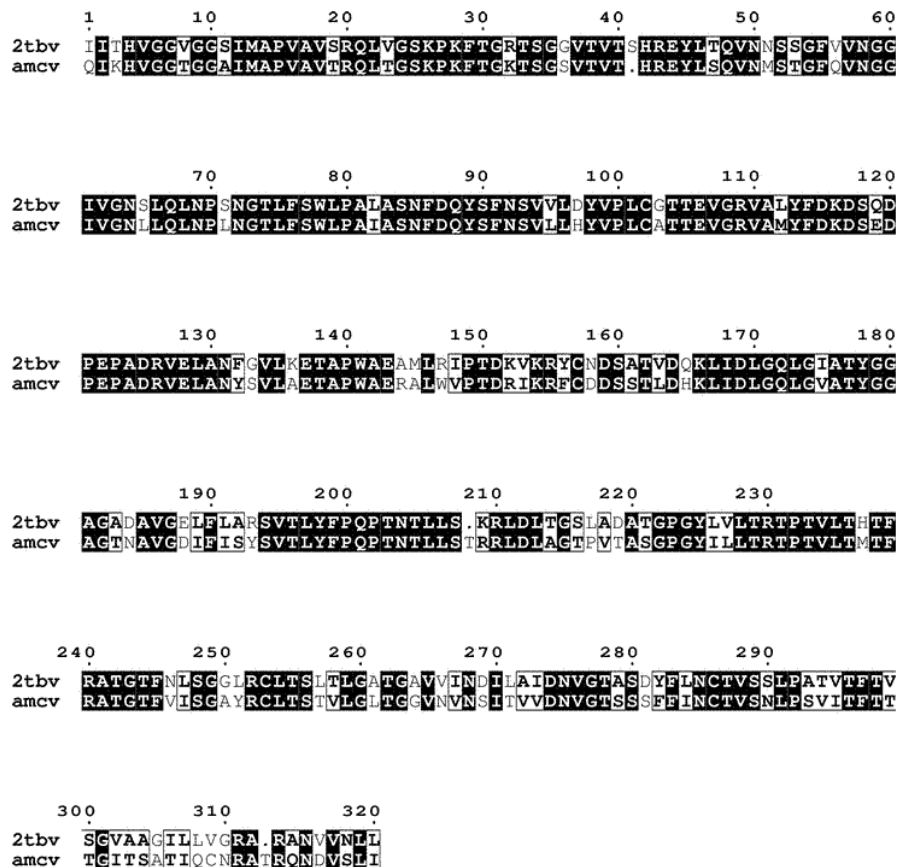


Figura 28. Allineamento di sequenze amminoacidiche.

In figura è riportato l'allineamento delle sequenze amminoacidi delle proteine del capsido del TBSV (2tbsv) e dell'AMCV (amcv). In nero sono evidenziati gli amminoacidi conservati tra le due sequenze.

Nell'elaborazione del modello *in silico* si è tenuto conto del fatto che l'AMCV è un virus icosaedrico con simmetria T=3 (Figura 29A, 29B), in cui la subunità asimmetrica (asCP), è formata da molecole di CP che sebbene identiche assumono tre differenti strutture tridimensionali (A, B, C) (Figura 29C). Al fine di costruire il modello della asCP è stato effettuato l'allineamento della CP del TBSV con la CP dell'AMCV in ognuna delle tre conformazioni A, B e C (dati non mostrati).

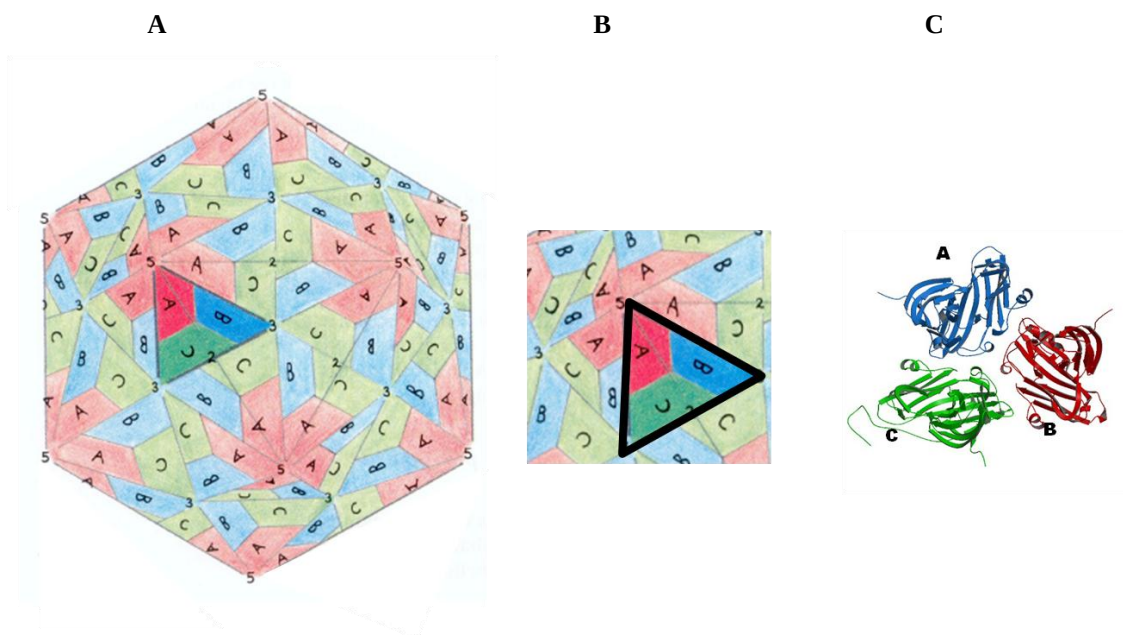


Figura 29. Rappresentazione schematica di un virus icosaedrico con simmetria T=3.

A) Icosaedro con simmetria T=3: l'icosaedro è un oggetto simmetrico costituito da venti triangoli equilateri, o facce equivalenti che sono messe tra di loro in relazione mediante operazioni di simmetria. Le facce o tessere triangolari, hanno tre assi di simmetria (tre rotazioni) e perciò dato che ci sono venti tessere il numero totale di unità di un icosaedro è $20 \times 3 = 60$. Queste unità sono chiamate subunità asimmetriche, perciò un icosaedro, e di conseguenza un virus con simmetria icosaedrica, è costituito da 60 unità asimmetriche. Quindi sono richieste almeno 60 proteine per formare un rivestimento virale con simmetria icosaedrica. In generale un capsido formato soltanto da 60 proteine risulta piccolo per contenere tutta l'informazione genetica necessaria al virus. Per mantenere la simmetria icosaedrica e formare dei virioni più grandi l'unico sistema è aumentare il numero di subunità all'interno dell'unità asimmetrica. Dato che il numero delle unità asimmetriche è 60, il numero totale delle subunità (proteine) deve essere un multiplo di 60. Questo multiplo è chiamato numero di Triangolazione, T. Spesso ci si riferisce alla struttura dei virus icosaedrici in termini del loro numero di triangolazione; T = 3 implica che il numero di sub-unità del capsido icosaedrico sia $60 \times 3 = 180$. B) Tre subunità identiche A, B e C formano la struttura di base, la subunità asimmetrica. C) le tre catene polipeptidiche identiche A, B e C adottano tre strutture tridimensionali differenti quando interagiscono per formare l'unità asimmetrica..

Utilizzando il programma Modeller v 9.4 (Fiser *and* Sali 2003) sono stati generati 30 modelli della asCP. La similarità e l'accuratezza strutturale tra la subunità asimmetrica del TBSV (templato) e quella dell'AMCV (target) sono state valutate considerando i valori di *root mean square deviation* (rmsd, deviazione quadratica media) che misura la distanza media tra gli atomi delle strutture sovrapposte e considerando che valori di rmsd < 1 indicando modelli accettabili.

I risultati ottenuti sono riportati nel grafico in figura 30, dove i numeri in ascissa indicano i 30 modelli e in ordinata è riportato il valore di rmsd. Tutti i modelli elaborati, tranne due, i n° 4 e 16, hanno mostrato valori piuttosto bassi di rmsd (Figura 30), a causa della grande somiglianza tra la struttura templato e quella *target*.

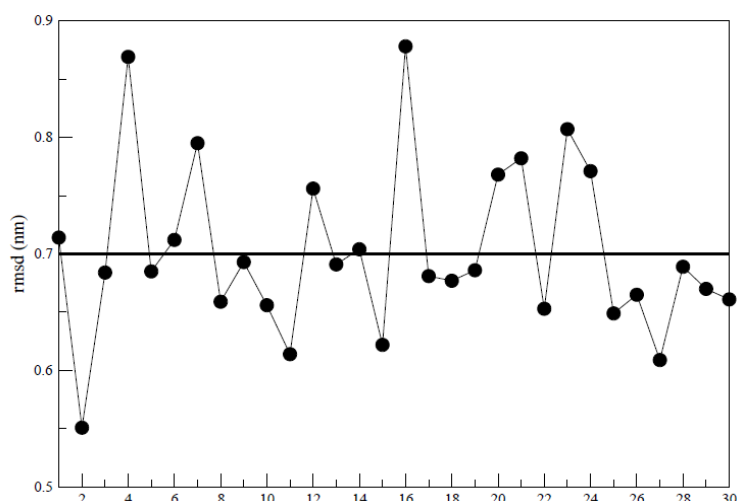


Figura 30. Rappresentazione grafica dei valori di rmsd dei 30 modelli di asCP.

Valori di rmsd espressi in nm (in ordinata) calcolati dal programma Modeller per ognuno dei 30 modelli elaborati (numeri da 1 a 30 in ascissa).

Il modello dell'intera VLP (Figura 31) è stato realizzato utilizzando la asCP nella conformazione geometrica ottenuta dal modello n° 2 (rmsd <0.6 nm), utilizzando il *database* dei virus icosaedrici (VIPERdb).

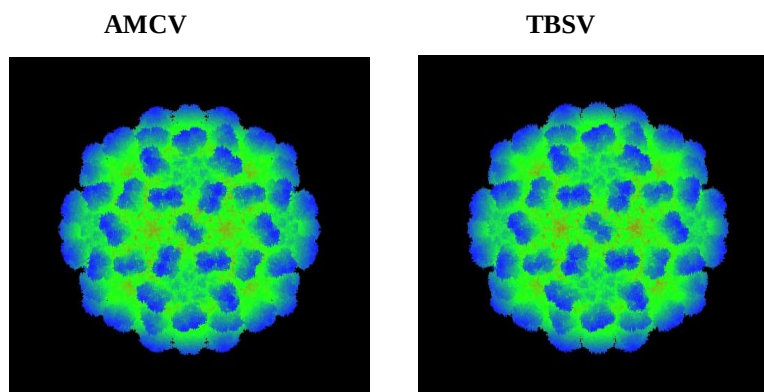


Figura 31. Modelli *in silico* delle VLP. AMCV: modello della VLP WT dell'AMCV; TBSV: modello della VLP del TBSV depositata nel database dei virus icosaedrici (<http://viperdbscripps.edu/>).

3.5.1 Sviluppo di modelli di VLP chimeriche

I modelli strutturali delle VLP chimeriche che espongono gli epitopi di interesse sono stati realizzati in maniera analoga a quanto fatto per la VLP WT.

I primi ad essere realizzati sono stati i modelli delle VLP che espongono il *loop* V3 della gp120. Per comprendere il lavoro svolto è necessario ricordare che ogni singola proteina del capsido è costituita da tre domini strutturali: un dominio R interno, disordinato nella struttura, una regione (a) che connette R con il dominio S, che forma il rivestimento virale,

ed infine il dominio P rivolto verso l'esterno del virione (Figura 32A). Le caratteristiche strutturali del dominio P (presenza di *loops*) sono risultate di fondamentale importanza per ottenere particelle chimeriche che espongono sulla loro superficie peptidi immunogenici (Olson *et al.*, 1983). In particolare, avendo scelto un epitopo di 14 aminoacidi con conformazione a *loop*, si è pensato di sfruttare i *loops* del dominio P della CP come possibili siti d'inserzione.

Per individuare possibili siti d'inserzione, è stata eseguita un'accurata analisi strutturale dell'intera VLP WT. In particolare prendendo in considerazione parametri fisici e strutturali, sono stati selezionati residui aminoacidici in cui la sequenza della CP poteva essere interrotta. Per quanto riguarda i parametri fisici è stata valutata l'accessibilità al solvente che è indicativa della esposizione verso l'esterno di una data regione della proteina mentre considerando la funzione strutturale sono stati esclusi tutti i residui aminoacidici coinvolti nelle interazioni tra le asCP e quelli implicati nella formazione di strutture secondarie ritenute fondamentali per la stabilità della VLP.

Questo tipo di analisi *in silico* ha consentito l'individuazione di 5 putativi siti di inserimento del *loop* V3 all'interno della CP (Figura 32B).

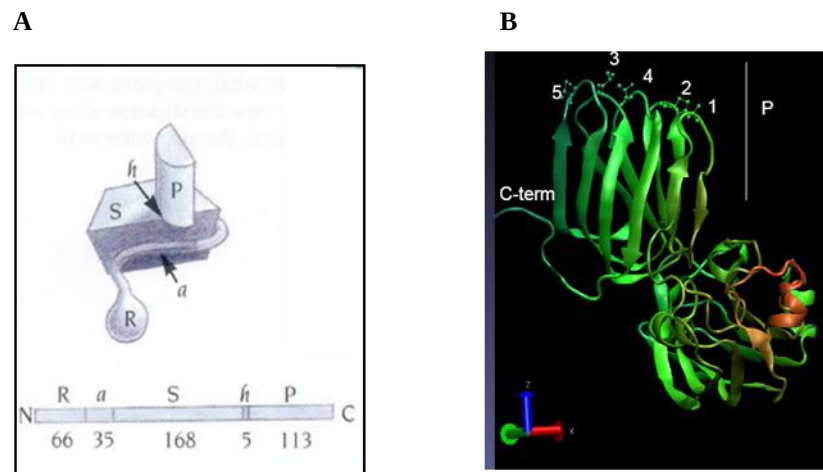


Figura 32. Domini strutturali della CP di AMCV.

A) Domini strutturali della CP del TBSV: partendo dall'estremità N-terminale troviamo il dominio R (*Random*, R) interno, disordinato nella struttura che contiene siti di legame con l'RNA virale, una braccia (*arm*, a) che connette il dominio R con il dominio S (*Shell*, S), il quale forma il pavimento del capsido virale, ed infine il dominio P (*Protruding*, P) che sporge verso l'esterno del capsido; B) I possibili siti per l'inserzione dell'epitopo V3 nel dominio P sono indicati con i numeri da 1 a 5. C-term: C-terminale.

Per ognuno dei 5 siti individuati sul dominio P, sono stati ottenuti 30 modelli come descritto nel capitolo Materiali e Metodi (Paragrafo 2.11). Le cinque chimere prodotte *in*

silico sono state denominate V3pos1, V3pos2, V3pos3, V3pos4, V3pos5 (Figura 33). La probabilità di successo sperimentale di ciascuno dei 5 putativi siti d'inserzione è stata valutata prendendo come riferimento i valori di rmsd. L'introduzione del peptide V3 in posizione 1 (V3pos1) (Figura 33) dovrebbe essere totalmente sfavorita come evidenziato dal fatto che il programma fallisce nella elaborazione di ben 27 su 30 modelli richiesti (dati non mostrati). La posizione 2 (V3pos2) sembra avere probabilità di successo leggermente superiori a quelle calcolate per la posizione 1 (14 modelli elaborati su 30 richiesti). Tuttavia tutti i modelli ottenuti mostrano valori molto alti di rmsd (> 5.5 nm), indicando che tali modelli si discostano molto dal template di partenza. L'inserimento nella posizione 3 consente di ottenere ben 21 su 30 dei modelli (V3pos3) richiesti ma in questo caso 17 presentano valori di rmsd accettabili. I risultati ottenuti per la posizione 4 (V3pos4) indicano che dei 23 modelli costruiti, 11 presentano valori di rmsd accettabili, mentre i rimanenti 12 modelli hanno valori superiori a 5.0 nm. La posizione 5 (V3pos5) è quella per cui è stato possibile elaborare il maggior numero di modelli (26 su 30), tuttavia la maggior parte (24 su 26) hanno valori di rmsd inaccettabili (> 5.0 nm). In conclusione, i risultati ottenuti evidenziano che l'inserimento del *loop* V3 dovrebbe essere assolutamente sfavorito nella posizione 1, mentre la posizione 3 avrebbe la più alta probabilità di successo (Figura 33).

Poiché in letteratura era già stata riportata la fusione del peptide V3 all'estremità C-terminale della CP del TBSV (Joelson *et al.* 1997), si è pensato di realizzare anche un sesto modello inserendo il *loop* V3 all'estremità C-terminale della proteina virale (V3-Cter Figura 33). Anche in questo caso, è stato chiesto al programma Modeller di realizzare 30 modelli della VLP chimerica (V3Cter, Figura 33). Per questa posizione Modeller è riuscito a realizzare i 30 modelli richiesti dei quali soltanto 2 hanno valori di rmsd > 1.0 nm.

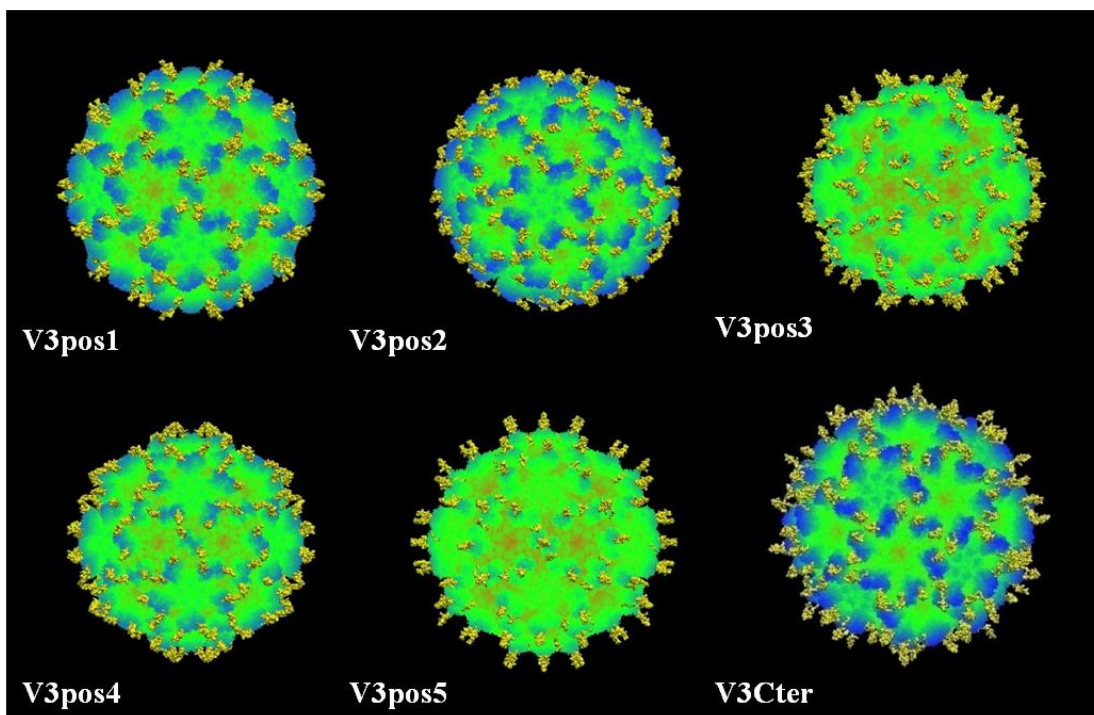


Figura 33. Modello delle VLP chimeriche che espongono il *loop* V3.

I sei modelli realizzati *in silico* sono stati denominati V3pos1, V3pos2, V3pos3, V3pos4, V3pos5 e V3Cter, dove con pos1-5 sono indicati i modelli delle VLP realizzati inserendo il peptide V3 nelle posizioni 1-5 del dominio P (Figura 32B). V3-Cter è il modello realizzato fondendo il peptide V3 all'estremità C-terminale della CP. Il peptide V3 è stato evidenziato in giallo.

Per la costruzione del modello della VLP che espone l'epitopo lineare 2F5 (ELDKWA) della gp41, è stato scelto come sito utile per la fusione alla CP l'estremità C-terminale. Anche in questo caso, è stato chiesto al programma Modeller di realizzare 30 modelli della VLP chimerica (VLP-2F5, Figura 34). I valori di rmsd (< 0.8 nm) di 24 dei 30 modelli ottenuti indicano che la fusione dell'epitopo all'estremità C-terminale della CP consente alla VLP chimerica di mantenere una struttura simile al templatò e di conseguenza non dovrebbe interferire con l'assemblaggio e la stabilità della VLP.

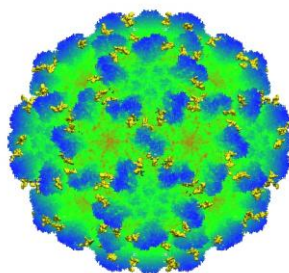


Figura 34. Modello della VLP-2F5.

In giallo sono indicati gli epitopi 2F5 esposti sulla superficie della VLP.

3.6 Realizzazione dei costrutti per l'espressione delle CP chimeriche

Sulla base delle indicazioni fornite dall'analisi bioinformatica, sono stati realizzati alcuni costrutti per verificare la concordanza tra risultati *in silico* e la sperimentazione *in vivo*. Per quanto riguarda le VLP chimeriche che espongono il *loop* V3 sono stati realizzati due costrutti che hanno previsto la fusione del peptide immunogenico in posizione 1 e 3 del dominio P della CP (Figura 33, V3pos1 e V3pos3) e per le quali la previsione era rispettivamente di bassa e alta probabilità di successo. Inoltre, è stato preparato un terzo costrutto in cui il *loop* V3 è stato fuso all'estremità C-terminale della CP (Figura 33, V3-Cter).

Per quanto riguarda l'epitopo 2F5 è stato il costrutto, in cui la sequenza esogena (ELDKWA) è stata fusa all'estremità C-terminale della CP.

Le mappe dei quattro costrutti sono riportate in figura 35, mentre i dettagli tecnici per la loro realizzazione è descritta nel capitolo Materiali e Metodi (Paragrafo 2.4.20).

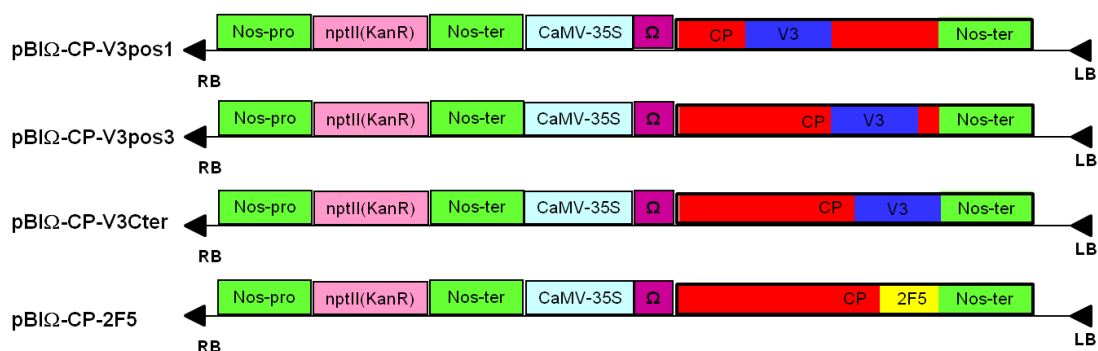


Figura 35. Mappe dei costrutti realizzati per l'espressione delle VLP chimeriche in pianta.

pBIΩ-CP-V3pos1, pBIΩ-CP-V3pos3 e pBIΩ-CP-V3Cter: costrutti contenenti le sequenze codificanti per le CP chimeriche in cui il peptide V3 è stato inserito rispettivamente nelle posizioni 1, 3 del dominio P e all'estremità C-terminale della CP. pBIΩ-CP-2F5: costrutto contenente la sequenza codificante la CP chimerica in cui il peptide 2F5 è stato fuso all'estremità C-terminale della CP.

3.7 Espressione transiente delle CP chimeriche

Allo scopo di valutare l'espressione delle CP chimeriche e l'eventuale formazione di VLP si è proceduto all'agroinfiltrazione di foglie di *N. benthamiana* utilizzando il sistema di espressione basato sull'uso dell'inibitore del *silencing* p19AMCV messo a punto nel nostro laboratorio (Lombardi *et al.*, 2009).

3.7.1 Analisi dell'espressione della CP-2F5

L'espressione delle CP chimeriche che espongono il peptide 2F5 è stata verificata inizialmente tramite saggio ELISA degli estratti proteici ottenuti da campioni di foglie agroinfiltrate con la combinazione pBIΩ-CP-2F5/p19AMCV e campionate a 9 dpi. Gli

estratti sono stati analizzati sia con l'anticorpo monoclonale murino mAb F8, diretto contro la CP dell'AMCV (Tavladoraki *et al.*, 1993), che con il monoclonale umano mAb 2F5 specifico per l'epitopo di HIV (Purtscher *et al.*, 1994). I risultati ottenuti con il mAb F8 indicano che la proteina chimerica mantiene le caratteristiche strutturali della CP nativa (Figura 36A). Il riconoscimento da parte del mAb 2F5 (Figura 36B) evidenzia che l'epitopo 2F5 è presente e ben esposto sulla CP chimerica.

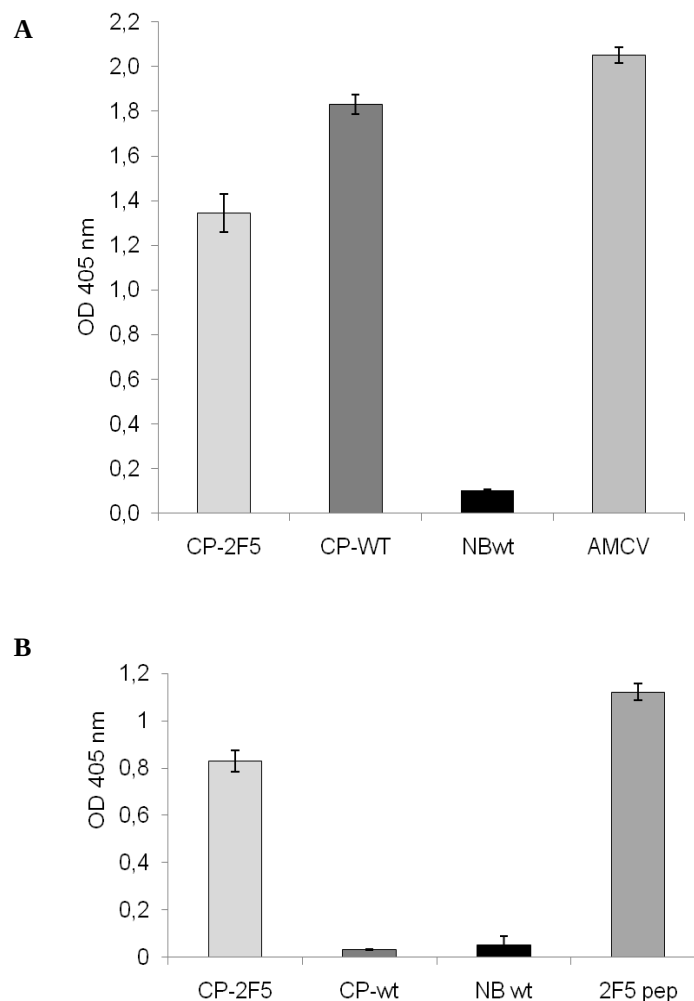


Figura 36. Espressione della CP chimerica che espone l'epitopo 2F5.

L'espressione della CP-2F5 è stata verificata mediante saggio ELISA di estratti da tessuti agroinfiltrati e campionati a 9 dpi. A) Analisi degli estratti con il mAb F8; B) Analisi degli estratti con il mAb 2F5. CP-wt: estratto di piante agroinfiltrate con la combinazione pBIQ-CP/p19AMCV; CP-2F5: estratto di piante agroinfiltrate con la combinazione pBIQ-CP-2F5/p19AMCV; NBwt: estratto di piante non agroinfiltrate; AMCV: virus AMCV purificato; 2F5pep: peptide contenente al suo interno la sequenza ELDKWA dell'epitopo 2F5. Gli estratti proteici totali sono stati normalizzati rispetto al contenuto di proteine totali solubili. I valori di OD₄₀₅ sono la media ($\pm$ D.S.) di quelli ottenuti in tre esperimenti indipendenti.

Allo scopo di visualizzare l'eventuale presenza di VLP negli estratti di foglie agroinfiltrate è stata effettuata un'analisi ISEM (*immunosorbent electron microscopy*) sull'estratto grezzo, utilizzando i mAb 2F5 e F8. I risultati, mostrati in figura 37, hanno rivelato la presenza di VLP chimeriche (Figura 37B) morfologicamente simili alle VLP WT (Figura 37A) nell'estratto di foglie agroinfiltrate. Quindi la CP chimerica (CP-2F5) mantiene la capacità di autoassemblarsi in VLP come predetto dai modelli *in silico*.

Considerando i risultati ottenuti, la fase successiva del progetto consisterà nella purificazione di VLP-2F5 in quantità sufficienti per effettuare studi immunologici su modelli murini. Allo scopo di verificare la capacità delle VLP-2F5 nell'indurre la produzione di anticorpi neutralizzanti, un gruppo di topi verrà immunizzato con le particelle virali chimeriche PVX-2F5 (derivate dal PVX) ottenute in precedenza nel nostro laboratorio (Marusic *et al.*, 2001). Il confronto tra i due sistemi di presentazione di epitopi sarà fondamentale per validare le VLP derivate dall'AMCV come nuovi *carriers* per la produzione di componenti vaccinali.

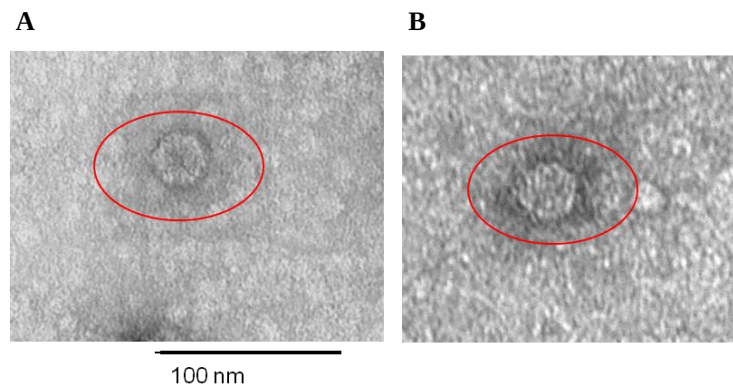


Figura 37. Analisi ISEM di estratti di foglie agro infiltrate.

Fotografie al microscopio elettronico delle VLP WT (A) e VLP-2F5 (B) evidenziate mediante analisi ISEM.

3.7.2 Analisi dell'espressione delle CP-V3

L'espressione delle CP chimeriche per il peptide V3 è stata verificata tramite saggio ELISA degli estratti proteici di foglie agroinfiltrate con i costrutti pBIΩ-CP-V3pos1 e pBIΩ-CP-V3pos3 e campionate a 9 dpi (Figura 35). Gli estratti sono stati analizzati utilizzando il monoclonale murino mAb F8 e due monoclonali umani diretti contro i due epitopi neutralizzanti (KRIHI e HIGPGR) contenuti nel *loop* V3 (Huang *et al.*, 2005). I risultati ottenuti con il mAb F8 e riportati in figura 38A evidenziano bassi livelli di espressione sia della CP-V3pos1 che della CP-V3pos3. Risultati simili sono stati ottenuti con i due monoclonali umani (Figura 38B e 38C). Sulla base dell'analisi bioinformatica ci si aspettava che la fusione in posizione 1 avrebbe dovuto avere meno possibilità di successo di quella in posizione 3. Questi risultati preliminari ottenuti sembrano indicare che indipendentemente dalla posizione, l'inserimento del peptide V3 all'interno della CP interferisce con il suo corretto ripiegamento e di conseguenza con la sua capacità di autoassemblarsi. Un'ipotesi che potrebbe spiegare i risultati inaspettati, è che la fusione del *loop* V3 alla CP determini variazioni di conformazione dei due epitopi (KRIHI e HIGPGR) tali da impedire il riconoscimento da parte degli anticorpi specifici (Figura 38B e 38C). Analogamente la fusione della CP al peptide eterologo potrebbe mascherare il sito di legame con l'anticorpo mAb F8.

Nel caso fosse verificato che la CP-V3pos3 è espressa ma non riesce ad autoassemblarsi in VLP, il problema potrebbe essere superato inducendo l'espressione contemporanea di molecole di CP WT e CP chimeriche all'interno della stessa cellula effettuando l'agroinfiltrazione con opportune combinazioni di colture di agrobatterio (pBIΩ-CP+ pBIΩ-CP-V3pos3+ pBIΩ-p19AMCV). Infatti, dati in letteratura hanno evidenziato che la presenza di molecole di CP WT può favorire la formazione di virioni chimerici stabilizzandone la struttura (Cruz *et al.*, 1996).

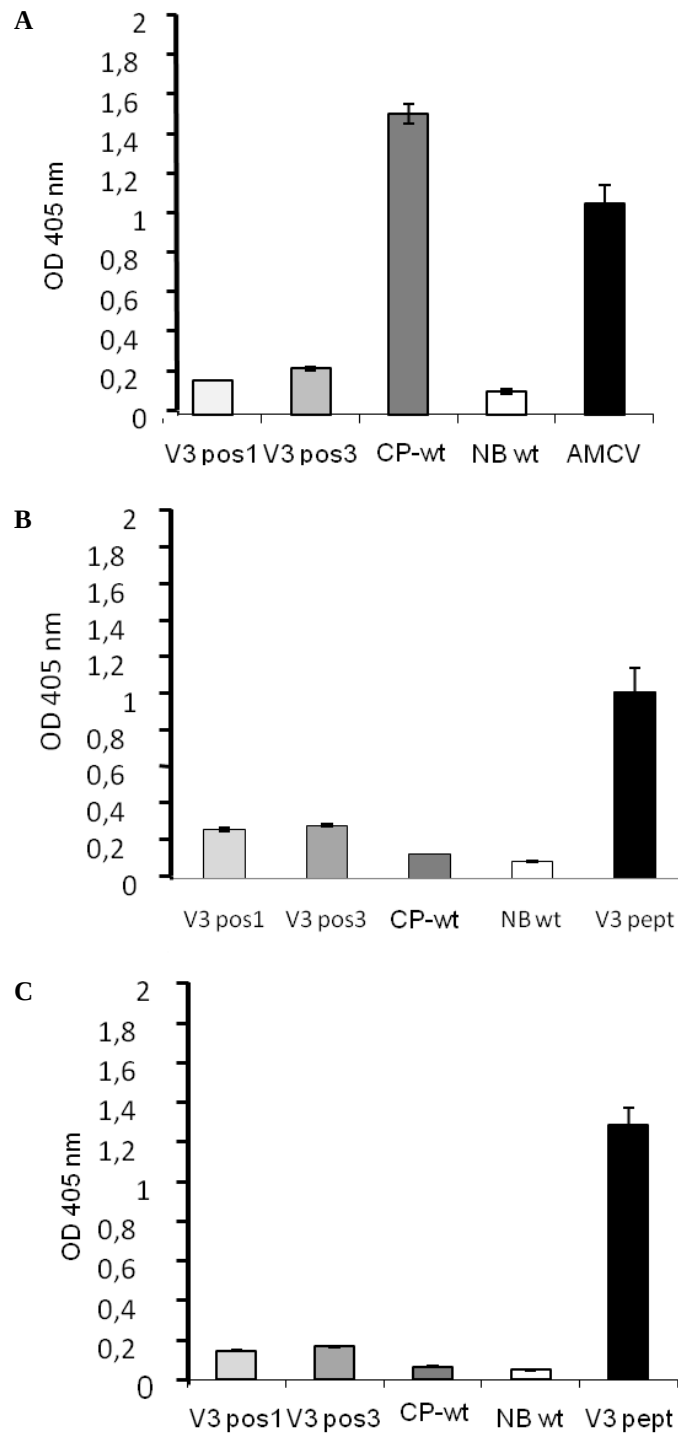


Figura 38. Espressione delle CP chimeriche che espongono il peptide V3.

L'espressione della CP-V3pos1 e CP-V3pos3 è stata verificata mediante saggio ELISA di estratti da tessuti agroinfiltrati e campionati a 9 dpi. A) Analisi degli estratti con l'anticorpo monoclonale murino mAb F8 diretto contro la CP; B) Analisi degli estratti con l'anticorpo monoclonale umano mAb anti-V3 ARP 3023 contro l'epitopo KRIHI; C) Analisi degli estratti con il monoclonale umano mAb anti-V3 ARP 3024 diretto contro l'epitopo HIGPGR. CP-wt: estratto di piante agroinfiltrate con la combinazione pBIΩ-CP/p19AMCV; V3pos1: estratto di piante agroinfiltrate con la combinazione pBIΩ-CP-V3pos1/p19AMCV; V3pos3: estratto di piante agroinfiltrate con la combinazione pBIΩ-CP-V3pos3/p19AMCV; NBwt: estratto di piante non agroinfiltrate; AMCV: virus AMCV purificato; V3 pep: peptide contenente al suo interno la sequenza del *loop* V3. Gli estratti proteici totali sono stati normalizzati rispetto al contenuto di proteine totali solubili. I valori di OD₄₀₅ sono la media (± D.S.) di quelli ottenuti in tre esperimenti indipendenti.

3.8 Studi di *swelling in-vitro* del virus AMCV

La formazione di VLP derivate da virus vegetali in sistemi di espressione ricombinanti, è ormai nota e ben documentata, ma lo studio dei fattori (interazione RNA-CP, variazioni di pH, forza ionica e concentrazioni di cationi divalenti) che ne regolano l'assemblaggio e ne influenzano la stabilità costituisce un campo di ricerca aperto. Parte del lavoro di questa tesi si è focalizzato sull'individuazione dei principali fattori responsabili della stabilità dei virioni e di conseguenza delle VLP. In particolare, sono stati presi in considerazione la variazione delle interazioni CP-CP e CP-RNA virale in differenti condizioni di pH, forza ionica e in diverse concentrazioni di cationi divalenti.

3.8.1 Esperimenti di disassemblaggio del virus AMCV

Campioni di virioni purificati (circa 3.0 mg) diluiti in tampone sodio acetato pH5.0 (in cui il virus AMCV è stabile) sono stati dializzati secondo le modalità riportate nella sezione Materiali e Metodi contro tamponi differenti, per verificare la possibilità di ottenere, *in vitro*, la dissociazione completa o parziale dei virioni, e quindi il rilascio di complessi macromolecolari o addirittura di CP in forma monomerica. Di seguito sono riportati i risultati ottenuti utilizzando i protocolli 3 e 4 (Tabella 4).

Tabella 4. Protocolli utilizzati negli esperimenti di disassemblaggio dei virioni purificati

	<u>Tampone</u>	<u>Rimozione dell' RNA virale</u>	<u>Bibliografia</u>
3	1.0M NaCl, 0.05M Tris HCL pH 7.5, 0.001M EDTA, 0.001M DTT	Mediante precipitazione con 4M CaCl ₂ , incubazione 15' a 4°C, 12000 x g 15'.	(Ren <i>et al.</i> , 2006)
4	0.5M NaCl, 0.1M Tris HCl, 0.005M EDTA pH8.0	L'RNA non è stato rimosso.	(Sorger <i>et al.</i> , 1986)

Una preparazione di virus purificato è stata dializzata contro il tampone 3 che ha un pH (7.5) basico rispetto a quello in cui il virus è stabile (pH 5.0). Ipotizzando che il tampone avesse determinato o un'espansione (*swelling*) o la dissociazione dei virioni, alla soluzione è stato aggiunto un uguale volume di cloruro di calcio per allontanare l'RNA virale mediante ultracentrifugazione. Per verificare l'avvenuta precipitazione dell'RNA, il precipitato ottenuto è stato analizzato su gel d'agarosio. I risultati ottenuti hanno dimostrato, come atteso, la presenza dell'acido nucleico soltanto nel precipitato (Figura 39 campioni 2 e 4).

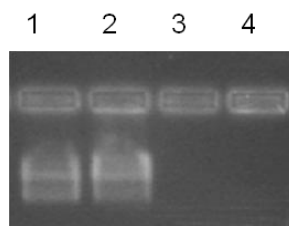


Figura 39. Gel d'agarosio colorato con etidio bromuro.

Campione 1: RNA estratto da virioni non trattati; campione 2: analisi del precipitato; campione 3: pozzetto vuoto; campione 4: analisi del supernatante dopo precipitazione con cloruro di calcio.

Un'aliquota di supernatante è stata ulteriormente analizzata per verificare il grado di dissociazione del virione. A questo scopo il campione è stato filtrato attraverso un'unità filtrante (*Microcon* YM-100, Amicon), in grado di far passare proteine con un peso molecolare minore di 100 kDa (Figura 40B) e quindi in grado di separare l'eventuale forma monomerica della CP (41 kDa) dagli aggregati macromolecolari. In seguito, il volume trattenuto ed il volume eluito dalla colonna (Figura 40B) sono stati analizzati su SDS-PAGE, come controllo sullo stesso gel sono stati caricati un campione di virus non trattato e un campione di virus dializzato tal quale (Figura 40A). I risultati hanno evidenziato la presenza della banda corrispondente alla CP (41 kDa) soltanto nel volume trattenuto e non nell'eluito. Questo risultato unito a quello ottenuto dall'analisi su gel d'agarosio, dimostra che la rimozione dell'RNA virale non ha comportato la dissociazione del virione in monomeri di CP.

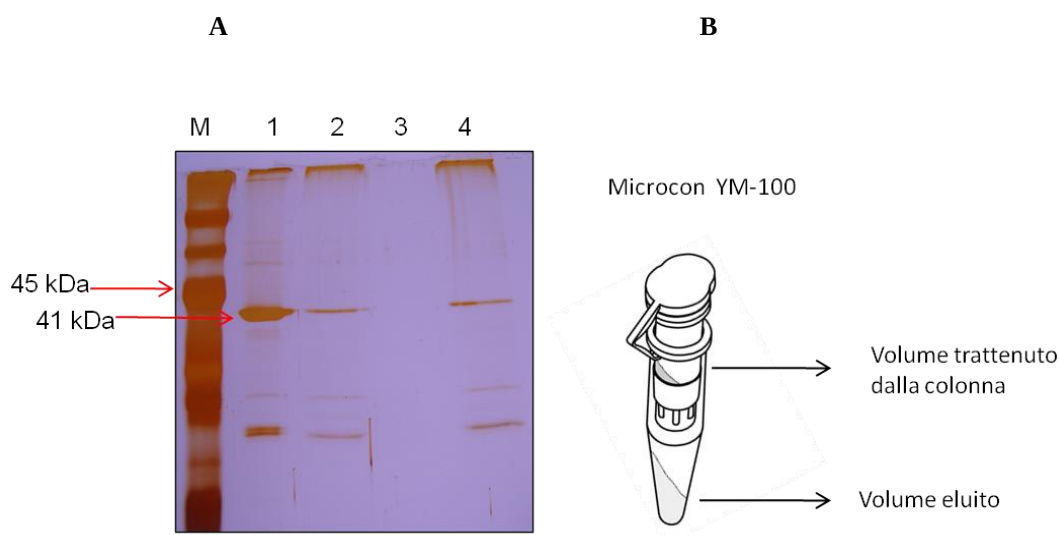


Figura 40. Analisi SDS-PAGE dopo filtrazione attraverso Microcon Y100.

A) Il campione dializzato contro tampone 3 è stato filtrato attraverso Microcon Y100. Il volume trattenuto dalla colonna ed il volume eluito sono stati analizzati su SDS-PAGE colorato con nitrato d'argento. Campione 1: virioni non trattati; campione 2: supernatante dopo dialisi contro il tampone 3; campione 3: volume eluito dall'unità filtrante Microcon YM 100; campione 4: volume trattenuto dalla colonna.

B) Rappresentazione schematica dell'unità filtrante Microcon YM 100.

Una seconda aliquota di virus purificato è stata dializzata contro il tampone 4 e successivamente analizzata come descritto per il virus in tampone 3. I risultati ottenuti sono stati del tutto paragonabili a quelli appena descritti, è stato quindi deciso di passare alla caratterizzazione biochimica del campione in tampone 4.

3.8.2 Analisi FPLC

Il campione dializzato contro il tampone 4 è stato caratterizzato mediante analisi FPLC (*Fast protein liquid chromatography*). Il cromatogramma riportato in Figura 41A evidenzia due picchi uno a 1.13 ml e uno a 2.66 ml. Questo risultato è stato paragonato con quello ottenuto con il virus non trattato (Figura 41B) in cui l'analisi evidenzia come atteso la presenza di un solo picco di eluizione a 1.15 ml corrispondente al virione assemblato. Il profilo di eluizione delle proteine utilizzate come standard di calibrazione (Figura 41C), ha consentito di calcolare il peso molecolare del secondo picco (a 2.66 ml) del campione dializzato che è risultato essere di circa 13.7 kDa e quindi molto inferiore a quello della CP (41 kDa) in forma monomerica. L'ipotesi più plausibile è che questo componente a basso peso molecolare derivi dalla parziale degradazione del campione.

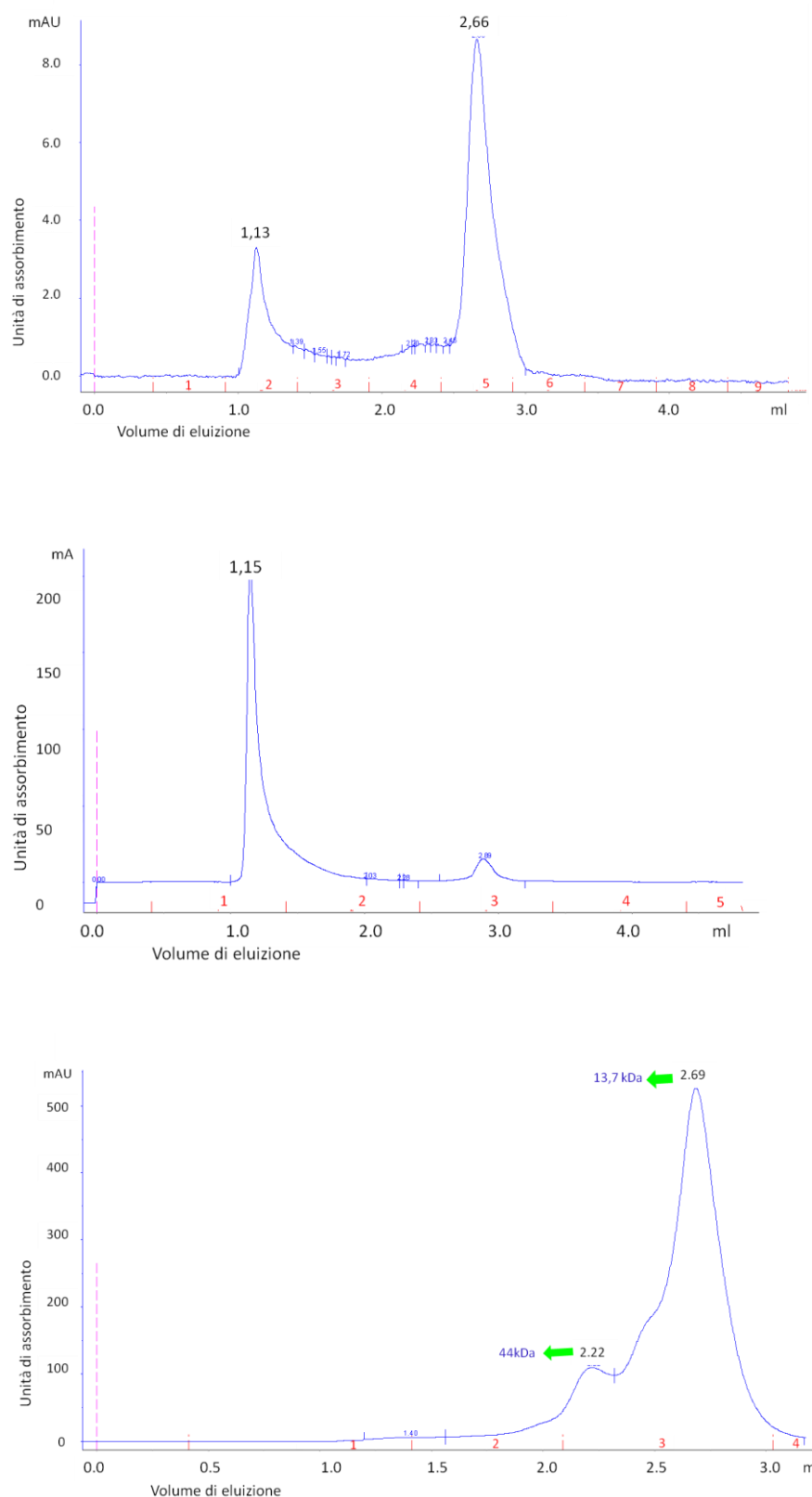


Figura 41. Analisi FPLC. In figura sono riportati i cromatogrammi relativi all'analisi FPLC. A) Campione in tampone 4; B) virus non trattato utilizzato come controllo; C) miscela di ribonucleasi (13.7 kDa) e ovalbumina (44.0 kDa) utilizzate come marcatori di peso molecolare. I numeri in rosso sull'asse delle ascisse indicano le frazioni raccolte. Sull'asse delle ascisse sono riportati i volumi eluiti espressi in ml, mentre sull'asse delle ordinate sono riportate le unità di assorbimento a 280nm (mAU). Su ogni picco di eluizione è indicato il volume corrispondente.

I risultati ottenuti hanno confermato che è possibile separare l'RNA dal capside virale senza che quest'ultimo perda la sua integrità. È stato ipotizzato che l'aumento del pH (da 5.0 a 7.5-8.0), la rimozione di catione divalenti (effettuata mediante aggiunta di EDTA) e l'aumento della forza ionica (ottenuto mediante aggiunta di NaCl) (tamponi 3 e 4, tabella 14) provochino lo svuotamento dei virioni mediante allontanamento dell'RNA senza che questo comporti la dissociazione in monomeri di CP.

Studi in letteratura dimostrano che sia possibile ottenere rimozione dell'RNA da un virus vegetale, senza il completo disassemblaggio del virione. Un esempio è rappresentato dal CCMV, studiato *in vitro* come sistema modello per studiare le interazioni CP-CP e CP-RNA da cui dipendono il disassemblaggio e il riassemblaggio dei virioni (Zhao *et al.*, 1995; Fox *et al.*, 1998; Douglas and Young, 1998). In questi lavori, virioni di CCMV purificati sono risultati stabili a valori di pH compresi tra 3.0 e 6.0 e in condizioni di bassa forza ionica, mentre si disassemblano ad alta forza ionica e pH superiore a 7.0. Inoltre, i virioni di CCMV subiscono un'espansione radiale del 10%, con rilascio di RNA, quando la forza ionica è bassa e il pH si alza sopra 7 (Speir *et al.*, 1995).

Non tutti i virus vegetali riescono a rimanere assemblati quando viene rimosso l'RNA. Un lavoro molto interessante che correla l'assemblaggio delle proteine di rivestimento virali e l'RNA per la formazione di capsidi icosaedrici è stato condotto durante gli anni ottanta dal gruppo di Sorger dell'Università di Harvard (Sorger *et al.*, 1986). Nello studio è stata effettuata la dissociazione del virus della piega della rapa (*Turnip Crinkle Virus* TCV), ad elevati valori di pH e forza ionica. I prodotti di questa dissociazione sono stati dimeri di CP, un complesso ribonucleoproteico che contiene l'RNA virale e sei sub-unità di CP (Sorger *et al.*, 1986).

3.8.3 Analisi al microscopio elettronico

Lo stesso campione analizzato mediante FPLC è stato esaminato al microscopio elettronico (Figura 42). Le particelle assemblate visualizzate dalla colorazione con acetato di uranile (Figura 42B), hanno una morfologia esterna del tutto simile a quella del virus non trattato, utilizzato come controllo (Figura 42A). A differenza dei virioni completi, le VLP così ottenute sono permeabili alla colorazione utilizzata come evidenziato dalla presenza di una zona centrale grigio scura (Figura 42B). È noto che questa caratteristica sia propria di particelle vuote, cioè prive di acido nucleico al loro interno (Hammond *et al.*, 2010). In conclusione, l'analisi al microscopio elettronico ha confermato la possibilità di svuotare i

virioni (mediante allontanamento dell'RNA) senza che questo comporti la dissociazione del capsido in monomeri di CP.

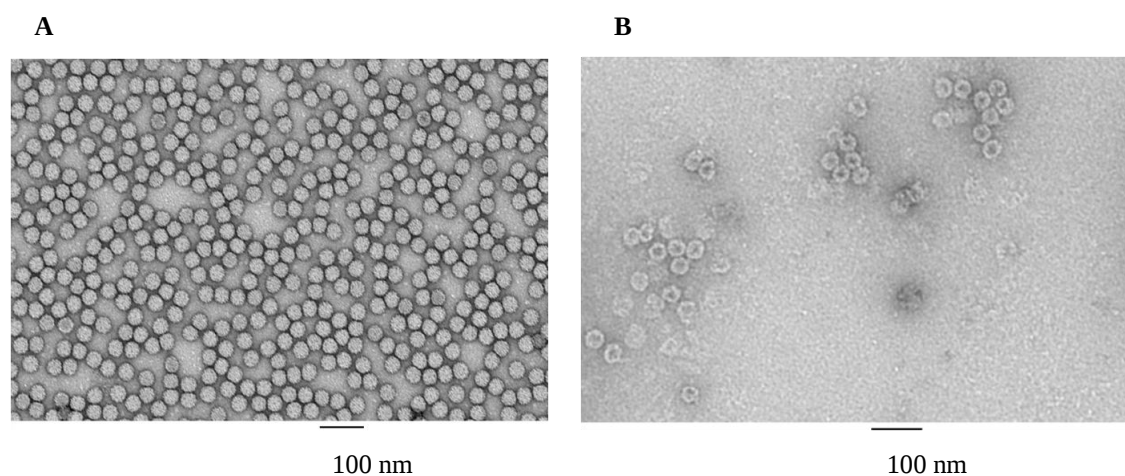


Figura 42. Analisi al microscopio elettronico.

In figura sono riportate le immagini al microscopio elettronico relative all'analisi dei virioni non trattati (A) e di quelli trattati con il buffer 4 (B). I campioni sono stati colorati con acetato di uranile.

3.8.4 Misure di *Dynamic Light Scattering*

Lo stesso campione analizzato al microscopio elettronico è stato sottoposto a misure di *Dynamic light scattering* (Diffusione della luce in regime dinamico, DLS). La DLS misura le dimensioni delle particelle in soluzione sulla base dell'analisi dei moti browniani (moto disordinato) che ne regolano il movimento. Quando una sorgente luminosa (laser), con una frequenza nota, colpisce le particelle subisce uno *scattering* la cui fluttuazione nel tempo dipende dalla velocità di movimento delle particelle (particelle più piccole saranno più veloci), tale variazione viene quindi messa in relazione con le dimensioni della particella. In figura 43 è riportato il confronto tra il profilo di distribuzione delle particelle del virus non trattato (in blu) e il profilo ottenuto dal campione dializzato in tampone 4 (in rosso). I risultati evidenziano che la dimensione media (raggio espresso in nm) della maggior parte delle particelle (>90%), in entrambe i campioni, è distribuita intorno ad un'unica dimensione che è pari ad un raggio medio di 18.2 nm per il virus di controllo e di 21.5 nm per le particelle dializzate contro tampone 4.

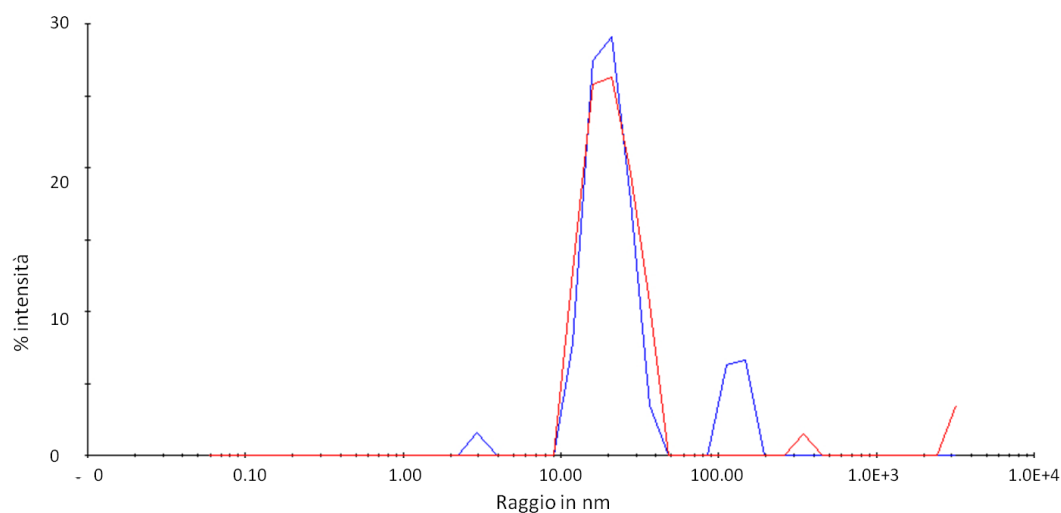


Figura 43. Rappresentazione grafica di analisi DLS.

In ascissa è riportato il valore del raggio medio delle particelle espresso in nm, in ordinata la percentuale (%) di particelle aventi un determinato raggio. In blu i risultati ottenuti per il virus non trattato, in rosso i risultati ottenuti per il campione dopo dialisi in tampone 4.

L'aumento del diametro medio delle particelle trattate, rispetto al virus non trattato, suggeriscono che la dialisi in tampone 4 provochi lo *swelling* (espansione) dei virioni con rilascio dell'RNA come confermato dall'analisi al microscopio elettronico in cui le particelle appaiono vuote. Questo fenomeno che comporta l'espansione e la contrazione è ben documentato in letteratura per i virus vegetali, e sembra strettamente correlato con il rilascio dell'RNA virale durante l'infezione. Un esempio è rappresentato dal CCMV che è stabile a pH 5.0 ma subisce un'espansione radiale del 10% quando il valore di pH è aumentato fino a 7.0 o in assenza di cationi bivalenti (Perez *et al.*, 2000; Tama *et al.*, 2002). Questa espansione, che si ritiene dar luogo ad un intermedio conformazionale durante l'infezione, causa la comparsa di 60 cavità sulla superficie del capsido virale. In seguito a questi cambiamenti conformazionali, i virioni di CCMV si dissociano e rilasciano l'RNA virale (Fox *et al.*, 1998). La conoscenza di questi meccanismi, ha permesso di sviluppare protocolli sperimentali per rimuovere l'acido nucleico per ottenere VLP in grado di funzionare come veri e propri contenitori (Douglas *et al.*, 1998).

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

In questo lavoro di tesi il gene codificante la CP dell'AMCV è stato clonato in opportuni vettori ed espresso in pianta. L'analisi al microscopio elettronico ha consentito di verificare la capacità della proteina virale di autoassemblarsi in VLP in cellule vegetali. Inoltre la predizione *in silico* ha consentito l'elaborazione di modelli bioinformatici necessari allo studio della strategia sperimentale per l'inserimento di epitopi immunogenici 2F5 e V3, derivanti dal virus HIV-1. Risultati promettenti sono stati ottenuti per la formazione di VLP chimeriche esprimenti l'epitopo lineare 2F5, mentre ulteriori analisi saranno effettuate per l'inserimento del loop V3.

Una parte molto importante del progetto ha riguardato lo studio dei fattori che regolano la stabilità dei virioni. In particolare, è stato dimostrato che l'aumento di pH, la rimozione di catione divalenti e l'aumento della forza ionica provocano lo *swelling* del virione con contestuale fuoriuscita dell'RNA.

La fase successiva del progetto consisterà nella purificazione di VLP-2F5 in quantità sufficienti per effettuare studi immunologici su modelli murini, allo scopo di verificare la capacità delle VLP-2F5 nell'indurre una risposta neutralizzante. Per quanto riguarda la produzione di VLP-V3 saranno effettuate agroinfiltrazioni miste per verificare se la presenza di molecole di CP-WT può aiutare l'assemblaggio di VLP chimeriche. Inoltre, in collaborazione con il prof. Lomosoff saranno effettuati ulteriori studi sullo *swelling* dei virioni di AMCV, e saranno messi a punto dei metodi per sfruttare le particelle virali vuote ottenute come "contenitori" biologici per applicazioni nel campo della nanomedicina.

BIBLIOGRAFIA

- Aljabali AA, Shah SN, Evans-Gowing R, Lomonossoff GP, Evans DJ (2010). Chemically-coupled-peptide-promoted virus nanoparticle templated mineralization. *Integr Biol.* 3:119-125.
- Azizi A, Diaz-Mitoma F (2007). Viral peptide immunogens: current challenges and opportunities. *J Pept Sci.* 13: 776-86.
- Bachmann MF, Rohrer UH, Kündig TM, Bürki K, Hengartner H, Zinkernagel RM (1993). The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 262: 1448–51.
- Bachmann MF, Zinkernagel RM (1997). Neutralizing antiviral B-cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 235–70.
- Bancroft JB, Hiebert E (1967). Formation of an infectious nucleoprotein from protein and nucleic acid isolated from a small spherical virus. *Virology* 32: 354–6.
- Bancroft JB, Wagner GW, Bracker CE (1968). The self-assembly of nucleic acid free pseudo top component for a small spherical virus. *Virology* 33: 146–9.
- Bancroft JB, Bracker CE, Wagner GW (1969). Structures derived from cowpea chlorotic mottle virus and brome mosaic virus protein. *Virology* 38: 324–35.
- Barbante A, Irons S, Hawes C, Frigerio L, Vitale A, Pedrazzini E (2008). Anchorage to the cytosolic face of the endoplasmic reticulum membrane: a new strategy to stabilize a cytosolic recombinant antigen in plants. *Plant Biotechnol J* 6: 560–75.
- Baulcombe DC, Chapman S, Santa Cruz S (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* 7: 1045-53.
- Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B, Schaller H (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene.* 19:327-36.
- Beddows S, Schülke N, Kirschner M, Barnes K, Franti M, Michael E, Ketas T, Sanders RW, Maddon PJ, Olson WC, Moore JP (2005). Evaluating the immunogenicity of a disulfide-stabilized, cleaved, trimeric form of the envelope glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 79: 8812-27.
- Berman HM, Battistuz T, Bhat TN, Bluhm WF, Bourne PE, Burkhardt K, Feng Z, Gilliland GL, Iype L, Jain S, Fagan P, Marvin J, Padilla D, Ravichandran V, Schneider B,

- Thanki N, Weissig H, Westbrook JD, Zardecki C (2002). The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 58:899-907.
- Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, Willmitzer L, Müller M (2003). Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virol*. 77: 9211-20.
- Black M, Trent A, Tirrell M, Olive C (2010). Advances in the design and delivery of peptide subunit vaccines with a focus on Toll-like receptor agonists. *Expert Review of Vaccines* 9: 157-73.
- Blum H, Beier H, Gros HJ (1987). Improved silver staining of plants proteins. RNA and DNA polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 8:93-9.
- Bock R, Warzecha H (2010). Solar-powered factories for new vaccines and antibiotics. *Trends Biotechnol* 28: 246-52.
- Bradford MM (1976). A Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-52.
- Brennan FR, Jones TD, Longstaff M, Chapman S, Bellaby T, Smith H, Xu F, Hamilton WD, Flock JI (1999). Immunogenicity of peptides derived from a fibronectin-binding protein of *S. aureus* expressed on two different plant viruses. *Vaccine* 17: 1846–57.
- Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP, Nabel GJ, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt RT (2004). HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol*. 5:233-6.
- Burton DR, Weiss RA (2010). AIDS/HIV. A boost for HIV vaccine design. *Science*. 329: 770-3.
- Chackerian B, Lowy DR, Schiller JT (2001). Conjugation of a self-antigen to papillomavirus-like particles allows for efficient induction of protective autoantibodies. *J Clin Invest*. 108: 415-23.
- Chackerian B (2007). Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 6: 381–90.
- Chambers P, Nesbit M, Yusoff K, Millar NS, Samson AC, Emmerson PT (1988). Location of a neutralizing epitope for the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle Disease Virus. *J. GenVirol*. 69: 2115–22.

- Chen ZG, Stauffacher C, Li Y, Schmidt T, Bomu W, Kamer G, Shanks M, Lomonosoff G, Johnson JE (1989). Protein-RNA interactions in an icosahedral virus at 3.0 Å resolution. *Science* 245: 154–59.
- Christou P (1995). Particle bombardment. *Methods Cell Biol.* 50: 375-82.
- Circelli P, Donini M, Villani ME, Benvenuto E, Marusic C (2010). Addendum Efficient Agrobacterium-based transient expression system for the production of biopharmaceuticals in plants. *Bioengineered Bugs* 1: 221 – 4.
- Cohen J (2003). Clinical research. A setback and an advance on the AIDS vaccine front. *Science* 300: 28-9.
- Cruz SS, Chapman S, Roberts AG, Roberts IM, Prior DA, Oparka KJ (1996). Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6286-90.
- Dalsgaard K, Uttenthal A, Jones TD, Xu F, Merryweather A, Hamilton WD, Langeveld JP, Boshuizen RS, Kamstrup S, Lomonosoff GP, Porta C, Vela C, Casal JI, Meloen RH, Rodgers PB (1997). Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nat. Biotechnol.* 15: 248–52.
- Daniell H (1993). Foreign gene expression in chloroplasts of higher plants mediated by tungsten particle bombardment. *Methods Enzymol.* 217: 536-56.
- D'Aoust MA, Lavoie PO, Couture MM, Trépanier S, Guay JM, Dargis M, Mongrand S, Landry N, Ward BJ, Vézina LP (2008). Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. *Plant Biotechnol J.* 6: 930-40.
- D'Aoust MA, Couture MM, Charland N, Trépanier S, Landry N, Ors F, Vézina LP (2010). The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol J.* 8: 607-19.
- Denis J, Majeau N, Acosta-Ramirez E, Savard C, Bedard MC, Simard S, Lecours K, Bolduc M, Pare C, Willems B, Shoukry N, Tessier P, Lacasse P, Lamarre A, Lapointe R, Macias CL and Leclerc D (2007). Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: evidence for the critical function of multimerization. *Virology* 363: 59–68.

Denis J, Acosta-Ramirez E, Zhao Y, Hamelin ME, Koukavica I, Baz M, Abed Y, Savard C, Pare C, Lopez Macias C, Boivin G, Leclerc D (2008). Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine* 263: 395-403.

Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zamryski P, Goodman H M (1982). Napoline syntase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet* 1: 561-73.

Desvoyes B, Scholthof HB (2002). Host- dependent Recombination of a Tomato Bushy stunt virus coat protein Mutant Yields Truncated Capsid That form Virus-like Complexes which benefit Systemic spread. *Virol* 304: 434-42.

De Virgilio M, De Marchis F, Bellucci M, Mainieri D, Rossi M, Benvenuto E, Arcioni S, Vitale A (2008). The human immunodeficiency virus antigen Nef forms protein bodies in leaves of transgenic tobacco when fused to zeolin. *J Exp Bot.* 59: 2815-29.

Douglas T , Young M (1998). Host–guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. *Nature* 393: 152-155.

Durrani Z, McInerney TL, McLain L, Jones T, Bellaby T, Brennan FR, Dimmock NJ (1998). Intranasal immunization with a plant virus expressing a peptide from HIV-1 gp41 stimulates better mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization. *J Immunol Methods.* 220: 93-103.

Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M (2006). Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses ex vivo generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *J Virol.* 80: 5563-70.

Ehsani P, Khabiri A, Domansky NN (1997). Polypeptides of hepatitis B surface antigen produced in transgenic potato. *Gene* 190: 107-11.

Erickson JW, Rossmann MG (1982). Assembly and crystallization of a T=1 icosahedral particle from trypsinized southern bean mosaic virus coat protein. *Virology.* 116: 128-36.

Fernández-Fernández MR, Martínez-Torrecuadrada JL, Casal JI, García JA (1998). Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus. *FEBS Lett* 427: 229–35.

- Fernández-San Millán A, Ortigosa SM, Hervás-Stubbs S, Corral-Martínez P, Seguí-Simarro JM, Gaétan J, Coursaget P, Veramendi J (2008). Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol J* 6: 427-41.
- Ferrantelli F, Cafaro A, Ensoli B (2004). Nonstructural HIV proteins as targets for prophylactic or therapeutic vaccines. *Curr Opin Biotechnol*. 15: 543-56.
- Fischer R, Emans N (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res*. 9: 279-99.
- Fiser A, Sali A (2003). Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol* 374: 461-491.
- Fox JM, Wang G, Speir JA, Olson NH, Johnson JE, Baker TS, Young MJ (1998). Comparison of the native CCMV virion with in vitro assembled CCMV virions by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *Virology*. 244: 212-8.
- Freed EO (1998). HIV-1 Gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251: 1–15.
- Gallie DR (2002). The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. *Nucleic Acids Res* 30: 3401-11.
- Gallitelli D, Hull R, Koenig R (1985). Relationships among viruses in the tombusvirus group: nucleic acid hybridization studies. *Journal of General Virology* 66: 1523-31.
- Gao Y, Ma Y, Li M, Cheng T, Li SW, Zhang J, Xia NS (2003). Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg. *World J Gastroenterol*. 9: 996-1002.
- Gary TJ, Martin FB (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biological Chemistry* 389: 521–536.
- Gerngross TU (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnol*. 22: 1409-14.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2005). Magniffection a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23: 2042-8.
- Gorny MK, Xu JY, Gianakakos V, Karwowska S, Williams C, Sheppard HW, Hanson CV, Zolla-Pazner S (1991). Production of site-selected neutralizing human monoclonal

antibodies against the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3238-42.

Grasso S, Santi L (2010). Viral nanoparticles as macromolecular devices for new therapeutic and pharmaceutical approaches. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2: 161-78.

Greco R, Michel M, Guetard D, Cervantes-Gonzalez M, Pelucchi N, Wain-Hobson S, Sala F, Sala M (2007). Production of recombinant HIV-1/HBV virus-like particles in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants for a bivalent plant-based vaccine. *Vaccine*. 25: 8228-40.

Grgacic EV, Anderson DA (2006). Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods*. 40: 60-5.

Gulley H, Dudley RK, Jonard G, Balazs E, Richards KE (1982). Transcription of Cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences, and characterization of transcript. *Cell* 30: 763-73

Haase AT (1999). Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4⁺ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 625–56.

Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21: 4671-9.

Hammond RW, Hammond J (2010). Maize rayado fino virus capsid proteins assemble into virus-like particles in *Escherichia coli*. *Virus Res.* 147: 208-15.

Hanafi LA, Bolduc M, Gagné ME, Dufour F, Langelier Y, Boulassel MR, Routy JP, Leclerc D, Lapointe R (2010). Two distinct chimeric potexviruses share antigenic cross-presentation properties of MHC class I epitopes. *Vaccine*. 28: 5617-26.

Harrison SC, Olson AJ, Schutt CE, Winkler FK, Bricogne G (1978). Tomato bushy stunt virus at 2.9 Å resolution. *Nature*. 276: 368-73.

Haynes JR, Cunningham J, Von Seefriedm A, Lennickk M, Garvin TR, Shen SH (1986). Development of a genetically-engineered, candidate polio vaccine employing the self-assembling properties of the tobacco mosaic virus coat protein. *Nature BioTechnology* 4: 637-641.

- Hearne PQ, Knorr DA, Hillman BI, Morris TJ (1990). The complete genome structure and synthesis of infectious RNA from clones of tomato bushy stunt virus. *Virology*. 177: 141-51.
- Hiebert E, Bancroft, JB, Bracker CE (1968). The assembly in vitro of some small spherical viruses, hybrid viruses, and other nucleoproteins. *Virology* 34: 492–508.
- Hiebert E, Bancroft JB (1969). Factors affecting the assembly of some spherical viruses. *Virology* 39: 296–311.
- Heifetz PB (2000). Genetic engineering of the chloroplast. *Biochimie*. 82: 655-66.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51-9.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983). A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179 - 180
- Hsu C, Sing P, Ochoa W, Manayani D J, Manchester M, Schneeman A and Reddy V S (2006). Characterization of polymorphism displayed by the coat protein mutants of tomato bushy stunt virus. *J Virol* 349: 222-29.
- Huang Z, Mason HS (2004).Conformational analysis of hepatitis B surface antigen fusions in an *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Biotechnol J*. 2: 241-9.
- Huang CC, Tang M, Zhang MY, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL, Dimitrov DS, Korber B, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Kwong PD (2005). Structure of a V3-Containing HIV-1 gp120 Core. *Science* 310: 1025- 28.
- Huang Z, Elkin G, Maloney BJ, Beuhner N, Arntzen CJ, Thanavala Y, Mason HS (2005).Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine* 23: 1851-8.
- Huang Z, Santi L, LePore K, Kilbourne J, Arntzen CJ, Mason HS (2006). Rapid, high-level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice. *Vaccine*. 24: 2506-13.
- Huang Z, Chen Q, Hjelm B, Arntzen C, Mason H (2009).A DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants. *Biotechnol Bioeng*. 103: 706-14.
- Ikonomou L, Schneider YJ, Agathos SN (2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*. 62: 1-20.

- Jennings GT, Bachmann MF (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol. Chem.* 389: 521–37.
- Jennings GT, Bachmann MF (2009). Immunodrugs: Therapeutic VLP-Based Vaccines for Chronic Diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49: 303–26.
- Joelson T, Akerblom L, Oxelfelt P, Strandberg B, Tomenius K, Morris TJ (1997). Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. *J Gen Virol.* 78: 1213-7.
- Johansen LK, Carrington JC (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Physiol* 126: 930-8.
- Johnson J, Lin T, Lomonossoff G (1997). Presentation of heterologous peptides on plant viruses: genetics, structure and function. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 67–86.
- Joung YH, Youm JW, Jeon JH, Lee BC, Ryu CJ, Hong HJ, Kim HC, Joung H, Kim HS (2004). Expression of the hepatitis B surface S and preS2 antigens in tubers of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Rep.* 22: 925-30.
- Kakani K, Sgro JY, Rochon D (2001). Identification of specific cucumber necrosis virus coat protein amino acids affecting fungus transmission and zoospore attachment. *J Virol.* 75: 5576-83.
- Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G (1997). An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* 122: 101-08.
- Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki AB (1999). A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *Faseb J* 13: 1796-9.
- Kapusta J, Modelska A, Pniewski T, Figlerowicz M, Jankowski K, Lisowa O, Plucienniczak A, Koprowski H, Legocki AB (2001). Oral immunization of human with transgenic lettuce expressing hepatitis B surface antigen. *Adv Exp Med Biol* 495: 299-303.
- Karasev AV, Foulke S, Wellens C, Rich A, Shon KJ, Zwierzynski I, Hone D, Koprowski H, Reitz M (2005). Plant based HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach. *Vaccine* 23: 1875-80.

- Karlsson Hedestam GB, Fouchier RA, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT (2008). The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol* 6: 143-55.
- Kim TG, Ruprecht R, Langridge WH (2004). Synthesis and assembly of a cholera toxin B subunit SHIV 89.6p Tat fusion protein in transgenic potato. *Protein Expr. Purif.* 35: 313–319.
- Knittelfelder R, Riemer AB, Jensen-Jarolim E (2009). Mimotope vaccination-from allergy to cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 9: 493–506.
- Komarova TV, Baschieri S, Donini M, Marusic C, Benvenuto E, Dorokhov YL (2010). Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert Rev Vaccines*. 8: 859-76.
- Kong Q, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y (2001). Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 11539-44.
- Kumar S, Ochoa W, Singh P, Hsu C, Schneemann A, Manchester M, Olson M, Reddy V (2009). Tomato bushy stunt virus (TBSV), a versatile platform for polyvalent display of antigenic epitopes and vaccine design. *Virology*. 388: 185-90.
- Kwong PD, Doyle ML, Casper DJ, Cicala C, Leavitt SA, Majeed S, Steenbeke TD, Venturi M, Chaiken I, Fung M, Kattinger H, Parren PW, Robinson J, Van Ryk D, Wang L, Burton DR, Freire E, Wyatt R, Sodroski J, Hendrickson WA, Arthos J (2002). HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor binding sites. *Nature* 420: 678–82.
- Lacasse P, Denis J, Lapointe R, Leclerc D, Lamarre A (2008). Novel plant virus-based vaccine induces protective cytotoxic T-lymphocyte-mediated antiviral immunity through dendritic cell maturation. *J Virol*. 82: 785-94.
- Lackner AA, Veazey RS (2007). Current concepts in AIDS pathogenesis: insights from the SIV/macaque model. *Annu. Rev. Med.* 58: 461–76.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Langeveld JPM, Brennan FR, Martinez- Torrecuadrada JL, Jones TD, Boshuizen RS, Vela C, Casal JJ, Kamstrup S, Dalsgaard K, Meloen RH, Bendig MM, Hamilton WD (2001).

Inactivated recombinant plant virus protects dogs from a lethal challenge with canine parvovirus. *Vaccine* 19: 3661–70.

Larson SB, Koszelak S, Day J, Greenwood A, Dodds JA, McPherson A (1993). Double helical RNA in satellite tobacco mosaic virus. *Nature* 361: 179–82.

Larson SB, Lucas RW, Greenwood A, McPherson A (2005). The RNA of turnip yellow mosaic virus exhibits icosahedral order. *Virology* 334: 245–54.

Lavelle L, Michel JP, Gingery M (2007). The disassembly, reassembly and stability of CCMV protein capsids. *J Virol Methods* 146: 311-6.

Leclerc D, Beauseigle D, Denis J, Morin H, Paré C, Lamarre A, Lapointe R (2007). Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells. *J Virol*. 81: 1319-26.

Lechner F, Jegerlehner A, Tissot AC, Maurer P, Sebbel P, Renner WA, Jennings GT, Bachmann MF (2002). Virus-like particles as a modular system for novel vaccines. *Intervirology*.45: 212-17.

Lechner S, Rispeter K, Meisel H, Kraas W, Jung G, Roggendorf M, Zibert A (1998). Antibodies directed to envelope proteins of hepatitis C virus outside of hypervariable region 1. *Virology* 243: 313–21.

Lenzi P, Scotti N, Alagna F, Tornesello ML, Pompa A, Vitale A, De Stradis A, Monti L, Grillo S, Buonaguro FM, Maliga P, Cardi T (2008). Translational fusion of chloroplast-expressed human papillomavirus type 16 L1 capsid protein enhances antigen accumulation in transplastomic tobacco. *Transgenic Res*. 17: 1091-102.

Lessard PA, Kulaveerasingam H, York GM, Strong A, Sinskey AJ (2002). Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metab Eng*. 4: 67-79.

Levy JC (2007). HIV and the pathogenesis of AIDS. 3rd ed. American Society of Microbiology Press, Washington, DC.

Li G, Jiang L, Li M, Li P, Zhang Q, Song R, Xu Z (2007). Morphology and stability changes of recombinant TMV particles caused by a cysteine residue in the foreign peptide fused to the coat protein. *J Virol Methods* 140: 212–17.

- Li Y, Migueles SA, Welcher B, Svehla K, Phogat A, Louder MK, Wu X, Shaw GM, Connors M, Wyatt RT, Mascola JR (2007). Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nat Met* 13: 1032-4.
- Lico C, Capuano F, Renzone G, Donini M, Marusic C, Scaloni A, Benvenuto E, Baschieri S (2006). Peptide display on Potato virus X: molecular features of the coat protein-fused peptide affecting cell-to-cell and phloem movement of chimeric virus particles. *J Gen Virol* 87: 3103-12.
- Lico C, Mancini C, Italiani P, Betti C, Boraschi D, Benvenuto E, Baschieri S (2009). Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8⁺ T cells in mice. *Vaccine* 27: 5069-76.
- Liu H, Qu C, Johnson JE, Case DA (2003). Pseudoatomic models of swollen CCMV from cryo-electron microscopy data. *J Struct Biol* 142: 356-63.
- Lombardi R, Circelli P, Villani ME, Buriani G, Nardi L, Coppola V, Bianco L, Benvenuto E, Donini M, Marusic C (2009). High-level HIV-1 Nef transient expression in *Nicotiana benthamiana* using the P19 gene silencing suppressor protein of Artichoke Mottled Crinkle Virus. *BMC Biotechnol* 9: 96.
- Ma JK, Drake PM, Christou P (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 4: 794-805.
- Maclean J, Koekemoer M, Olivier AJ, Stewart D, Hitzeroth II, Rademacher T, Fischer R, Williamson AL, Rybicki EP (2007). Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *J Gen Virol*. 88: 1460-9.
- Maliga P (2004). Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*. 55: 289-313.
- Marillonet S, Giritch A, Gils M, KandziaR, Klymyuk V, Gleba Y (2004). In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *PNAS* 101: 6852-6857.
- Marillonet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y (2005). Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol* 23: 718-23.

- Martelli GP, Gallitelli D, Russo M (1988). Polyhedral Virions with Monopartite RNA Genomes. *The Plant Viruses* 3: 13-72. (Edited by R. Koenig. New York Plenum Press).
- Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, Mancini C, Spada M, Belardelli F, Benvenuto E, Capone I (2001). Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 75: 8434-9.
- Marusic C, Nuttall J, Buriani G, Lico C, Lombardi R, Baschieri S, Benvenuto E, Frigerio L (2007). Expression, intracellular targeting and purification of HIV Nef variants in tobacco cells. *BMC Biotechnol* 7: 12.
- Mascola JR, Snyder SW, Weislow OS, Belay SM, Belshe RB, Schwartz DH, Clements ML, Dolin R, Graham BS, Gorse GJ, Keefer MC, McElrath MJ, Walker MC, Wagner KF, McNeil JG, McCutchan FE, Burke DS (1996). Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *J Infect Dis* 173: 340-8.
- Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11745-49.
- Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ (1996). Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5335-40.
- Matsushita M, Fujita T (2001). Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol Rev* 180: 78-85.
- Maurer P, Jennings GT, Willers J, Rohner F, Lindman Y, Roubicek K, Renner WA, Muller P, Bachmann MF (2005). A therapeutic vaccine for nicotine dependence: preclinical efficacy, and Phase I safety and immunogenicity. *European Journal of Immunology* 35: 2031-40.
- McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature.* 307: 178-80.
- McCormick AA, Corbo TA, Wykoff- Clary S, Nguyen LV, Smith ML, Palmer KE, Pogue GP (2006). TMV-peptide fusion vaccines induce cell-mediated immune responses and tumor protection in two murine models. *Vaccine* 24: 6414-23.

- Mechtcheriakova IA, Eldarov MA, Nicholson L, Shanks M, Skryabin KG, Lomonosoff GP (2006). The use of viral vectors to produce hepatitis B virus core particles in plants. *J Virol Methods*. 131:10-5.
- Medzhitov R, Janeway C Jr (2000). Innate immunity. *N Engl J Med*. 343: 338-44.
- Mehandru S, Poles M A, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, Boden D, Racz P, Markowitz M (2004). Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4⁺ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 761–770.
- Meyers A, Chakauya E, Shephard E, Tanzer FL, Maclean J, Lynch A, Williamson AL, Rybicki EP (2008). Expression of HIV-1 antigens in plants as potential subunit vaccines. *BMC Biotechnol* 8: 53.
- Michels B, Leimkuhler M, Lechner MD, Adrian M, Lorber B and Witz J (1999). Polymorphism of turnip yellow mosaic virus empty shells and evidence for conformational changes occurring after release of the viral RNA. A differential scanning calorimetric study. *Eur J Biochem* 264: 965-72.
- Michel JP, Ivanovska IL, Gibbons MM, Klug WS, Knobler CM, Wuite GJ, Schmidt CF (2006). Nanoindentation studies of full and empty viral capsids and the effects of capsid protein mutations on elasticity and strength. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:6184-9.
- Molinari P, Marusic C, Lucioli A, Tavazza R, Tavazza M (1998). Identification of artichoke mottled crinkle virus (AMCV) proteins required for virus replication: complementation of AMCV p33 and p92 replication-defective mutants. *J Gen Virol* 79: 639–47.
- Molnár E, Dopfer EP, Deswal S, Schamel WW (2009). Models of antigen receptor activation in the design of vaccines. *Curr Pharm Des* 15: 3237-48.
- Moore JP, Parren PW, Burton DR (2001). Genetic subtypes, humoral immunity and human immunodeficiency virus type I vaccine development. *J Virol* 75: 5721-29.
- Mor TS, Moon YS, Palmer KE, Mason HS (2003). Geminivirus vectors for high-level expression of foreign proteins in plant cells. *Biotechnol Bioeng* 81: 430-7.
- Mori K, Sugimoto C, Ohgimoto S, Nakayama EE, Shioda T, Kusagawa S, Takebe Y, Kano M, Matano T, Yuasa T, Kitaguchi D, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y (2005). Influence of glycosylation on the efficacy of an

Env-based vaccine against simian immunodeficiency virus SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J Virol* 79: 10386-96.

Morikawa Y (2003). HIV capsid assembly. *Curr HIV Res.* 1: 1–14.

Mueller A, Kadri A, Jeske H, Wege C (2010). In vitro assembly of Tobacco mosaic virus coat protein variants derived from fission yeast expression clones or plants. *J Virol Methods* 166: 77-85.

Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, Ruker F, Katinger H (1993). A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 67: 6642–7.

Muster T, Guinea R, Trkola A, Purtscher M, Klima A, Steindl F, Palese P, Katinger H (1994). Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS. *J Virol* 68: 4031–4.

Natilla A, Piazzolla G, Nuzzaci M, Saldarelli P, Tortorella C, Antonaci S, Piazzolla P (2004). *Cucumber mosaic virus* as carrier of a hepatitis C virus-derived epitope. *Arch Virol* 149: 137–54.

Natilla A, Hammond RW, Nemchinov LG (2006). Epitope presentation system based on Cucumber Mosaic Virus from a Potato Virus X-based vector. *Arch Virol* 7: 1373-86.

Natilla A, Nemchinov LG (2008). Improvement of PVX/CMV CP expression tool for display of short foreign antigens. *Protein Expr Purif* 59: 117-21.

Oda Y, Saeki K, Takahashi Y, Maeda T, Naitow H, Tsukihara T, Fukuyama K (2000). Crystal structure of tobacco necrosis virus at 2,25 Å resolution. *J Mol Biol* 300: 153–69.

Olson AJ, Bricogne G, Harrison SC (1983). Structure of tomato bushy stunt virus IV. The virus particle at 2.9 Å resolution. *J Mol Biol* 171: 61-93.

Peabody DS (2003). A Viral Platform for Chemical Modification and Multivalent Display. *J Nanobiotechnology.* 1: 5.

Perez J, Defrenne S, Witz J, Vachette P (2000). Detection and characterization of an intermediate conformation during the divalent ion-dependent swelling of tomato bushy stunt virus. *Cell Mol Biol* 46: 937–48.

Pilcher CD, Eron Jr. JJ, Galvin S, Gay C, Cohen MS (2004). Acute HIV revisited: new opportunities for treatment and prevention. *J Clin Invest* 113: 937–945.

- Plummer EM, Manchester M (2010). Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. [Epub ahead of print]
- Porta C, Spall VE, Loveland J, Johnson JE, Barker PJ, Lomonossoff GP (1994). Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology* 202: 949-55.
- Pumpens P, Borisova GP, Crowther RA, Grens E (1995). Hepatitis B virus core particles as epitope carriers. *Intervirology* 38: 63-74.
- Purtscher M, A Trkola, G Gruber, A Buchacher, R Predl, F Steindl, C Tauer, R Berger, N Barret, A Jungbauer A (1994). A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retrovirus* 10: 1651-8.
- Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, Meehan MO, Lutalo T, Gray RH (2000) .Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Rakai Project Study Group, N. Engl. J. Med.* 342: 921–9.
- Ramírez YJ, Tasciotti E, Gutierrez-Ortega A, Donayre Torres AJ, Olivera Flores MT, Giacca M, Gómez Lim MA (2007). Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice. *Clin Vaccine Immunol.* 14: 685-92.
- Rappuoli R (2004). From Pasteur to genomics: progress and challenges to infectious diseases. *Nat. Med.* 10: 1117-85.
- Reddy VS, Giesing HA, Morton RT, Kumar A, Post CB, Brooks CL, Johnson JE (1998). Energetics of quasiequivalence: computational analysis of protein-protein interactions in icosahedral viruses. *Biophys J* 74: 546-558.
- Reddy VS, Natarajan B, Okerberg B, Li K, Damodaran K, Morton RT (2001). Virus particle explorer (VIPER), a website for virus capsid structures and their computational analyses. *J Virol* 75: 11943–7.
- Ren Y, Wong SM, Lim LY (2006).In vitro-reassembled plant virus-like particles for loading of polyacids. *J Gen Virol.* 87: 2749-54.
- Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Prensri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P,

- Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH; OPH-TAVEG Investigators (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med*. 361: 2209-20.
- Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS (2000). Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol*. 18: 1167-71.
- Roth BM, Pruss GJ, Vance VB (2004). Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res*. 102: 97-108.
- Russo M, Burgyan J, Martelli G P (1994). Molecular biology of tombusviridae. *Advances in Virus Research* 44: 381-428.
- Rybicki EP (2010). Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnol J* 8: 620-37.
- Sainsbury F, Lomonossoff GP (2008). Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiol* 148: 1212-8.
- Sainsbury F, Cañizares MC, Lomonossoff GP (2010). Cowpea mosaic virus: the plant virus-based biotechnology workhorse. *Annu Rev Phytopathol* 48: 437-55.
- Sandhu GS, Precup JW, Kline BC (1989). Rapid one-step characterization of recombinant vectors by direct analysis of transformed Escherichia coli colonies. *Biotechniques* 7:689-90.
- Santi L, Giritch A, Roy CJ, Marillonnet S, Klimyuk V, Gleba Y, Webb R, Arntzen CJ, Mason HS (2006). Protection conferred by recombinant Yersinia pestis antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 861-6.
- Santi L, Batchelor L, Huang Z, Hjelm B, Kilbourne J, Arntzen CJ, Chen Q, Mason HS (2008) . An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. *Vaccine* 26:1846-54.
- Saunders K, Sainsbury F, Lomonossoff GP (2009). Efficient generation of cowpea mosaic virus empty virus-like particles by the proteolytic processing of precursors in insect cells and plants. *Virology*. 393:329-37.
- Scott CF Jr, Silver S, Profy AT, Putney SD, Langlois A, Weinhold K, Robinson JE (1990). Human monoclonal antibody that recognizes the V3 region of human immunodeficiency

virus gp120 and neutralizes the human T-lymphotropic virus type IIIMN strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8597-601.

Scotti N, Alagna F, Ferraiolo E, Formisano G, Sannino L, Buonaguro L, De Stradis A, Vitale A, Monti L, Grillo S, Buonaguro FM, Cardi T (2009). High-level expression of the HIV-1 Pr55gag polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts. *Planta* 229: 1109-22.

Scotti N, Buonaguro L, Tornesello ML, Cardi T, Buonaguro FM (2010). Plant-based anti-HIV-1 strategies: vaccine molecules and antiviral approaches. *Expert Rev Vaccines* 9: 925-36.

Sette A, Sidney J (1999). Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism. *Immunogenetics* 50: 201–212.

Shanks M, Lomonossoff GP (2000). Co-expression of the capsid proteins of Cowpea mosaic virus in insect cells leads to the formation of virus-like particles. *J Gen Virol* 81:3093-7.

Silhary D, Molnár A, Lucioli A, Szittyá G, Hornyik C, Tavazza M, Burgyán J (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21-to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *Embo J*. 21: 3070-3080.

Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q (2006). HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet* 368:489–504.

Smith ML, Mason HS, Shuler ML (2002). Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expression in plant cell culture: Kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form. *Biotechnol Bioeng* 80:812-22.

Smith ML, Fitzmaurice WP, Turpen TH, Palmer KE (2009). Display of peptides on the surface of tobacco mosaic virus particles. *Curr Top Microbiol Immunol* 332: 13–31.

Sojikul P, Buehner N, Mason HS (2003). A plant signal peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2209-14.

Sorger PK, Stockley PG, Harrison SC (1986). Structure and assembly of turnip crinkle virus. II. Mechanism of reassembly in vitro. *J Mol Biol*. 191:639-58.

Speir JA, Munshi S, Wang G, Baker TS, Johnson JE. (1995). Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure* 3:63–78.

a-Srivastava IK, Stamatatos L, Kan E, Vajdy M, Lian Y, Hilt S, Martin L, Vita C, Zhu P, Roux KH, Vojtech L, Montefiori D, Donnelly J, Ulmer JB, Barnett SW (2003) . Purification, characterization, and immunogenicity of a soluble trimeric envelope protein containing a partial deletion of the V2 loop derived from SF162, an R5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J Virol* 77: 11244-59.

b-Srivastava IK, VanDorsten K, Vojtech L, Barnett SW, Stamatatos L (2003). Changes in the immunogenic properties of soluble gp140 human immunodeficiency virus envelope constructs upon partial deletion of the second hypervariable region. *J Virol* 77: 2310-20.

Staczek J, Bendahmane M, Gilleland LB, Beachy RN, Gilleland HE Jr (2000). Immunization with a chimeric tobacco mosaic virus containing an epitope of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* provides protection against challenge with *P. aeruginosa*. *Vaccine* 18: 2266–74.

Stanfield RL, Ghiara JB, Ollmann Saphire E, Profy AT, Wilson IA (2003). Recurring conformation of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop. *Virology*.315: 159-73.

Stiegler G, Kunert R, Purtscher M, Wolbank S, Voglauer R, Steindl F, Katinger H (2001). A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17: 1757–65.

Storni T, Bachmann MF (2004). Loading of MHC class I and II presentation pathways by exogenous antigens: a quantitative in vivo comparison. *J Immunol* 172: 6129-35.

Stott EJ, Almond N, Kent K, Walker B, Hull R, Rose J, Silvera P, Sangster R, Corcoran T, Lines J, Silvera K, Luciw P, Murphy-Corb M, Momin P, Bruck C (1998). Evaluation of a candidate human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccine in macaques: effect of vaccination with HIV-1 gp120 on subsequent challenge with heterologous simian immunodeficiency virus-HIV-1 chimeric virus. *J Gen Virol* 79: 423-32.

Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Prasad KS, Bapat VA (2003). Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures. *Protein Expr Purif* 32:10-7.

Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ (2000). Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis* 182: 302-5.

- Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, Estes MK (2003). Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol* 108: 241-7.
- Tama F, Brooks CL (2002). The mechanism and pathway of pH induced swelling in cowpea chlorotic mottle virus. *J Mol Biol* 318:733–747.
- Tavazza M, Lucioli A, Ancora G, Benvenuto E (1989). cDNA cloning of artichoke mottled crinkle virus RNA and localization and sequencing of the coat protein gene. *Plant Molecular Biology* 13: 685-692.
- Tavazza M, Lucioli A, Calogero A, Pay A, Tavazza R (1994). Nucleotide sequence, genomic organization and synthesis of infectious transcripts from a full-length clone of artichoke mottled crinkle virus. *J GenVir* 75: 1515-24.
- 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: 469-72.
- Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS, Arntzen C (1995). Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 3358-61.
- Thanavala Y, Mahoney M, Pal S, Scott A, Richter L, Natarajan N, Goodwin P, Arntzen CJ, Mason HS (2005). Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:3378-82.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-80.
- Titti F, Cafaro A, Ferrantelli F, Tripiciano A, Moretti S, Caputo A, Gavioli R, Ensoli F, Robert-Guroff M, Barnett S, Ensoli B (2007). Problems and emerging approaches in HIV/AIDS vaccine development. *Expert Opin Emerg Drugs* 12: 23-48.
- Toyoda T, Gotoh B, Sakaguchi T, Kida H, Nagai Y (1988). Identification of amino acids relevant to three antigenic determinants on the fusion protein of Newcastle disease virus that are involved in fusion inhibition and neutralization. *J Virol* 62: 4427–4430.
- Trkola A, Purtscher M, Muster T, Ballaun C, Buchacher A, Sullivan N, Srinivasan K, Sodroski J, Moore JP, Katinger H (1996). Human monoclonal antibody 2G12 defines a

distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 70: 1100–18.

Tsuda S, Yoshioka K, Tanaka T, Iwata A, Yoshikawa A, Watanabe Y, Okada Y (1998). Application of the human hepatitis B virus core antigen from transgenic tobacco plants for serological diagnosis. *Vox Sang* 74: 148-55.

Usha R, Rohll JB, Spall VE, Shanks M, Maule AJ, Johnson JE, Lomonossoff GP (1993). Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology* 197: 366-74.

Varsani A, Williamson AL, Rose RC, Jaffer M, Rybicki EP (2003). Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Arch Virol* 148: 1771-86.

Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103: 157-67.

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33: 949-956.

Vriend G, Hemminga MA, Verduin BJM, Schaafsma TJ (1982). Swelling of cowpea chlorotic mottle virus studied by proton nuclear magnetic resonance. *FEBS Lett* 146: 319–21.

Vriend G (1990). What if: a molecular modelling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 8:52–6.

Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui PY, Wagner D, Phung P, Goss JL, Wrinn T, Simek MD, Fling S, Mitcham JL, Lehrman JK, Priddy FH, Olsen OA, Frey SM, Hammond PW; Protocol G Principal Investigators, Kaminsky S, Zamb T, Moyle M, Koff WC, Poignard P, Burton DR (2009). Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* 326:285-9.

Wang Q, Kaltgrad E, Lin T, Johnson JE, Finn MG (2002). Natural supramolecular building blocks. Wild-type cowpea mosaic virus. *Chem Biol.* 9:805-11.

Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson AL, Clements JD, Rose RC (2003). Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virol* 77:8702-11.

- Webster DE, Thomas MC, Pickering R, Whyte A, Dry IB, Gorry PR, Wesselingh SL (2005). Is there a role for plant-made vaccines in the prevention of HIV/AIDS? *Immunol Cell Biol.* 83:239-47.
- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422: 307–12.
- Whitney JB, Ruprecht RM (2004). Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects. *Curr Opin Infect Dis.* 17:17-26.
- Wurm FM (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnol* 22: 1393-8.
- Yang X, Wyatt R, Sodroski J (2001). Improved elicitation of neutralizing antibodies against primary human immunodeficiency viruses by soluble stabilized envelope glycoprotein trimers. *J Virol* 75:1165-71.
- Ye GN, Daniell H, Sanford JC (1990). Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Mol Biol.*15: 809-19.
- Young M, Willits D, Uchida M, Douglas T (2008). Plant viruses as biotemplates for materials and their use in nanotechnology. *Annu Rev Phytopathol* 46: 361-84.
- Yusibov V, Modelska A, Steplewski K, Agadjanyan M, Weiner D, Hooper DC, Koprowski H (1997). Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:5784-8.
- Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, Fleysh N, Kean RB, Mikheeva T, Deka D, Karasev A, Cox S, Randall J, Koprowski H (2002). Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 20: 3155–64.
- Yusibov V, Rabindran S (2008). Recent progress in the development of plant derived vaccines. *Expert Rev Vaccines* 7: 1173-83.
- Zeyenko V, Ryabova LA, Gallie DR, Spirin AS (1994). Enhancing effect of the 3'-untranslated region of tobacco mosaic virus RNA on protein synthesis in vitro. *FEBS Lett* 354: 271-3.
- Zhao X, Fox JM, Olson NH, Baker TS, Young MJ (1995). In vitro assembly of CCMV from coat protein expressed in *Escherichia coli* and in-vitro transcribed viral cDNA. *Virology* 207: 486–94.

Zhou T, Xu L, Dey B, Hessel AJ, Van Ryk D, Xiang SH, Yang X, Zhang MY, Zwick MB, Arthos J, Burton DR, Dimitrov DS, Sodroski J, Wyatt R, Nabel GJ, Kwong PD (2007). Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature* 445: 732–37.

Zhou F, Badillo-Corona JA, Karcher D, Gonzalez-Rabade N, Piepenburg K, Borchers AM, Maloney AP, Kavanagh TA, Gray JC, Bock R (2008). High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant Biotechnol J* 6:897-913.

Zolla-Pazner S (2005). Improving on nature: focusing the immune response on the V3 loop. *Hum Antibodies* 14:69-72.

Zolla-Pazner S, Cohen SS, Krachmarov C, Wang S, Pinter A, Lu S (2007). Focusing the immune response on the V3 loop, a neutralizing epitope of the HIV-1 gp120 envelope. *Virology* 372 :233-46.

Zwick MB, Jensen R, Church S, Wang M, Stiegler G, Kunert R, Katinger H, Burton DR (2005). Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1. *J Virology* 79: 1252–61.

ULTIMO CAPITOLO

RINGRAZIAMENTI

Vi ho raccontato la storia di AMCV, ma questa è anche la storia del mio dottorato e dei miei all'ENEA, anni che mi hanno arricchito dal punto di vista scientifico e non solo, quindi voglio ringraziare tutti coloro che ne hanno preso parte.

Prima fra tutti, la dottoressa Carla Marusic, la mia relatrice non solo sulla carta ma ogni giorno in laboratorio, che ha reso possibile tutto questo, mi ha insegnato molto, seguendomi in tutto il mio percorso e aiutandomi a crescere come “giovane ricercatrice”.

Grazie al Dott. Eugenio Benvenuto, per la possibilità che mi ha offerto, per la libertà di ricerca che ci lascia. Un caloroso grazie ad Antonia, sempre pronta ad aiutarci.

Un grazie alla professoressa Masci, per la sua umanità e la sua dedizione ai dottorandi.

E poi...grazie a tutto il Lab. dei Plantigens, con cui ho condiviso questi tre anni, che mi hanno aiutata, supportata e accolta....Ringrazio il dott. Giampaolo Buriani (Giampa) per le battute e le risate che hanno allietato le giornate. Ringrazio la dottoressa Chiara Lico per tutti i consigli e le consulenze scientifiche, e ringrazio la dottoressa Floriana Capuano (Flo) ...bè per un sacco di cose dalle chiacchiere all'aiuto, alle vacanze!

Grazie a tutti i Pantibody, al dottor Marcello Donini per il prezioso aiuto scientifico, al dottor Raffaele Lombardi, che mi ha introdotto alla vita di lab all'ENEA e per i preziosi consigli, grazie alla dottoressa Cristina Capodicasa e al dottor Marcello Catellani per le chiacchiere...e per la loro grande ospitalità.

.....Un caloroso grazie a chi ha condiviso con me questi tre anni, chi mi ha sempre aiutata e ...sopportata.... grazie a tutto, l'ormai ex, lab 4....ma che per me sarà sempre il lab 4, in particolare ad Anni che mi è vicina anche da lontano....

Grazie alle mie compagne di studio dell'università, che finiti gli esami sono diventate le compagne di cene ed uscite (bè decisamente meglio ora!)

Un pensiero particolare va alla casa delle zie, la mia seconda famiglia.....la parte più divertente di questi anni, dove ho passato dei momenti bellissimi che porterò sempre con me...grazie zia Cons, grazie zia Barbara, grazie zia Gilda e....grazie anche a zia Giada.

Grazie a chi c'è sempre....a chi ormai da anni ringrazio sulle tesi.....ragazzi ve lo prometto è l'ultima volta!!!! Grazie Noemi, Mela, Fabrizio, Marco e Giovanni, ma soprattutto a Gloria, che c'è sempre.

Un grazie grandissimo va a Daniele, che mi fa ridere e mi ha insegnato un sacco di cose sul calcio, non si smette mai di imparare!

Ma soprattutto grazie alla mia famiglia, che si allarga sempre di più....grazie ai piccoli GiulioAntonio e Angelo che mi riempiono le giornate, alle mie sorelle che me le incasinano, a papà, ma soprattutto a mamma, perché è la migliore del mondo!