



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

DOTTORATO DI RICERCA
IN BIOTECNOLOGIE VEGETALI –XXII CICLO.

**SISTEMI VEGETALI PER LA PRODUZIONE DI ANTIGENI
VIRALI E COME SORGENTE DI MOLECOLE
IMMUNOGENICHE**

settore scientifico-disciplinare

B IO/11

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Masci

Firma

Tutor: Dott.ssa Rosella Franconi

Firma.....

Dottoranda: Olivia Costantina Demurtas

Firma

INDICE

1. INTRODUZIONE	9
1.1 PLANT MOLECULAR FARMING: LE PIANTE E LE MICROALGHE PER LA PRODUZIONE DI BIOFARMACEUTICI	9
1.1.1 GENERALITÀ E CARATTERISTICHE PRINCIPALI	9
1.1.2 SISTEMI DI ESPRESSIONE	17
1.1.2.1 Trasformazione genetica stabile	17
1.1.2.1.1 Trasformazione nucleare	17
1.1.2.1.2 Trasformazione plastidiale	20
1.1.2.2 Espressione transiente	23
1.1.2.2.1 Espressione mediata da <i>Agrobacterium</i> (agroinfiltrazione)	24
1.1.2.2.2 Espressione mediata da vettori virali di prima generazione	25
1.1.2.2.2.1 Il virus X della patata (PVX)	26
1.1.2.2.3 Espressione mediata da vettori di seconda generazione	29
1.1.3 OTTIMIZZAZIONE DELL' ESPRESSIONE DELLE PROTEINE ETEROLOGHE IN SISTEMI VEGETALI	31
1.1.4 LA PRODUZIONE DI VACCINI IN SISTEMI VEGETALI	35
1.1.4.1 I vaccini: concetti introduttivi e tipologie vaccinali	35
1.1.4.2 Vaccini a subunità prodotti in sistemi vegetali	40
1.1.4.3 Le piante come biofabbrica e sorgente di molecole immunostimolanti	45
1.1.4.3.1 Le "Ribosome Inactivating Proteins" (RIP)	48
1.2 CASO DI STUDIO 1. L'AGENTE EZIOLOGICO DELLA SINDROME RESPIRATORIA ACUTA GRAVE: IL VIRUS SARS-CoV	52
1.2.1 GENERALITÀ E CARATTERISTICHE PRINCIPALI	52
1.2.2 LE PROTEINE STRUTTURALI	56
1.2.2.1 La proteina N	57
1.2.2.2 La proteina M	60
1.2.3 DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA SARS-CoV	63
1.2.4 STATO DELL'ARTE DEI VACCINI CONTRO IL SARS-CoV	64
1.2.4.1 Vaccini a subunità peptidici/proteici basati sugli antigeni N e M	66
1.2.4.2 Vaccini in pianta contro il SARS-CoV	67
1.3 CASO DI STUDIO 2. L'AGENTE CAUSALE DEL TUMORE ALLA CERVICE UTERINA: IL VIRUS DEL PAPILLOMA UMANO	68
1.3.1 GENERALITÀ E CARATTERISTICHE PRINCIPALI	68
1.3.2 HPV E CANCEROGENESI	74
1.3.2.1 L'oncoproteina E7	78
1.3.3 STATO DELL'ARTE DEI VACCINI CONTRO HPV	82
1.3.3.1 Vaccini preventivi contro HPV	82

1.3.3.2 Vaccini terapeutici contro HPV.....	84
1.3.3.3 Vaccini in pianta contro HPV.....	87
1.3.3.3.1 Vaccini profilattici prodotti in pianta.....	87
1.3.3.3.2 Vaccini terapeutici prodotti in pianta.....	89
2. SCOPO DELLA TESI.....	92
3. MATERIALI E METODI.....	97
<u>Materiali</u>	
3.1 REAGENTI DI BASE.....	97
3.2 TERRENI DI COLTURA.....	97
3.3 CEPPI E LINEE CELLULARI.....	99
3.4 PLASMIDI.....	100
3.4.1 pBlueScript SK+.....	100
3.4.2 pQE-30.....	101
3.4.3 pVAX1.....	101
3.4.4 pPVX201.....	102
3.4.5 pBI-121.....	103
3.4.6 pSL18-psaD-cRLuc.....	104
3.4.7 pSL18-cyc6.....	104
3.4.8 pCG1.....	105
3.5 ANTIBIOTICI.....	106
3.6 OLIGONUCLEOTIDI.....	107
3.7 ANTICORPI.....	107
<u>Metodi</u>	
A) LE PIANTE PER LA PRODUZIONE DEGLI ANTIGENI N e M	
DEL SARS-CoV.....	109
3.8 PREPARAZIONE DEI COSTRUTTI PER L'ESPRESSIONE IN PIANTA.....	109
3.8.1 Clonaggio del gene M-His ₆ nel vettore binario pBI-B9.....	109
3.8.2 Preparazione e trasformazione delle cellule elettrocompetenti di <i>E. coli</i>	110
3.8.3 Caratterizzazione dei ricombinanti batterici mediante PCR su colonia.....	110
3.8.4 Preparazione e trasformazione dei ceppi di <i>A. tumefaciens</i> elettrocompetenti.....	111
3.9 ESPRESSIONE DEGLI ANTIGENI N e M IN PIANTE DI <i>Nicotiana benthamiana</i>	111
3.9.1 Infezione delle piante con il costrutto pPVX-His ₆ -N.....	111
3.9.2 Agroinfiltrazione delle piante con i ceppi di <i>A. tumefaciens</i> recanti il costrutto pBI-M-His ₆	112
3.9.3 Preparazione degli estratti fogliari e quantificazione delle proteine.....	113
3.9.4 Elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide-SDS (SDS-PAGE).....	114
3.9.5 Colorazione delle proteine con il nitrato d'argento.....	114

3.9.6 Immunoblotting.....	115
3.9.7 Quantificazione della proteina N presente nei tessuti vegetali.....	115
3.9.8 Purificazione della proteina N dagli estratti vegetali mediante Cromatografia di Affinità con Ioni Metallo immobilizzati (IMAC).....	116
3.10 SAGGIO DI ANTIGENICITÀ DELLA PROTEINA N PRODOTTA IN PIANTA.....	117
 B) PIATTAFORME VEGETALI PER LA PRODUZIONE DI VACCINI TERAPEUTICI BASATI SULL'ONCOPROTEINA E7 DI HPV-16.....	
3.11 PRODUZIONE DELLA PROTEINA E7 IN PIANTA MEDIANTE AGROINFILTRAZIONE.....	118
3.11.1 Preparazione del costrutto pBI-PGIPss-E7.....	118
3.11.2 Agroinfiltrazione delle piante di <i>N. benthamiana</i> ed analisi dell'espressione della proteina PGIPss-E7.....	119
3.12 PRODUZIONE DELLA PROTEINA E7 NELLA MICROALGA <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	119
3.12.1 Crescita dei ceppi di <i>Chlamydomonas</i>	119
3.12.2 Generazione di linee transgeniche nucleari ed analisi dell'espressione della proteina E7GGG.....	120
3.12.2.1 Preparazione dei costrutti per la trasformazione nucleare.....	120
3.12.2.2 Trasformazione nucleare.....	121
3.12.2.3 Induzione dell'espressione della proteina E7GGG nei trasformanti ottenuti con il costrutto pSL18-cyc6-His ₆ -E7GGG.....	121
3.12.2.4 Preparazione degli estratti ed analisi dell'espressione delle proteina E7GGG nei trasformanti nucleari.....	121
3.12.3 Generazione di linee transplastomiche ed analisi dell'espressione della proteina His ₆ -E7GGG.....	122
3.12.3.1 Preparazione dei costrutti per la trasformazione plastidiale.....	122
3.12.3.2 Trasformazione del cloroplasto.....	124
3.12.3.3 Verifica dell'inserzione del DNA esogeno nel genoma plastidiale.....	125
3.12.3.4 Preparazione degli estratti, analisi dell'espressione e quantificazione della proteina E7GGG nei trasformanti plastidiali.....	125
 C) USO DI PROTEINE VEGETALI COME “CARRIER” PER INCREMENTARE L'IMMUNOGENICITA' DELL'ANTIGENE E7 PER LA PRODUZIONE DI VACCINI TERAPEUTICI CONTRO LE LESIONI ASSOCIATE AD HPV.....	
3.13 REALIZZAZIONE DI MUTANTI GENICI DELLA SAPORINA APOPLASTICA FOGLIARE DI <i>Saponaria officinalis</i>	126
3.13.1 Mutagenesi del sito catalitico della saporina.....	126
3.13.2 Modificazioni del gene apoSAPKQ.....	129
3.14 REALIZZAZIONE DEI GENI DI FUSIONE TRA E7 E LA SAPORINA.....	130
3.14.1 Sequenze ssSAPKQ-E7GGG e SAPKQ-E7GGG.....	130

3.14.2 Sequenza E7GGG-SAPKQ.....	133
3.14.3 Clonaggio delle sequenze di fusione nel vettore intermedio pBS.....	134
3.15 PRODUZIONE DELLA SAPORINA MUTAGENIZZATA E DELLE PROTEINE DI FUSIONE IN <i>E. coli</i>	135
3.15.1 Preparazione dei costrutti e trasformazione delle cellule batteriche.....	135
3.15.2 Induzione dell'espressione delle proteine ricombinanti.....	135
3.15.3 Purificazione delle proteine ricombinanti mediante IMAC.....	136
3.15.4 Analisi delle proteine purificate mediante colorazione con Blu di Coomassie e immunoblotting.....	136
3.16 REALIZZAZIONE DI VACCINI GENETICI BASATI SULLE SEQUENZE DI FUSIONE TRA E7 E LA SAPORINA.....	137
3.16.1 Preparazione dei costrutti per la vaccinazione genetica.....	137
3.16.2 Maxi-preparazione di DNA plasmidico in assenza di endotossine.....	137
3.16.3 Verifica dell'espressione delle proteine di fusione in cellule di mammifero.....	137
3.16.3.1 Preparazione delle cellule HEK-293.....	137
3.16.3.2 Trasfezione delle cellule ed analisi dell'espressione delle proteine.....	138
3.17 VACCINAZIONI TERAPEUTICHE A DNA IN MODELLO PRECLINICO.....	139
3.17.1 Preparazione del DNA plasmidico per le immunizzazioni.....	139
3.17.2 Cellule tumorali murine TC-1*.....	139
3.17.3 Scheda di vaccinazione terapeutica.....	140
3.18 VALUTAZIONE DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE IN SEGUITO A VACCINAZIONE.....	140
3.18.1 Valutazione della selezione di cloni linfocitari secernenti IFN- γ	140
3.18.1.1 Estrazione degli splenociti.....	140
3.18.1.2 "Enzyme-linked Immunospot assay" (ELISPOT).....	141
3.18.2 Rivelazione degli anticorpi nei sieri degli animali immunizzati mediante ELISA.....	141
3.16 PRODUZIONE DELLE PROTEINE DI FUSIONE TRA E7 E LA SAPORINA IN PIANTA.....	142
3.16.1 Preparazione dei costrutti per l'espressione in pianta.....	142
3.16.2 Infezione delle piante di <i>N. benthamiana</i> ed analisi dell'espressione delle proteine di fusione.....	142
3.16.2.1 Estrazione dei fluidi intercellulari.....	143
<u>4. RISULTATI</u>	144
A) LE PIANTE PER LA PRODUZIONE DEGLI ANTIGENI N e M DEL SARS-CoV	144
4.1 PRODUZIONE IN PIANTA E ANALISI DELL'ANTIGENICITA' DELLA PROTEINA N	144
4.1.1 Infezione delle piante con il costrutto pPVX-His ₆ -N.....	144
4.1.2 Verifica della stabilità del costrutto pPVX-His ₆ -N.....	145
4.1.3 Quantificazione delle rese di proteina N nei tessuti vegetali.....	146

4.1.4 Purificazione della proteina N.....	147
4.1.5 Saggio di antigenicità della proteina N prodotta in pianta con sieri di pazienti umani SARS-positivi.....	148
4.2 PRODUZIONE IN PIANTA DELLA PROTEINA M.....	149
4.2.1 Preparazione del costrutto pBI-M-His ₆ e agroinfiltrazione delle piante.....	150
4.2.2 Analisi dell'espressione della proteina M.....	151
 B) PIATTAFORME VEGETALI PER LA PRODUZIONE DI VACCINI TERAPEUTICI BASATI SULL'ONCOPROTEINA E7 DI HPV-16.....	
4.3 PRODUZIONE DELLA PROTEINA E7 IN PIANTA MEDIANTE AGROINFILTRAZIONE.....	154
4.3.1 Preparazione del costrutto pBI-PGIPss-E7 e agroinfiltrazione delle piante.....	154
4.3.2 Analisi dell'espressione della proteina PGIPss-E7.....	155
4.4 PRODUZIONE DELLA PROTEINA E7 NELLA MICROALGA <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	156
4.4.1 Produzione della proteina E7GGG mediante trasformazione nucleare.....	156
4.4.1.1 Preparazione dei costrutti per la trasformazione nucleare.....	156
4.4.1.2 Generazione di linee transgeniche nucleari e analisi dei trasformanti.....	157
4.4.2 Produzione della proteina E7GGG mediante trasformazione plastidiale.....	160
4.4.2.1 Preparazione dei costrutti per la trasformazione plastidiale.....	160
4.4.2.2 Generazione di linee transplastomiche e analisi dei trasformanti.....	163
 C) USO DI PROTEINE VEGETALI COME “CARRIER” PER INCREMENTARE L'IMMUNOGENICITA' DELL'ANTIGENE E7 PER LA PRODUZIONE DI VACCINI TERAPEUTICI CONTRO LE LESIONI ASSOCIATE AD HPV.....	
4.5 REALIZZAZIONE DI MUTANTI GENICI DELLA SAPORINA APOPLASTICA FOGLIARE DI <i>Saponaria officinalis</i>	166
4.5.1 Mutagenesi del sito catalitico della saporina.....	166
4.5.2 Modificazioni del gene apoSAPKQ.....	167
4.6 REALIZZAZIONE DEI GENI DI FUSIONE TRA E7 E LA SAPORINA.....	168
4.7 PRODUZIONE DELLA SAPORINA MUTAGENIZZATA E DELLE PROTEINE DI FUSIONE IN <i>E. coli</i>	169
4.8 VACCINI GENETICI BASATI SULLE SEQUENZE DI FUSIONE TRA E7 E LA SAPORINA.....	171
4.8.1 Preparazione dei costrutti e verifica dell'espressione in cellule di mammifero.....	172
4.9 VACCINAZIONI TERAPEUTICHE A DNA IN MODELLO PRECLINICO E VALUTAZIONE DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE.....	173
4.9.1 Scheda di vaccinazione terapeutica e valutazione della protezione dallo sviluppo del tumore.....	173
4.9.2 Analisi della risposta umorale e cellulo-mediata negli animali immunizzati.....	176
4.10 PRODUZIONE DELLE PROTEINE DI FUSIONE TRA E7 E LA SAPORINA IN PIANTA.....	177

4.10.1 Preparazione dei costrutti ed espressione in pianta.....	177
<u>5. DISCUSSIONE</u>.....	180
<u>6. BIBLIOGRAFIA</u>.....	190
<i>RINGRAZIAMENTI E COLLABORAZIONI</i>.....	217

PRINCIPALI ABBREVIAZIONI

APC: Antigen Presenting Cell
CIN: Cervical Intraepithelial Neoplasia
CP: Coat Protein
CTB: Cholera Toxin B
CTL: Cytotoxic T Lymphocyte
DC: Dendritic Cell
FDA: Food and Drug Administration
GFP: Green Fluorescent Protein
GMP: Good Manufacturing Practices
GRAS: Generally Regarded As Safe
HPV: Human Papilloma Virus
HBV: Hepatitis B Virus
HSP: Heat Shock Protein
IFN: Interferon
IL: Interleuchin
LTB: Labile toxin B
MHC: Major Histocompatibility Complex
PMF: Plant Molecular Farming
PVX: Potato Virus X
ORF: Open Reading Frame
SARS-CoV: SARS Coronavirus
RIP: Ribosome Inactivating Proteins
TMV: Tobacco Mosaic Virus
TNF: Tumor Necrosis Factor
TSP: Total Soluble Proteins
T-DNA: Tumor inducing DNA
VLP: Virus Like Particles

1.INTRODUZIONE

1.1 PLANT MOLECULAR FARMING: LE PIANTE E LE MICROALGHE PER LA PRODUZIONE DI BIOFARMACEUTICI.

1.1.1 GENERALITÀ E CARATTERISTICHE PRINCIPALI

Con il termine “Plant Molecular Farming” (PMF) si intende la produzione in sistemi vegetali di molecole ricombinanti quali farmaci, proteine funzionali, enzimi di interesse industriale e metaboliti secondari attivi. Queste molecole possono essere classificate in tre categorie principali: antigeni vaccinali, molecole terapeutiche (anticorpi, fattori di crescita, analoghi di sostituzione, immunostimolatori e soppressori) e reagenti per diagnostica, ricerca e industria.

Da quando la prima pianta è stata trasformata con successo (Fraley *et al.*, 1983), l'idea di impiegare le piante come bioreattori per la produzione di molecole ricombinanti è stata supportata dalla dimostrazione che questi organismi erano in grado di produrre molecole d'interesse farmacologico attive, come l'ormone della crescita umano (Barta *et al.*, 1986) e di assemblare subunità glicoproteiche multiple, come gli anticorpi, in complessi funzionali (Hiatt *et al.*, 1989). L'autenticità strutturale delle proteine eterologhe prodotte in pianta è stata confermata nel 1992, quando per la prima volta sono state utilizzate le piante per produrre un vaccino sperimentale: l'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBV) (Mason *et al.*, 1992). Da questi primi studi ad oggi, la produzione di molecole ricombinanti in pianta ha avuto uno sviluppo incredibile, soprattutto nell'ambito degli antigeni prodotti a scopi vaccinali (**figura 1**) ed è proprio intenzione di questa tesi di dottorato focalizzare l'attenzione principalmente su questa classe di molecole.

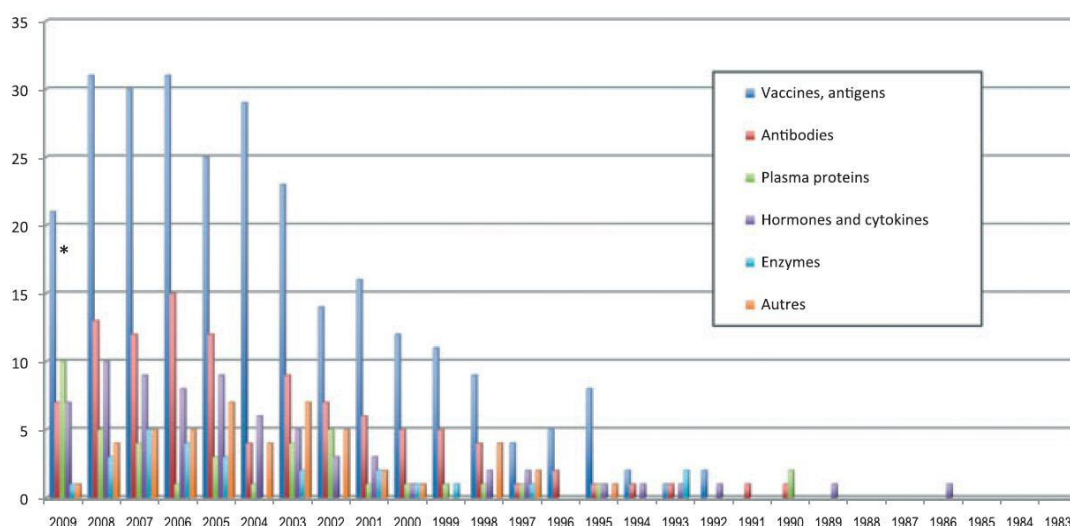


Figura 1: Lavori riguardanti il PMF pubblicati fino all'agosto del 2009. (Fonte: Editorial, Plant Biotechnology Journal, 2010)

Attualmente i sistemi di produzione impiegati per la produzione di vaccini ricombinanti sono rappresentati dai batteri, funghi, cellule di insetto e di mammifero in coltura. Le piante costituiscono una valida alternativa a questi sistemi, in primo luogo in termini economici. Infatti, le piante crescono in condizioni di non-sterilità, a bassi costi (necessitano solo di luce e acqua) e senza bisogno di monitoraggio delle condizioni ambientali. E' stato stimato che le proteine ricombinanti possono essere prodotte in pianta al 2-10% dei costi dei processi fermentativi microbici, e allo 0.1% dei costi delle colture cellulari di mammifero (Twyman *et al.*, 2003). I costi di produzione di una proteina ricombinante dipendono in maniera significativa anche dal grado di purezza richiesto. Infatti, più dell'85% delle spese di produzione di un prodotto farmaceutico è dovuto ai processi a valle della produzione, in particolare per la purificazione. Rispetto agli altri sistemi, le piante non contengono né endotossine e pirogeni, né patogeni umani noti (prioni, virus, etc.), risultando quindi una piattaforma di produzione sicura per l'uomo. Di conseguenza, da anni si cerca di proporre un uso dei farmaceutici prodotti in pianta sottoforma di materiale non processato o parzialmente processato e proprio in questa prospettiva, numerose proteine ricombinanti sono state prodotte in specie edibili come pomodoro, riso, mais, carota, patata, soia, lattuga e molte altre.

Oltre ai vantaggi in termini economici, le piante offrono la possibilità di produrre proteine eterologhe con modificazioni post-traduzionali che ne garantiscono un'elevata autenticità di struttura. Tuttavia, alcune modificazioni post-traduzionali che avvengono nelle cellule vegetali differiscono da quelle effettuate dalle cellule animali. Ad esempio, le piante non sono in grado d'idrossilare i residui di prolina e solo i primi eventi relativi al processo di

glicosilazione delle proteine esogene nelle piante sono simili a quelle in animali transgenici o in colture cellulari animali (Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007; Bosch & Schots, 2010).

I passaggi successivi relativi al processo di glicosilazione portano infatti ad un profilo di N-glicani che differisce tra piante e cellule animali (**figura 2A**). L'aggiunzione di β 1,2-xilosio e il cambiamento dal legame β 1 $\rightarrow$ 6 al β 1 $\rightarrow$ 3 nella molecola di fucosio, sono tipici delle piante (Gomord & Faye, 2004). Inoltre le piante non sono in grado di aggiungere l'acido sialico e il β 1,4-galattosio alle glicoproteine, e mancano dell'enzima *N*-acetilglucosaminiltransferasi coinvolto nell'aggiuntiva ramificazione delle catene carboniose (Bosch & Schots, 2010). Di fatto, "pattern" di glicosilazione diversi da quelli delle cellule umane e/o iperglicosilazione si riscontrano anche nei lieviti (aggiunta di lunghe catene di residui di mannosio) e in alcune linee cellulari di mammifero (aggiunta di zuccheri non presenti nelle cellule umane).

Notevoli progressi sono stati fatti nel campo dell'ingegneria genetica relativa all'umanizzazione dei glicani prodotti in pianta, ad esempio introducendo enzimi chiave della glicosilazione umana e prevenendo l'aggiunzione di xilosio e fucosio (**figura 2B**) (Bosch & Schots, 2010).

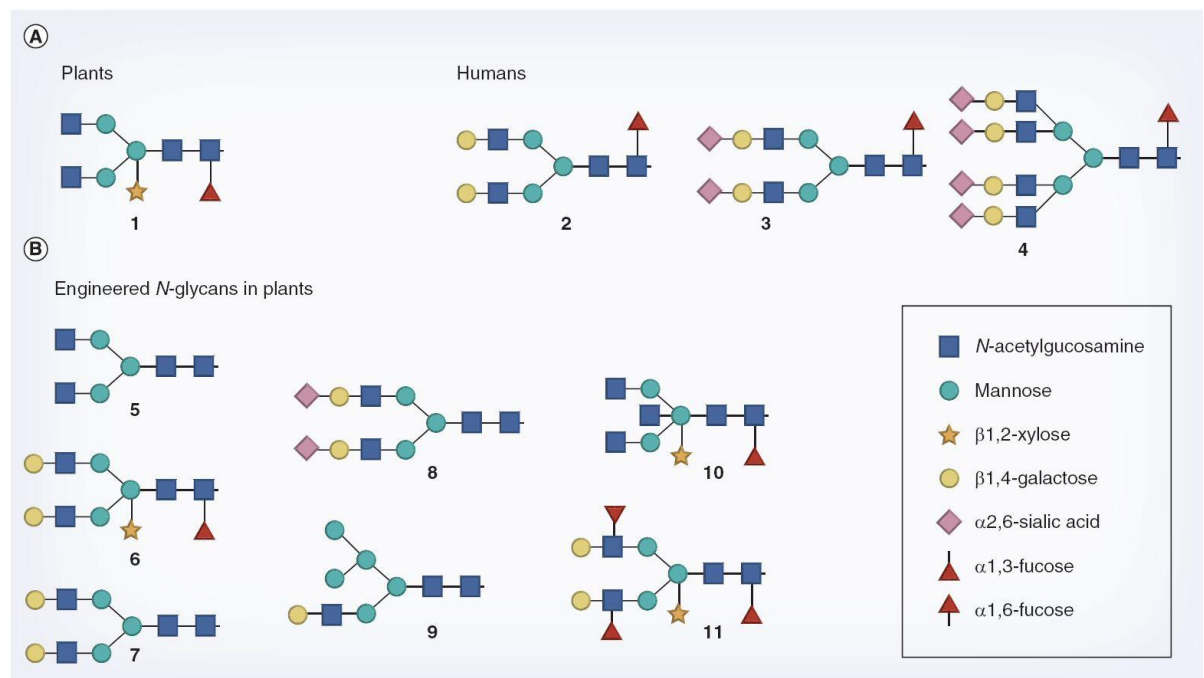


Figura 2. Rappresentazione schematica dei glicani aggiunti dalle piante e dalle cellule umane (A) e dei glicani ottenuti in pianta in seguito ad ingegnerizzazione (B). (Fonte: Bosch & Schots, 2010).

Tuttavia, la modificazione del profilo di glicosilazione può non essere necessaria nel caso in cui la proteina da esprimere sia un antigene per scopo vaccinale; anzi, è stato dimostrato

che la glicosilazione delle proteine con carboidrati specifici di pianta, le rende altamente immunogeniche. Infatti i polisaccaridi di pianta sono sempre più considerati come adiuvanti, in quanto riescono a legare i recettori simili alla lectina presenti alla superficie delle cellule dendritiche (DC) (Bosch & Schots, 2010), cellule in grado di internalizzare l'antigene, processarlo e presentarlo alle cellule coinvolte nelle risposte immunitarie.

Vicino ai molteplici vantaggi dell'utilizzo di questa piattaforma di espressione per la produzione di molecole terapeutiche, esistono tuttavia degli aspetti da considerare. Uno di questi è rappresentato dalla variabilità del livello di espressione della proteina di interesse che si osserva usando specie ospiti, compartimenti di produzione e/o strategie di espressione diversi. Non esiste una strategia migliore in termini universali, e questo aspetto verrà discusso nel dettaglio più avanti. Tuttavia, a causa delle regolamentazioni stringenti, soprattutto in Europa, circa la coltivazione in campo aperto di colture transgeniche, alcune scelte come l'uso di specie auto-impollinanti, o la produzione in compartimenti come il cloroplasto, che limitano la dispersione del transgene nelle colture non modificate geneticamente, potrebbero risultare più vantaggiose. Inoltre, per la produzione di molecole terapeutiche e vaccini per l'uomo, che devono attenersi ai criteri di produzione definiti "Good Manufacturing Practices" (GMP), i sistemi vegetali "a contenimento" potrebbero rappresentare delle piattaforme più conformi a queste procedure rispetto all'uso delle piante intere e più accettabili per la produzione commerciale in quanto più simili a quelle impiegate attualmente (batteri, lieviti, cellule di insetto e di mammifero in coltura). Queste piattaforme comprendono le colture di tessuti vegetali come le sospensioni cellulari, le radici aeree, lo stadio vegetativo del muschio *Physcomitrella patens*, le piante acquatiche della famiglia delle *Lemnaceae* e le colture di microalghe (Karg & Kallio, 2009; Franconi *et al.*, 2010a). Tra questi sistemi, le sospensioni cellulari sono quelle più caratterizzate ed usate da più tempo e ad oggi l'unico vaccino approvato dalla "Food and Drug Administration" (FDA) americana per la commercializzazione è prodotto proprio con questo sistema. Si tratta di un vaccino per uso veterinario, un vaccino per i polli contro il virus della malattia di "Newcastle" (NDV), sviluppato in cellule di tabacco in coltura dalla compagnia americana DowAgroScience (Vermij & Waltz, 2006).

Non verranno descritti nel dettaglio i diversi sistemi a contenimento (ad eccezione delle microalghe, in quanto oggetto di studio di questa tesi di dottorato) ma si riporta una figura che mostra le caratteristiche principali di ogni sistema, in comparazione con le piante transgeniche e con gli attuali sistemi di produzione di vaccini (**figura 3**).

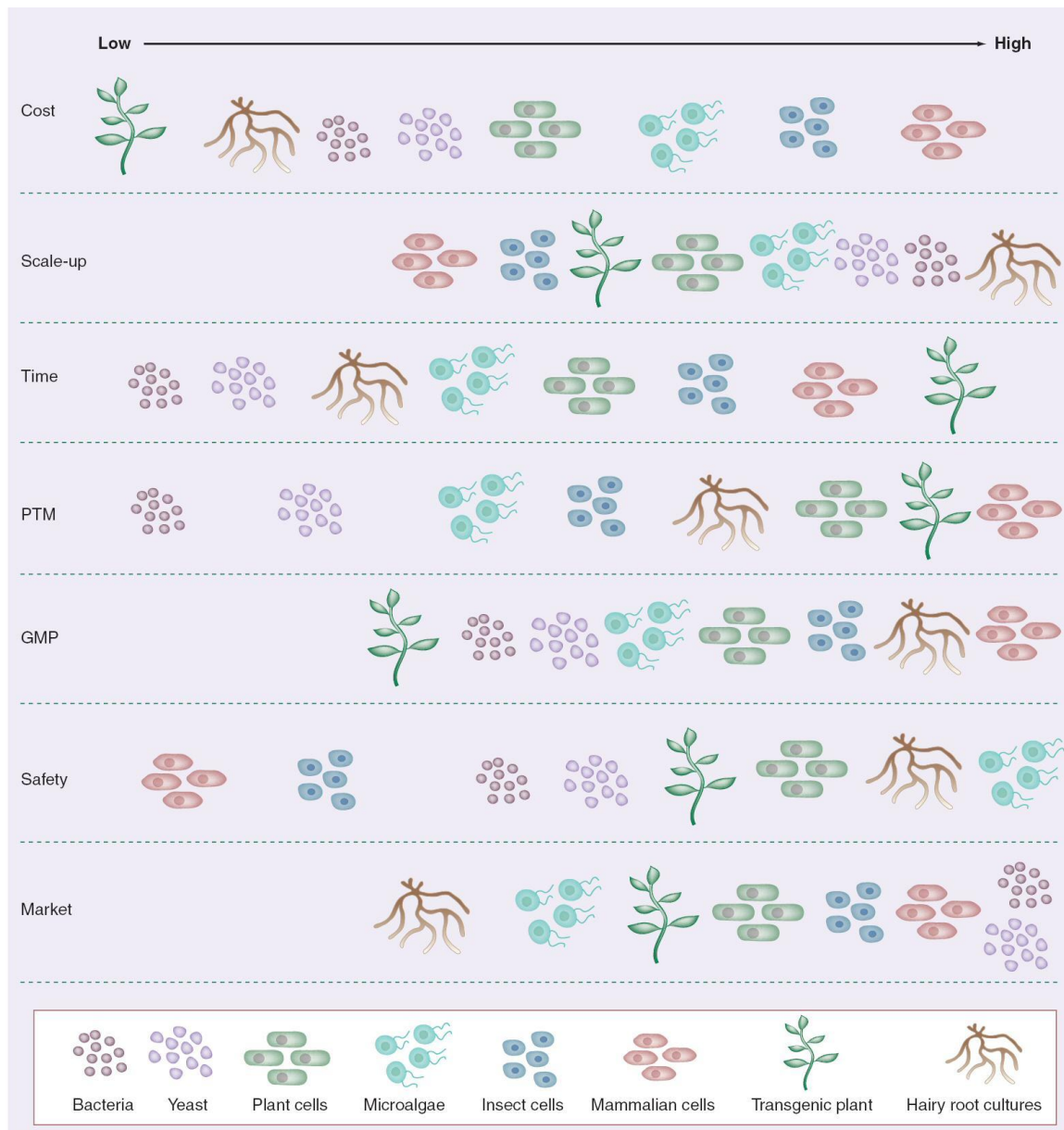


Figura 3. Comparazione delle principali piattaforme per la produzione di vaccini. (Fonte: Franconi *et al.*, 2010).

I vantaggi e gli svantaggi di ogni sistema sono mostrati in relazione ai costi di produzione (**Cost**), alla possibilità di produzione su scala industriale (**Scale-up**), ai tempi di produzione (**Time**), all'autenticità di struttura della proteina prodotta dovuta alla capacità di offrire modificazioni post-traduzionali (**PTM**), alla capacità di adattarsi alle procedure "Good manufacturing practices" (**GMP**), alla sicurezza del sistema in termini di presenza di patogeni o composti tossici nel prodotto finale (**Safety**) e alla loro posizione rispetto alla commercializzazione (**Market**).

Le microalghe rappresentano un gruppo altamente eterogeneo di microrganismi fotosintetici e/o eterotrofici che si trovano negli ambienti marini o di acqua dolce. Esse comprendono specie unicellulari appartenenti al regno dei Protisti, che vivono individualmente o associati in catene o gruppi. Alcune specie sono attualmente impiegate per la produzione commerciale di composti ad alto valore aggiunto (Walker *et al.*, 2005); in aggiunta, le microalghe sono ampiamente studiate per la produzione di differenti "biofuels" (Radakovits *et al.*, 2010) e per la "bio-remediation" (Rajamani *et al.*, 2007).

Recentemente, le microalghe fotosintetiche definite “microalghe verdi”, appartenenti alla classe delle *Chlorophyceae*, come *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Haematococcus* e *Dunaliella*, sono state proposte come sistema alternativo alle piante per la produzione di molecole di interesse farmaceutico (Franklin & Mayfield, 2004; Griesbeck *et al.*, 2006; Barzegari *et al.*, 2009; Specht *et al.*, 2010). Queste microalghe non contengono tossine o patogeni umani e sono definite “Generally Regarded As Safe” (GRAS), e rappresentano quindi una piattaforma sicura per la produzione dei vaccini, con la possibilità di somministrare oralmente il materiale algale non processato o parzialmente processato. Inoltre, le microalghe richiedono mezzi di crescita semplici e presentano una crescita vegetativa rapida. Ad esempio, *Chlamydomonas reinhardtii* duplica ogni 8 ore se cresciuta in condizioni di 12 ore di luce e 12 di buio (Harris, 2001). Ad oggi *Chlamydomonas* rappresenta la microalga più caratterizzata, con i suoi tre genomi (nucleare, mitocondriale e plastidiale) completamente sequenziati (Merchant *et al.*, 2007). Generalmente le microalghe sono più efficienti delle piante terrestri nel convertire l’energia solare in biomassa, in quanto possiedono una struttura cellulare semplice e vivono sommerse in ambienti acquatici dove hanno facile accesso alla CO₂ e agli altri nutrienti. Inoltre, le microalghe possono essere trasformate con metodi più semplici e veloci rispetto alle piante, ed essendo organismi unicellulari uniformi in tipologia e dimensioni, la produzione della proteina nelle linee transgeniche è uniforme. Ciò rende più facile la purificazione e inoltre potrebbe permettere realmente di effettuare vaccinazioni orali con materiale non processato, in quanto la dose dell’antigene è nota (Franconi *et al.*, 2010a).

Sebbene numerosi lavori riportino l’impiego delle piante e dei sistemi vegetali a contenimento per la produzione di antigeni vaccinali per l’uomo, dal punto di vista pratico le uniche molecole ad essere state commercializzate sono reagenti e biosimilari (**tabella 1**). Tra queste è importante riportare l’esempio della produzione in tabacco a Cuba di un anticorpo per la purificazione del vaccino contro l’epatite B (Pujol *et al.*, 2005).

Tuttavia, numerosi biofarmaceutici per uso clinico (compresi vaccini) prodotti in campo aperto, serra o sistemi contenuti, si trovano in studi clinici avanzati o sono vicini alla commercializzazione (**tabella 2**). Un esempio è rappresentato dai vaccini anti-influenzali sviluppati in alfalfa con sistemi di espressione transienti dalla compagnia canadese Medicago (d’Aoust *et al.*, 2008). In generale, le molecole terapeutiche (anticorpi, fattori di crescita, analoghi di sostituzione, immunostimolatori e soppressori) rappresentano la porzione dell’industria farmaceutica in più rapida espansione (Karg & Kallio, 2009).

Mentre i primi biofarmaceutici prodotti erano rappresentati soprattutto da proteine per terapie di sostituzione, come l'eritropoietina oppure gli ormoni di crescita, le molecole attualmente più importanti per il mercato includono gli anticorpi monoclonali o altre proteine, per il trattamento del cancro e delle malattie infiammatorie. La vendita di questi biofarmaceutici è incrementata enormemente negli ultimi anni, con l'esempio più eclatante costituito dall'anticorpo monoclonale "Herceptin" usato per il trattamento del cancro al seno, la cui vendita è cresciuta dell'82% dal 2005 al 2006 negli Stati Uniti. Nel 2007 i tre farmaceutici più venduti dalla Roche sono stati proprio anticorpi monoclonali ("Rituxan/Mabthera", "Herceptin", e "Avastin"), portando ad un guadagno di circa 20 milioni di € nel 2007. E' stato stimato che questo settore crescerà fino a vendite di 38 milioni di € ogni anno a partire dal 2013 (Karg & Kallio, 2009). La continua crescita del settore ha portato nel passato ad una mancanza di capacità produttiva per i biofarmaceutici, e ad esempio la compagnia Immunex non è stata in grado di coprire la richiesta per il farmaco "Enbrel" da essa prodotto per la cura dell'artrite (un recettore solubile per il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) fuso alla porzione costante di una IgG1) per un periodo di 2 anni. L'industria ha quindi reagito mediante l'incremento di produttività dei tradizionali sistemi di produzione ed esplorando vie alternative come le piante transgeniche (Karg & Kallio, 2009).

Questi esempi mostrano come nei prossimi anni la commercializzazione dei biofarmaceutici prodotti da pianta riguarderà principalmente le categorie degli anticorpi monoclonali e degli analoghi di sostituzione, mentre per gli antigeni vaccinali bisognerà aspettare che le industrie farmaceutiche investano nel settore e molto probabilmente i primi vaccini vegetali ad essere commercializzati saranno i vaccini veterinari (Rybicki, 2009).

Tabella 1: Molecole prodotte in pianta presenti in commercio (Fonte: Sharma & Sharma, 2009)

Product name	Company name	Plant system	Commercial name
Avidin	Prodigene	Corn	Avidin
β -Glucuronidase	Prodigene	Corn	GUS
Trypsin	Prodigene	Corn	TrypZean™
Recombinant human lactoferrin	Meristem Therapeutics, Ventria Bioscience	Corn, rice	Lacromin™
Recombinant human lysozyme	Ventria Bioscience	Rice	Lysobac™
Aprotonin	Prodigene	Corn, transgenic tobacco	AproliZean
Recombinant lipase	Meristem Therapeutics	Corn	Merispase®
Recombinant human intrinsic factor	Cobento Biotech AS	<i>Arabidopsis</i>	Coban
Vaccine purification antibody	CIGB, Cuba	Tobacco	-

Tabella 2: Biofarmaceutici per usi clinici prodotti in pianta vicino alla commercializzazione (Fonte: Karg & Kallio, 2009)

Company name	Product	Indication	Production host	Status
Planet Biotechnology Inc.	CaroRx™	Prevention of tooth decay	Tobacco (field-grown)	Approved for human use in Europe
Planet Biotechnology Inc.	ICAM-1-antibody-fusion-protein	Prevention and treatment of the common cold	Tobacco (field-grown)	In phase I clinical trials
Planet Biotechnology Inc.	Anti-doxorubicin-antibody	Prevention of chemotherapy induced hair loss	Tobacco (field-grown)	Undisclosed
Cobento AS	Human intrinsic factor	Dietary supplement for the treatment of vitamin B-12 deficiency	<i>Arabidopsis</i> (greenhouse)	Approved for human use in Europe
Ventria Bioscience	Human lactoferrin, Human lysozyme	Dietary supplement for acute pediatric diarrhea	Rice (field-grown)	Release expected soon
SemBioSys Genetics Inc.	Recombinant human insulin	Treatment of diabetes	Safflower (field-grown)	In phase I/II clinical trials
SemBioSys Genetics Inc.	Apolipoprotein	Reduction of plaque associated with stroke and acute coronary syndrome	Safflower (field-grown)	Entry into human expected soon
Kentucky BioProcessing LLC	Aprotinin	Reduction of systemic inflammation due to cardiopulmonary bypass surgery	Tobacco (greenhouse)	Already sold for non-clinical use, Clinical status undisclosed
Mapp Biopharmaceutical Inc. with Kentucky BioProcessing LLC	Anti-viral microbicide	Undisclosed	<i>N. benthamiana</i> (greenhouse)	Undisclosed
Bayer Innovation GmbH with Kentucky BioProcessing LLC	Anti-bacterial monoclonal antibody	Treatment of <i>Clostridium difficile</i> disease		
Bayer Innovation GmbH with Kentucky BioProcessing LLC	Undisclosed high-value proteins	Undisclosed	Tobacco (undisclosed)	Undisclosed
Intrucept Biomedicine	Anti-viral proteins	Various	Undisclosed	Undisclosed
Medicago	Influenza vaccines	Prevention of influenza	Alfalfa (greenhouse)	Undisclosed
Bayer Innovation GmbH (formerly Icon Genetics)	Personalized cancer vaccines		Tobacco (greenhouse)	Undisclosed
Protalix BioTherapeutics	Glucocerebrosidase	Gaucher's disease	Carrot cells (cell culture)	In phase III clinical trials
Protalix BioTherapeutics	Alpha-galactosidase, Follicle stimulating hormone, Acetylcholinesterase	Fabry disease, female infertility, undisclosed	Carrot cells (cell culture)	In preclinical development
Greenovation	Undisclosed	Undisclosed	<i>P. patens</i> (cell culture)	In preclinical development
Biolex	Locteron (alpha-interferon)	Chronic hepatitis C	Duckweed (contained)	In phase II clinical trials
Biolex	Full-length recombinant plasmin, Anti-CD20 antibody	Acute peripheral arterial disease, non-Hodgkin's lymphoma	Duckweed (contained)	In preclinical development

1.1.2 SISTEMI DI ESPRESSIONE

Sono due i principali sistemi per produrre antigeni in sistemi vegetali: la trasformazione stabile (del nucleo o del cloroplasto) e l'espressione transiente.

1.1.2.1 Trasformazione genetica stabile

1.1.2.1.1 Trasformazione nucleare

Una delle principali scoperte che ha consentito la manipolazione delle specie vegetali è stata quella che il trasferimento di un gene nei cromosomi di una pianta può essere mediato dall'infezione con il batterio fitopatogeno del terreno *Agrobacterium tumefaciens* (Koncz *et al.*, 1984). Durante il processo naturale di infezione indotto dalla presenza di una lesione in un tessuto vegetale, *A. tumefaciens* trasferisce una copia a singolo filamento di un segmento del suo plasmide "Tumor-inducing" (Ti-DNA o T-DNA) complessato con proteine e fiancheggiato da specifiche sequenze ripetute ("left" e "right borders", LB e RB) richieste per l'integrazione nel genoma della pianta ospite, attraverso un meccanismo simile alla coniugazione batterica. Il trasferimento e l'inserzione del materiale genetico sono mediati dalle proteine *vir* codificate dai corrispondenti geni. Una volta dentro la cellula vegetale, il T-DNA si integra a caso nel DNA cromosomico; tale integrazione permette l'espressione dei geni plasmidici compresi quelli codificanti per citochinine, che inducono la divisione cellulare, portando ad una patologia definita tumore del colletto, risultante nella formazione di galle.

Le biotecnologie vegetali sfruttano *A. tumefaciens* per trasferire geni eterologhi nel DNA genomico della cellula vegetale impiegando vettori definiti binari. Questi vettori consistono di due parti: il primo componente è il T-DNA (il segmento compreso tra LB e RB) e contiene generalmente un sito multiplo di clonaggio, un marcatore per la selezione delle cellule trasformate, un gene "reporter" e altri geni di interesse; il secondo componente contiene le sequenze necessarie per la replicazione in *E. coli* e *A. tumefaciens*, un marcatore di selezione per i batteri, ed eventualmente i geni responsabili della mobilizzazione del plasmide (Komori *et al.*, 2007; Lee & Gelvin, 2008).

L'applicabilità della trasformazione mediata da *Agrobacterium*, dapprima limitata al tabacco e a poche altre specie, è ora ampliata alla maggior parte delle specie vegetali d'interesse agronomico, comprese graminacee e leguminose. Inoltre questa tecnica è applicabile alla microalga *C. reinhardtii* (Kumar *et al.*, 2004).

La trasformazione nucleare può essere anche ottenuta con il metodo biolistico (entrambe le tecniche sono rappresentate in **figura 4**). Le cellule vengono bombardate ad alta velocità e pressione con microproiettili d'oro o tungsteno sulle quali è stato fatto aderire il

DNA di interesse, che si integra nel genoma nucleare producendo dei trasformanti stabili. Oltre alle tecniche appena descritte, ceppi di *C. reinhardtii* privi di parete, possono essere trasformati con altre metodologie come l'elettroporazione, l'agitazione in presenza di dischi di carburo o in presenza di biglie di vetro (metodo delle "glass beads", **figura 5**) (Franconi *et al.*, 2010a). Quest'ultimo è di semplice realizzazione e nel giro di 10 giorni permette di ottenere un elevato numero di linee trasformanti (Kindle, 1990).

Tuttavia, il livello d'espressione della proteina ricombinante nelle piante o negli altri sistemi trasformati stabilmente, non è generalmente molto elevato, anche se può variare considerevolmente, in quanto l'inserzione del transgene è casuale e la conseguente espressione proteica può essere soggetta ad un aumento del numero di copie, ad effetti posizionali e a silenziamento genico. Attualmente, la pianta acquatica *Spirodela oligorrhiza*, con il 25% delle TSP di accumulo della proteina GFP, rappresenta il livello maggiore di espressione di una proteina eterologa in pianta mediante trasformazione nucleare (Vunsh *et al.*, 2007), mentre *C. reinhardtii* è recalcitrante all'espressione di geni esogeni secondo questa via di trasformazione, presumibilmente a causa di forti meccanismi epigenetici non convenzionali e/o strutture altamente compatte di cromatina (Neupert *et al.*, 2009).

La maggior parte delle molecole di interesse farmaceutico sono state ottenute in pianta mediante espressione stabile del transgene, ed includono gli antigeni vaccinali dei tre principali patogeni studiati a livello mondiale, la subunità B della tossina di *Vibrio cholerae* (CTB), la subunità B dell'enterotossina termolabile di *E. coli* (LTB) e l'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBsAg). Per maggiori informazioni, in Tiwari *et al.*, 2009 vengono riportate tabelle dettagliate di tutti gli antigeni vaccinali prodotti con questo sistema.

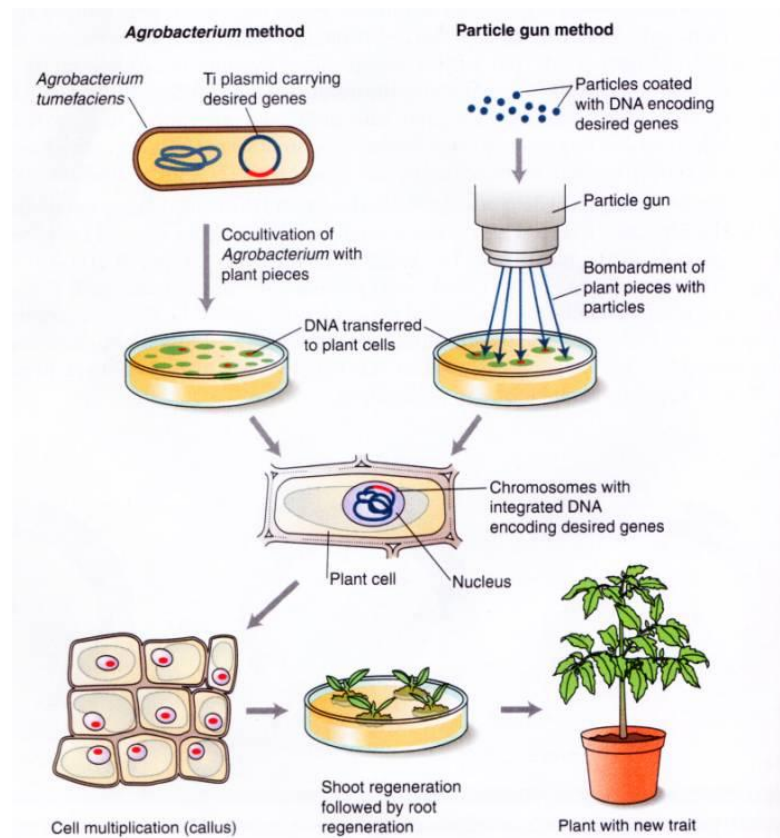


Figura 4. Generazione di piante transgeniche mediante trasformazione nucleare con il metodo dell'agrobatterio o con il metodo biolistico. (Fonte: sito web 1)

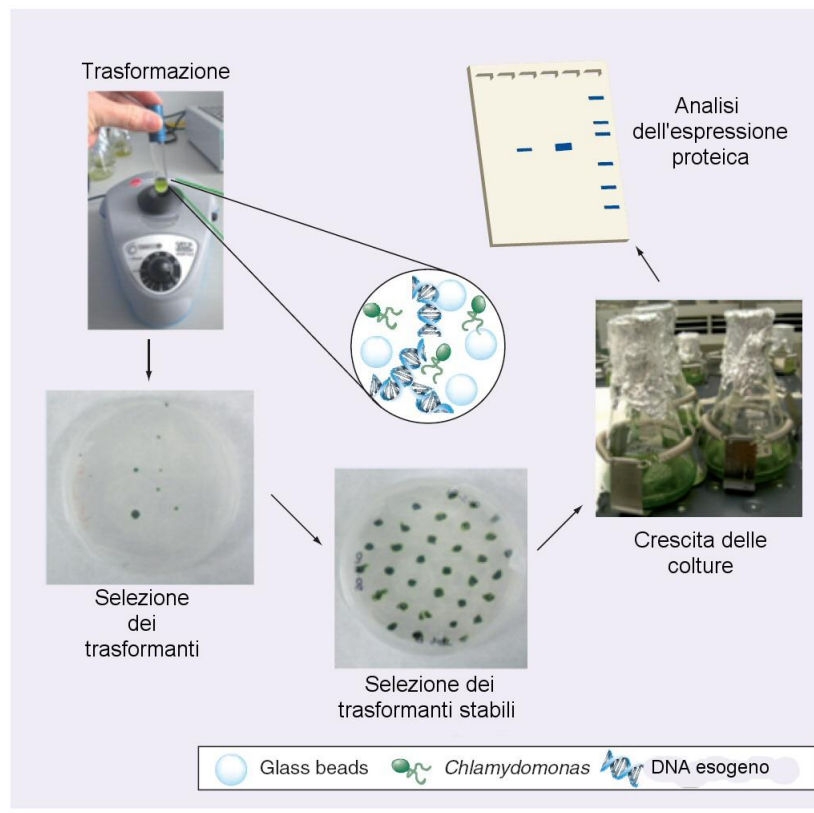


Figura 5. Generazione di linee transgeniche di *C. reinhardtii* mediante trasformazione nucleare con il metodo delle "glass beads". (Figura modificata da Franconi *et al.*, 2010a).
L'agitazione delle cellule in presenza di biglie di vetro crea dei pori nella membrana che consentono al DNA esogeno di penetrare nella cellula e quindi di integrarsi casualmente nel genoma nucleare.

1.1.2.1.2 Trasformazione plastidiale

Le piante possono essere trasformate stabilmente a livello del genoma plastidiale, principalmente con il metodo biolistico. La prima trasformazione del cloroplasto è stata ottenuta con questo metodo in *C. reinhardtii* (Boynton *et al.*, 1988).

Oltre al metodo biolistico, la trasformazione dei cloroplasti nelle piante superiori può essere effettuata su protoplasti permeabilizzati con polietilen-glicole (PEG) (Cardi *et al.*, 2010) e nei ceppi di *Chlamydomonas* privi di parete con il metodo delle “glass beads” appena descritto (Kindle *et al.*, 1991). Infatti, *C. reinhardtii* presenta un unico grande cloroplasto addossato alla membrana plasmatica (**figura 6**), che occupa approssimativamente il 40 % del volume cellulare (e contiene circa 80 copie di genoma plastidiale), per cui agitando le cellule in presenza di biglie di vetro e DNA, si riescono a raggiungere anche i genomi plastidiali. La trasformazione di questo organello con entrambe i metodi (biolistico e delle “glass beads”) risulta molto semplice e consente di ottenere linee trasformanti omoplasmiche in circa 4-6 settimane (Mayfield *et al.*, 2007). Le piante superiori possiedono invece copie multiple di cloroplasti in ogni cellula (all'incirca 100) ed ogni cloroplasto presenta circa 100 copie di DNA circolare; di conseguenza, rispetto a *Chlamydomonas*, i tempi per l'ottenimento di linee trasformanti omoplasmiche sono più lunghi, ma l'amplificazione del transgene è più elevata e quindi si ottengono livelli di espressione della proteina eterologa generalmente molto alti (Bock *et al.*, 2001). In **figura 7** è schematizzata la trasformazione del cloroplasto e l'ottenimento dello stato omoplasmico in una cellula vegetale (A) e in *C. reinhardtii* (B).

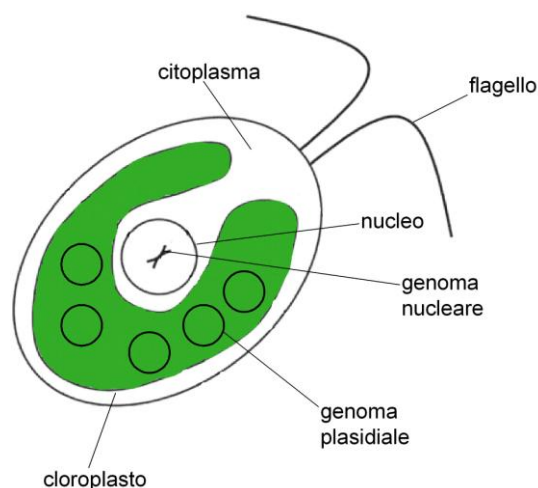


Figura 6. Rappresentazione della struttura di *Chlamydomonas reinhardtii*. (Figura modificata da Griesbeck *et al.*, 2006).

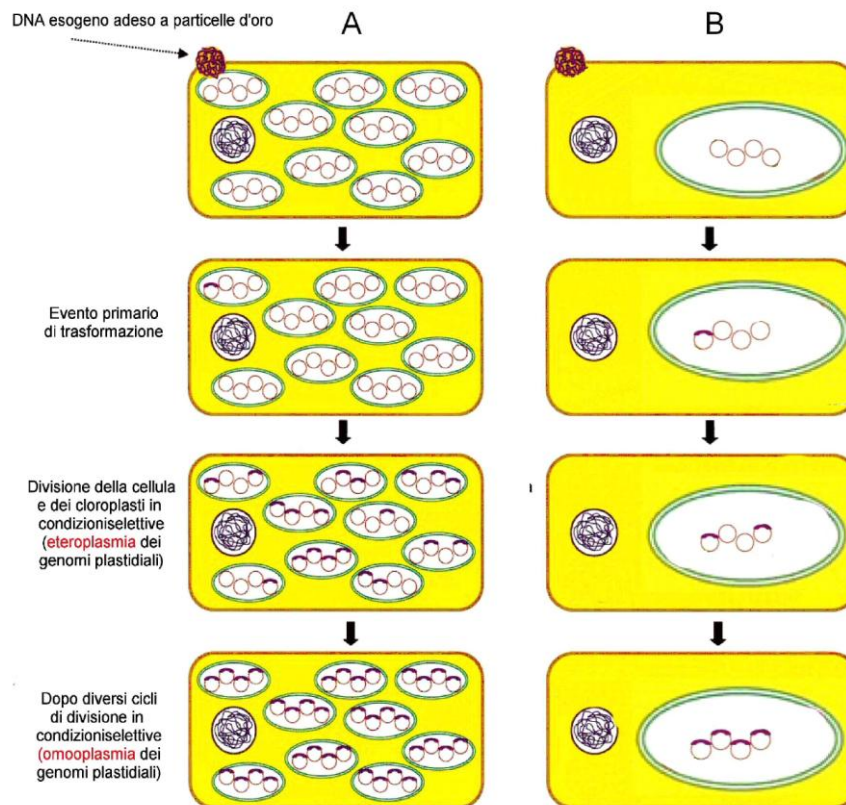


Figura 7. Traformazione dei cloroplasti ed ottenimento dell'omoplasma nelle piante superiori (A) e in *C. reinhardtii* (B) (Figura modificata da Bock, 2001).

Uno dei più alti livelli di espressione di proteine ricombinanti in pianta è stata ottenuta con questa tecnologia ed è rappresentato dalla proteina cry2Aa2 di *Bacillus thuringiensis* (Bt) al 46.1% delle proteine solubili totali (TSP) (De Cosa *et al.* 2001).

Gli alti livelli di espressione sono anche dovuti alla mancanza dei fenomeni di silenziamento genico e la mancanza di effetti di posizione dovuta al fatto che l'integrazione del transgene è sito-specifica (Cardi *et al.*, 2010). Nella trasformazione nucleare l'integrazione casuale del transgene per ricombinazione non omologa determina linee transgeniche caratterizzate da un'estrema variabilità di espressione del gene eterologo e ciò richiede lo "screening" di centinaia di eventi di trasformazione indipendenti che, invece, non è richiesto per la selezione di linee transgeniche in cloroplasto, grazie all'espressione uniforme del transgene dovuta all'integrazione sito-specifica. Tale integrazione avviene mediante eventi di ricombinazione omologa mediata da un sistema simile a quello batterico basato sulla proteina RecA (Day & Madesis, 2007).

I vettori per la trasformazione del cloroplasto includono le tipiche regioni presenti nei vettori di espressione, ovvero il marcatore di selezione, il sito multiplo di clonaggio e le regioni regolative per l'espressione in pianta, comprese tra due sequenze di DNA plastidiale di circa 1-2 kb. Queste sequenze dirigono l'inserzione del transgene in regioni

intergeniche del genoma plastidiale (Verma & Daniell, 2007) (**figura 8**).

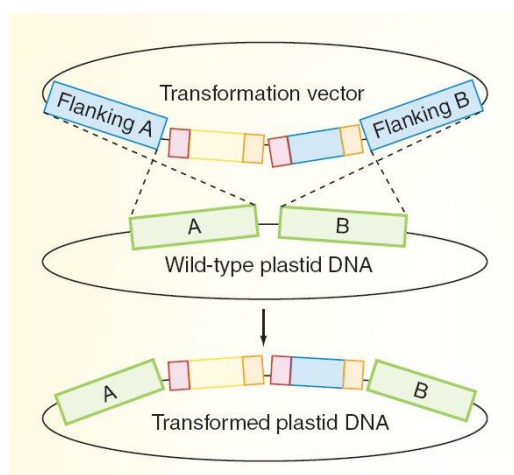


Figura 8. Rappresentazione schematica del processo di integrazione nel genoma plastidiale (Figura modificata da Cardi *et al.*, 2010).

La trasformazione plastidiale offre la possibilità di trasformare con più transgeni in un unico evento di trasformazione (“multi-gene engineering”) (De Cosa *et al.*, 2001) e il contenimento del transgene, in quanto i cloroplasti vengono ereditati per via materna nella maggior parte delle angiosperme e quindi non c’è rischio di dispersione del transgene attraverso il polline (Daniell *et al.*, 2002).

Una limitazione di questa tecnologia è rappresentata dalla mancanza dei sistemi specializzati di processamento come la glicosilazione, per cui questo sistema potrebbe non essere adatto all’espressione di proteine che necessitino di queste modificazioni post-traduzionali. Tuttavia, il cloroplasto è in grado di processare le proteine eucariotiche permettendo un corretto ripiegamento delle subunità e la formazione di ponti disolfuro. Le chaperonine presenti nel cloroplasto facilitano infatti il corretto ripiegamento e assemblaggio dei complessi proteici multi-subunità (Daniell *et al.*, 2005).

Molti esempi di “molecular farming” basato sull’espressione nel cloroplasto nelle piante superiori sono stati riportati in tabacco (dove la tecnologia per il trasferimento genico in cloroplasto è più avanzata) e pochi in altre specie (Chebolu & Daniell, 2009; Cardi *et al.*, 2010). Ad esempio, nell’ambito degli antigeni dei due virus oggetto di studio di questa tesi, che verranno descritti in seguito, la proteina L1 del virus del papilloma umano di tipo 16 (HPV-16) è stata espressa in cloroplasto di tabacco al 24% delle TSP, portando alla formazione di “virus-like particles”, VLP (Fernández-San Millán *et al.*, 2008). Inoltre è stata prodotta la proteina di fusione costituita dalla proteina E7 di HPV-16 e la proteina di rivestimento del virus X della patata, PVX (Morgenfeld *et al.*, 2009), che in precedenza il nostro laboratorio aveva realizzato sotto forma di costrutto a DNA per vaccinazioni

genetiche (Massa *et al.*, 2008). Inoltre, la proteina S del SARS-CoV è stata espressa in cloroplasto, sebbene con basse rese (0.2% delle TSP) (Li *et al.*, 2006).

Per la produzione di molecole eterologhe in *C. reinhardtii*, ad oggi la trasformazione del cloroplasto risulta la migliore via perseguibile, in quanto come già accennato, la trasformazione nucleare genera livelli di espressione troppo bassi. Diverse molecole ricombinanti come molecole terapeutiche, antigeni vaccinali e soprattutto anticorpi, sono state prodotte nel cloroplasto di *C. reinhardtii* (Specht *et al.*, 2010). Il livello di espressione più alto è stato ottenuto per una proteina presente nel colostro dei mammiferi, ottenendo rese del 5% delle TSP (Manuell *et al.*, 2007).

1.1.2.2 Espressione transiente

L'espressione genica transiente rappresenta una valida alternativa all'espressione transgenica nucleare stabile, in quanto generalmente si ottengono livelli di espressione maggiori, in tempi ridotti. I sistemi di espressione transienti, mediati dall'agrobatterio o da virus vegetali, sfruttano la replicazione batterica o virale, che amplifica il numero di copie del gene d'interesse e tipicamente ne determina un livello di espressione molto più alto rispetto alla trasformazione stabile. L'espressione transiente è specialmente vantaggiosa per specie recalcitranti alla rigenerazione; in aggiunta, non richiedendo l'integrazione del gene di interesse nel genoma dell'ospite, determina livelli di espressione della proteina di interesse che non sono influenzati da effetti di posizione e sono valutabili in tempi brevi (Komarova *et al.*, 2010). Con questo sistema di espressione non viene permessa la diffusione del transgene con il polline e nei casi in cui il gene eterologo codifica per un prodotto tossico o che interferisce con il metabolismo della pianta (e che, dunque, non potrebbe essere espresso in piante transgeniche stabili), l'espressione transiente rappresenta l'unica possibilità. Infatti, essendo le piante infettate quando sono già cresciute, i problemi dovuti alla possibile tossicità del prodotto proteico sono ridotti.

E' ormai una visione comune che questa piattaforma per la produzione di biofarmaceutici potrà presto sostituire il sistema di produzione basato sulle piante transgeniche stabili, e potrà quindi essere realmente competitivo con i sistemi di produzione convenzionali (Rybicki, 2010; Komarova *et al.*, 2010).

Ad oggi non esistono lavori che riportano la produzione di proteine eterologhe in microalghe con sistemi transienti, ma alcuni studi fanno emergere la possibilità di impiegare in futuro virus a DNA che infettano le microalghe del genere *Chlorella* (Van Etten, 2009).

1.1.2.2.1 Espressione mediata da *Agrobacterium* (agroinfiltrazione)

L'espressione transiente mediata da *Agrobacterium* si basa sostanzialmente sull'infiltrazione di materiale vegetale con gli stessi ceppi di *A. tumefaciens* ricombinanti impiegati per la generazione di piante transgeniche. Questi ceppi contengono il vettore binario necessario per l'infezione delle cellule vegetali e per l'espressione del gene di interesse.

Mentre per la trasformazione stabile è richiesta l'integrazione del T-DNA nel genoma dell'ospite, nel caso transiente, copie di T-DNA che non si integrano, rimangono transientemente presenti nel nucleo dell'ospite e vengono trascritte per portare all'espressione dei geni clonati al loro interno (Kapila *et al.*, 1996). Un grande vantaggio di questo sistema rispetto alla controparte transgenica è la velocità con cui si ottiene la molecola di interesse, circa 3-4 giorni dopo l'infiltrazione con la coltura di agrobatterio (Lee & Yang, 2006; Kim *et al.*, 2009). Purtroppo però, dopo il picco di espressione che si verifica generalmente a 72 ore dall'infiltrazione, la produzione della molecola esogena declina rapidamente, principalmente a causa del fenomeno di "silencing" post-trascrizionale, PTGS (Johansen & Carrington, 2001). Tuttavia, questo fenomeno può essere attenuato e quindi portare all'incremento dei livelli di espressione della proteina d'interesse, mediante co-infiltrazione del gene d'interesse con il gene che codifica per un soppressore del silencing (Voinnet *et al.*, 2003; Lombardi *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009).

Un'altra attraente caratteristica di questo sistema è la semplicità; l'ottenimento di materiale esprimente la molecola di interesse può essere infatti ottenuta semplicemente mediante agro-infiltrazione manuale o sotto-vuoto di tessuti o piante intere (Negrouk *et al.*, 2005; Tague & Mantis, 2006; Simmons *et al.*, 2009; Medrano *et al.*, 2009) oppure mediante il metodo di inoculo definito "wound-and-agrospray" (Azhakanandam *et al.*, 2007).

Tuttavia, il sistema di espressione transiente mediato da *A. tumefaciens*, a differenza dei sistemi transienti basati sui vettori virali (descritti nel prossimo paragrafo), non porta all'espressione del gene d'interesse nella via sistemica della pianta, ma solo nelle circostanze del luogo di inoculo. D'altra parte, però, presenta il vantaggio di poter ospitare sequenze esogene di lunghezza anche superiore a 2 kb che non sono invece supportate dalla maggior parte dei vettori virali (Voinnet *et al.*, 2003). Inoltre vi è la possibilità di co-esprimere più geni esogeni e di produrre quindi proteine multimeriche come ad esempio gli anticorpi, attraverso l'introduzione di più sequenze all'interno di un unico vettore (Kapila *et al.*, 1996; Vaquero *et al.*, 1999), oppure mediante la co-

infiltrazione con differenti colture di *Agrobacterium* (Voinnet *et al.*, 2003).

La tecnica dell'agroinfiltrazione può essere utilizzata per produrre limitate quantità di proteina di interesse al fine di verificarne l'espressione prima di procedere alla produzione di piante transgeniche stabili, oppure per produrre elevate quantità di proteina e, dunque, come piattaforma principale di produzione. Infatti, in linea di principio, il sistema di espressione transiente mediato da *Agrobacterium* può essere applicato su scala industriale (figura 9).

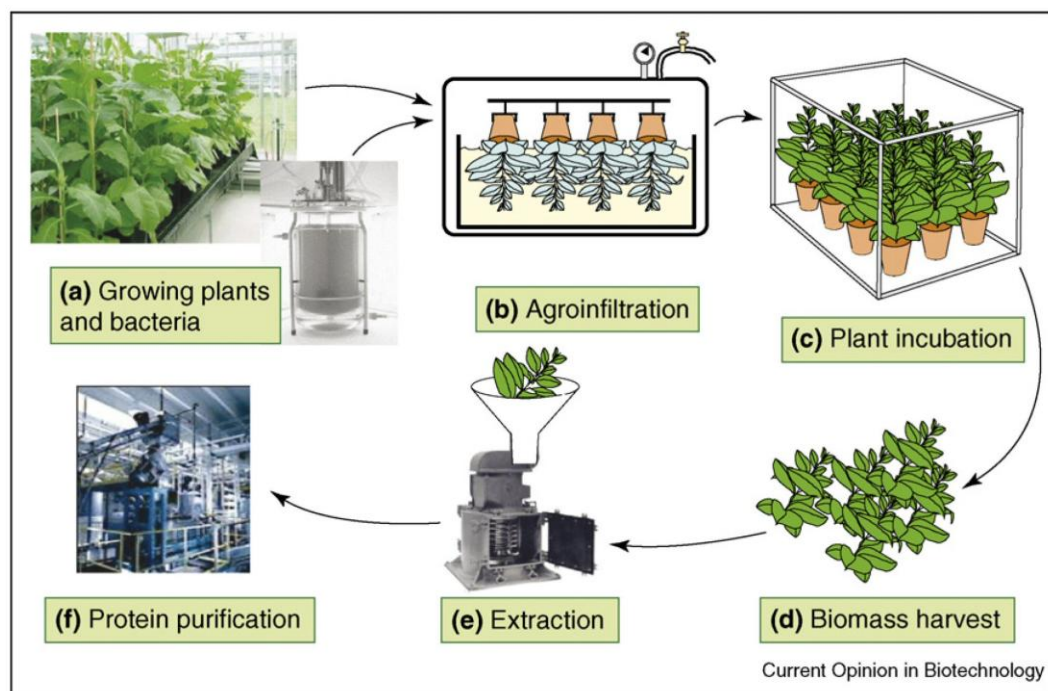


Figura 9. Schema della produzione di proteine ricombinanti in pianta mediante agroinfiltrazione (Fonte: Gleba *et al.*, 2007).

Numerosi biofarmaceutici sono già stati espressi in pianta con questo sistema, impiegando principalmente le specie *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Lactuca sativa* e *Arabidopsis thaliana* (Komarova *et al.*, 2010).

Alcuni esempi comprendono l'espressione in *N. tabacum* dell'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBsAg) (Huang & Mason, 2004), l'espressione in *N. benthamiana* della proteina N del SARS-CoV (Zheng *et al.*, 2009) e l'ottenimento di VLP di L1 di HPV-16 (Maclean *et al.*, 2007).

1.1.2.2.2 Espressione mediata da vettori virali di “prima generazione”

Questa tecnologia sfrutta la capacità dei virus vegetali di infettare le piante ad essi suscettibili. Il gene codificante per la proteina di interesse viene clonato nel genoma virale e il virus ingegnerizzato sotto forma di copie infettive di acido nucleico o di particelle

virali mature, è utilizzato per l'infezione di piante ospiti all'opportuno stadio di crescita. Il virus così si diffonde e si replica e, come conseguenza, numerose copie del gene eterologo sono prodotte dalla pianta ospite, ottenendo spesso alti livelli di espressione in un periodo di tempo relativamente breve. I virus vegetali rimangono nel citoplasma e non sono incorporati nel genoma dell'ospite. Sostanzialmente, vettori virali efficienti consistono di virus pienamente funzionali che di solito si comportano come il virus selvatico e mantengono dunque l'infettività, sono stabili, hanno la capacità di diffondere sistemicamente nella pianta ospite e producono particelle virali infettive; questi vettori sono stati modificati in modo da poter sostenere il clonaggio e consentire l'espressione del gene che codifica per la proteina eterologa di interesse.

Si parla in questo caso di vettori virali di prima generazione, per distinguerli dai vettori di seconda generazione che verranno descritti più avanti (Gleba *et al.*, 2007).

Numerose proteine di interesse farmaceutico sono state ottenute in pianta con questa tecnologia (vedi Komarova *et al.*, 2009), che è stata inoltre utilizzata per esprimere proteine eterologhe in colture di radici aeree (Shadwick & Doran, 2007a, b).

I virus vegetali usati per questi scopi sono classificabili in tre categorie: virus a DNA a singolo filamento, virus a RNA (a doppio filamento, a singolo filamento con polarità positiva, a singolo filamento con polarità negativa) e pararetrovirus.

I vettori virali ingegnerizzati attualmente più utilizzati appartengono ai generi *Tobamovirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Bromovirus*, *Comovirus* e *Geminivirus* (Komarova *et al.*, 2010) e in particolare, nell'ambito di questa tesi di dottorato è stato impiegato un vettore appartenente al genere *Potexvirus*, il virus X della patata.

1.1.2.2.2.1 Il virus X della patata (PVX)

Il virus X della patata (PVX) è un virus filamentoso a RNA (6.4 kb) a singolo filamento con polarità positiva, appartenente al genere *Potexvirus*. La molecola di RNA virale è racchiusa da un rivestimento proteico costituito da circa 1300 unità della medesima proteina ("coat protein", CP) di 237 aa (Parker *et al.*, 2002). L'estremità N-terminale della CP è esposta sulla superficie del virione (Baratova *et al.*, 1992).

In direzione 5'-3' il genoma contiene cinque grandi "open reading frames" (ORF) (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007) (**figura 10**). La prima ORF codifica per una proteina di circa 166 K (RdRp), coinvolta nella replicazione virale. Seguono tre ORF parzialmente sovrapposte, definite come triplo blocco genico (TGB), codificanti per tre proteine, M1, M2 e M3 rispettivamente di 25, 12 e 8 K. Il prodotto di trascrizione di tali geni è coinvolto nel movimento cellula-cellula del virus nell'organismo ospite (Verchot-Lubicz,

2005). Dopo il triplo blocco si trova l'ORF che codifica per la proteina di rivestimento del capside virale (CP), necessaria per l'assemblaggio del virione e per il movimento cellula-cellula.

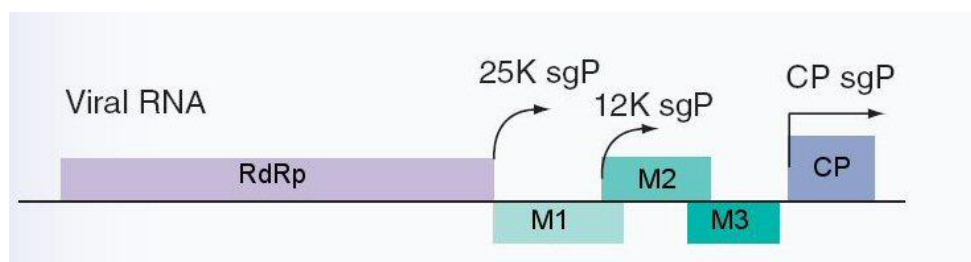


Figura 10. Rappresentazione schematica del genoma del virus PVX. (Figura modificata da Komarova *et al.*, 2009).

RdRp: replicasi RNA-dipendente virale; **M1, M2, M3:** proteine del movimento; **CP:** proteina di rivestimento; **25K sgP, 12K sgP:** promotori subgenomici delle proteine del movimento; **CP sgP:** promotore subgenomico della CP

Una volta all'interno della cellula vegetale, le particelle virali si trasferiscono nelle cellule adiacenti utilizzando i plasmodesmi. In particolare, la proteina M1 e la CP formano un complesso con l'RNA virale, che interagisce con le proteine cellulari presenti nei plasmodesmi, portando all'espansione dei pori e quindi al passaggio del complesso nelle cellule adiacenti (Verchot-Lubicz, 2005; Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). Una volta raggiunte e infettate le cellule compagne del floema il virus può avere accesso ai tubi cribrosi (un meccanismo che coinvolge la proteina M3) trasferendo così l'infezione a livello sistemico (meristemi apicali e mesofilli più giovani) dove ha nuovamente inizio il movimento cellula-cellula. Per la diffusione sistemica del virus, oltre alle proteine virali gioca un ruolo di fondamentale importanza anche lo stato fisiologico dell'ospite ed in particolare della foglia infettata. Infatti per portare a termine con successo un'infezione di tipo sistemico, il virus sfrutta il flusso di soluti attraverso i vasi floematici, muovendosi dalle foglie adulte dei palchi più bassi (quelle che solitamente vengono utilizzate per l'infezione manuale), verso le giovani foglie dei palchi più alti ed i meristemi apicali; se uno dei due organi presenta delle anomalie fisiologiche, il passaggio può essere compromesso e, di conseguenza, non avrà luogo neppure l'infezione sistemica.

Il PVX è in grado d'infettare numerose specie delle famiglie delle *Amaranthaceae*, *Cruciferae* e *Solanaceae*. L'infezione provoca sintomi di diversa entità; generalmente si manifesta con la formazione di chiazze clorotiche e strutture a mosaico sulla superficie fogliare, a volte accompagnate da una riduzione della crescita della pianta. La regione del virus PVX coinvolta nella manifestazione dei sintomi è la regione C-terminale della RdRp

(Kagiwada *et al.*, 2005).

Nel contesto dell'impiego di questo virus in laboratorio, l'infezione primaria viene effettuata meccanicamente, mediante aggiunta di un tampone acquoso contenente il vettore virale ingegnerizzato, sulla superficie fogliare precedentemente cosparsa di una sostanza abrasiva. Molto spesso è possibile effettuare diversi passaggi di re-infezione utilizzando estratti provenienti da tessuti vegetali infettati (infezioni secondarie, terziarie e così via). Con l'estratto proveniente da una singola pianta è possibile infettare numerose piante.

Vettori derivanti dal PVX si sono dimostrati vantaggiosi per la rapida espressione del gene eterologo e l'ottenimento di buone rese di proteina ricombinante.

Il primi vettori basati sul PVX sono stati costruiti a partire dal cDNA dell'RNA di PVX e si basano sulla strategia della sostituzione della CP con il gene di interesse (Chapman *et al.*, 1992), o dell'inserzione genica (vettore pPVX201, descritto nel paragrafo 3.4.4, Baulcombe & Chapman, 1995). In quest'ultimo caso il gene di interesse si trova sotto il controllo del promotore subgenomico duplicato della CP e la sintesi dell'RNA virale è dipendente dal promotore 35 S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV).

La maggior parte dei vettori derivanti dal PVX attualmente utilizzati per la produzione di proteine di interesse si basano sul pPVX201 (Komarova *et al.*, 2010). Ad esempio, con questo vettore è stata prodotta la proteina del nucleocapside del virus dell'epatite B (Mechtcheriakova *et al.*, 2006), la proteina capsidica di rotavirus (O'Brien *et al.*, 2000), la proteina transmembranaria gp41 di HIV (Marusic *et al.*, 2001) e nel nostro laboratorio questo vettore è stato impiegato per esprimere diverse proteine, come anticorpi in formato scFv (Roggero *et al.*, 2001) e l'oncoproteina E7 del virus del papilloma umano HPV 16 (Franconi *et al.*, 2002, 2006).

Tuttavia, con questo tipo di vettore, si ha spesso instabilità del gene di interesse, dovuta alla possibilità di ricombinazione tra le due sequenze omologhe del promotore subgenomico della CP; inoltre l'instabilità dipende anche dalla lunghezza del gene esogeno (Avesani *et al.*, 2007).

Altre strategie attualmente impiegate per la produzione di proteine eterologhe mediante vettori derivati dal PVX includono la fusione del gene di interesse con il gene della CP (strategia usata soprattutto per il "display" di epitopi; Uhde *et al.*, 2005; Lico *et al.*, 2006) oppure l'uso di virus di seconda generazione mancanti della CP o delle proteine del movimento, che verranno descritti nel prossimo paragrafo.

1.1.2.2.3 Espressione mediata da vettori di “seconda generazione”

Lo sviluppo di processi industriali basati sull'espressione transiente in pianta richiede la capacità di infettare molte piante e quante più foglie/tessuti in ogni pianta. I vettori di prima generazione, grazie all'abilità di muoversi in via sistemica, generano una grande biomassa di materiale vegetale esprimente la proteina di interesse (**figura 11a**).

Tuttavia, come già accennato, questa tecnologia presenta delle limitazioni riguardo le dimensioni dell'insero (inserti di dimensioni maggiori di 1 kb non sono generalmente espressi); inoltre il virus non riesce ad infettare tutte le foglie della pianta (come quelle dei palchi inferiori) ed è generalmente instabile, quindi una parte dei tessuti infettati non esprimono la proteina di interesse. In aggiunta, spesso non si ottengono livelli di espressione elevati, in quanto la maggior parte delle risorse metaboliche della cellula viene indirizzata per sintetizzare la CP (Gleba *et al.*, 2007).

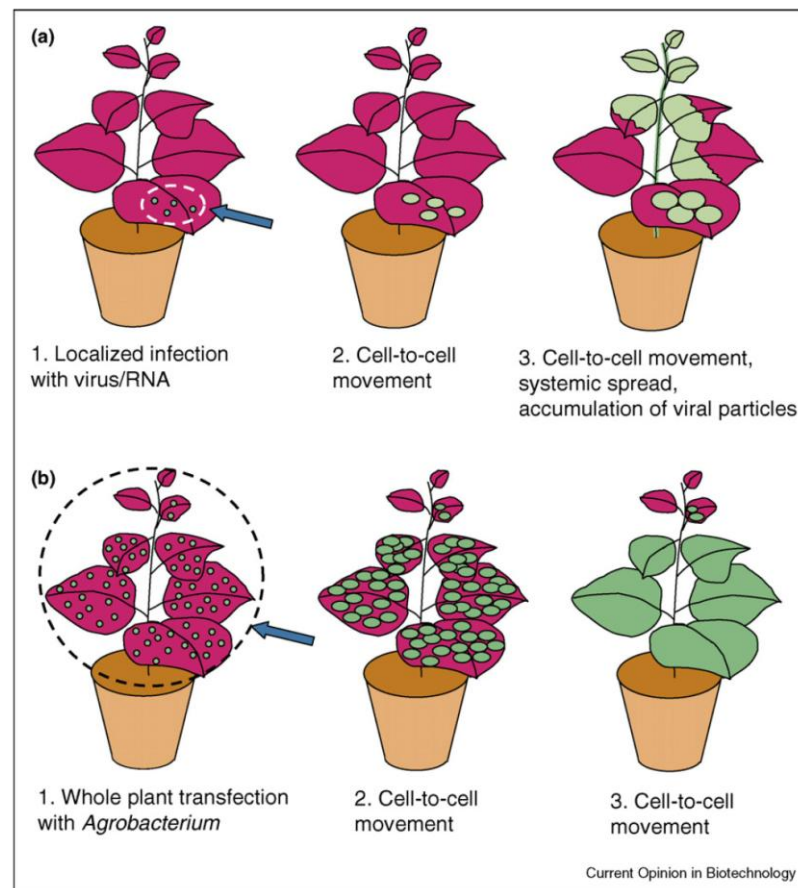


Figura 11. Infezione delle piante con vettori virali di prima (a) e seconda generazione (b). (Fonte: Gleba *et al.*, 2007)

Queste limitazioni hanno portato allo sviluppo di strategie più efficienti per l'espressione di proteine eterologhe in pianta, basate su un sistema integrato che include vettori virali in cui vengono mantenute solo le funzioni necessarie all'espressione della sequenza di

interesse, e componenti non virali che forniscono le funzioni eliminate dal vettore. Questi sistemi di espressione sono definiti vettori di “seconda generazione” (Gleba *et al.*, 2007). In pratica, la sequenza del virus vegetale privo generalmente della CP (definita replicone) viene clonata all’interno di un vettore binario (T-DNA) e l’infezione della pianta avviene mediante infiltrazione sotto vuoto con la coltura di *A. tumefaciens* ricombinante (**figura 11b**). Questa strategia può essere facilmente portata su scala industriale e combina i vantaggi di tre sistemi biologici: la velocità e i livelli di espressione tipici dei virus, l’efficienza di infezione di *A. tumefaciens* e le modificazioni post-traduzionali e i bassi costi offerti dalle piante (Gleba *et al.*, 2005; Komarova *et al.*, 2006).

Diverse varianti di vettori di seconda generazione sono stati ottenuti a partire principalmente dai virus TMV e PVX, anche eliminando i geni responsabili del movimento cellula-cellula oltre alla CP (Komarova *et al.*, 2006). La compagnia Icon Genetics ha sviluppato una tecnologia denominata “magniffection” basata su vettori virali “destrutturati” (composti da diversi vettori binari, ognuno recante una funzione virale) (Gleba *et al.*, 2007).

Mediante l’utilizzo di vettori virali di seconda generazione sono state espresse proteine biologicamente attive ad alti livelli, come ad esempio l’ormone della crescita umano con rese di 1 mg/g tessuto fresco (Gils *et al.*, 2005) e due antigeni di *Yersinia pestis* con rese di 2-3 mg/g tessuto fresco (Santi *et al.*, 2006). Anche nel nostro laboratorio, l’impiego di questa piattaforma di espressione ha permesso di esprimere la proteina E7 di HPV-16 fusa all’enzima lichenasi ingegnerizzato (LicKM) di *Clostridium thermocellum* con rese di 1 mg/g tessuto fresco (Massa *et al.*, 2007).

L’agroinfiltrazione delle foglie rappresenta solo un campo delle applicazioni di questa tecnologia. Infatti, anche le colture di radici aeree possono essere infiltrate con sospensioni di agrobatterio; in particolare sono state ottenute radici esprimenti molecole di interesse mediante infiltrazione con *A. tumefaciens* (Yang *et al.*, 2008) o *A. rhizogenes* (Skarjinskaia *et al.*, 2008) recanti vettori derivanti dal virus del mosaico del tabacco (TMV). Questa piattaforma di espressione, definita “clonal roots technology”, rappresenta una valida alternativa ai sistemi attuali per la produzione di molecole di interesse farmaceutico (Franconi *et al.*, 2010). Infatti, questo sistema è un sistema di espressione contenuto, facilmente adattabile su larga scala, e che porta generalmente a livelli di espressione maggiori rispetto a quelli ottenuti con l’agroinfiltrazione delle foglie (Komarova *et al.*, 2010). Nel nostro laboratorio la proteina di fusione E7-LicKM è stata prodotta con alte rese anche in questo sistema (Massa *et al.*, 2009).

1.1.3 OTTIMIZZAZIONE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLE PROTEINE ETEROLOGHE IN SISTEMI VEGETALI

Per lo sviluppo di una piattaforma basata sulla produzione in sistemi vegetali risulta necessario ottimizzare i livelli di espressione della proteina ricombinante in quanto spesso, con questi sistemi, le proteine sono prodotte a bassi livelli. E' ormai assodato che la quantità di proteina ricombinante dipende in primo luogo dalla stabilità intrinseca della stessa. Tuttavia, i livelli d'espressione possono essere influenzati da fattori come la specificità e l'attività del promotore impiegato, la stabilità dell'mRNA, l'efficienza di traduzione nonché dalla scelta della specie/tessuto vegetale ospite e del sistema scelto per l'espressione (Tiwari *et al.*, 2009).

L'uso di promotori forti costitutivi garantisce spesso un buon livello di espressione della proteina eterologa in tutti i tessuti della pianta. Molti antigeni e anticorpi sono stati espressi con alte rese mediante l'impiego del promotore 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV 35S), del promotore dell'ubiquitina di molte specie vegetali, e di promotori artificiali come il "superpromoter" che combina sequenze del promotore della octopina e della mannopina sintasi (Sharma & Sharma, 2009). In particolare, il promotore CaMV 35S è stato largamente impiegato per produrre antigeni vaccinali come la subunità B della tossina colerica (CTB), l'antigene di superficie dell'epatite B (HbsAg), la glicoproteina del virus della rabbia, la proteina S del SARS-CoV (Sharma & Sharma, 2009) e gli antigeni prodotti in forma transgenica nel nostro laboratorio.

Tuttavia, a volte la proteina eterologa può interferire con la crescita della pianta, per cui in questi casi il problema può essere risolto mediante l'uso di promotori inducibili o di promotori tessuto/organello-specifici, che permettono una compartimentalizzazione della proteina solo in determinati tessuti o organelli. Quest'ultima strategia può essere usata anche per molecole che non interferiscono con il ciclo vitale della pianta, ma semplicemente per incrementarne i livelli di espressione o per facilitarne la purificazione. Infatti ad esempio, impiegando il promotore arcelina di fagiolo De Jaeger e colleghi hanno ottenuto un livello di espressione di un anticorpo pari al 36% TSP (De Jaeger *et al.*, 2002) e la compagnia Ventria Bioscience (sito web 2) ha adottato la piattaforma tecnologica di espressione in semi di mais e riso impiegando promotori specifici di semi. Allo stesso modo, la Chlorogen Incorporation (compagnia fondata dal ricercatore Henry Daniell, University of Central Florida, USA) produce con alte rese diverse biomolecole nei cloroplasti di tabacco mediante l'uso di promotori plastidiali.

La compartimentalizzazione può anche essere ottenuta a livello post-traduzionale (o co-traduzionale nel caso di veicolo nel reticolo endoplasmatico, RE, o nella via secretoria),

mediante l'impiego di sequenze segnale che indirizzano la proteina eterologa in uno specifico organello o nei fluidi intercellulari. Ad esempio, presso i nostri laboratori è stata ottenuta la veicolazione di un frammento anticorpale ricombinante, diretto contro i tospovirus, nella via secretoria di piante di *N. benthamiana*, mediante fusione con il segnale di secrezione della proteina inibitrice della poligalatturonasi di *Phaseolus vulgaris* (PGIPss) (Franconi *et al.*, 1999). La stessa sequenza ha consentito d'incrementare di 5 volte i livelli d'espressione dell'oncoproteina E7 del virus del papilloma umano HPV 16 in piante di *N. benthamiana* (Franconi *et al.*, 2006). I livelli di espressione possono essere aumentati anche se la proteina è trattenuta nel lume del reticolo endoplasmatico (RE) aggiungendo il tetrapeptide H/KDEL alla sua estremità C-terminale (Twyman *et al.*, 2003). Il RE offre infatti un ambiente ossidante, abbondanza di “chaperones” e un numero ridotto di proteasi.

Una strategia molto attraente è la produzione della proteina di interesse nei corpi oleosi, organelli che originano dal RE ed hanno la funzione di stoccaggio degli oli nei semi. Questi organelli presentano nella loro membrana una proteina molto abbondante chiamata oleosina. La fusione della proteina eterologa con l'oleosina, permette di ottenere un prodotto a bassa densità che può essere facilmente purificato per flottazione (van Rooijen & Moloney, 1995). Inoltre, la proteina è esposta nel citosol ma è protetta dalla degradazione dall'oleosina (Sharma & Shrama, 2009). Questa piattaforma di produzione è attualmente utilizzata dalla compagnia SemBioSys Genetics Inc. (sito web 3).

E' interessante porre l'attenzione sul fatto che la produzione di proteine eterologhe nel cloroplasto può essere la conseguenza dell'espressione nel genoma plastidiale (mediante l'uso di promotori plastidiali) o dell'indirizzamento della proteina a livello post-traduzionale (mediante l'impiego di sequenze segnale per il cloroplasto) (Jarvis, 2008). Recentemente i plastoglobuli, compartimenti sub-plastidiali a bassa densità associati alle membrane tilacoidali simili ai corpi oleosi, sono stati impiegati per la produzione di molecole eterologhe (Vidi *et al.*, 2007).

Altri accorgimenti che permettono di incrementare le rese di proteina eterologa riguardano l'aumento di stabilità dell'mRNA e dell'efficienza di traduzione. In particolare, l'aggiunta di regioni non tradotte al 5' (“untranslated regions”, 5'UTR) e al 3' (3'UTR) del gene di interesse è importante per l'inizio e l'efficienza della traduzione e per la stabilità dell'mRNA grazie alla presenza della coda poliadenilata, rispettivamente (Sharma & Sharma, 2009; Wang *et al.*, 2009).

Anche l'uso di una sequenza genica adattata ai codoni più abbondanti della specie vegetale ospite (“codon usage”) permette in genere di ottenere un'efficienza traduzionale

maggiore. Infatti in ogni organismo, l'abbondanza di ciascun tRNA riflette l'abbondanza dei codoni usati, perciò un elevato numero di codoni rari nella sequenza codificante può portare alla deplezione dei tRNA corrispondenti, causando un forte rallentamento del processo di traduzione, soprattutto quando si esprimono proteine nel cloroplasto, dove i tRNA non sono abbondanti come nel citosol. Sebbene nelle piante superiori l'ottimizzazione dei codoni non sia di fondamentale importanza per l'espressione di proteine eterologhe, nel caso della microalga *C. reinhardtii* risulta necessaria. Infatti, questo organismo presenta un "codon usage" molto stringente, con una varietà di codoni inferiore alle piante superiori; di conseguenza le sequenze non adattate vengono generalmente espresse a livelli molto bassi o non sono addirittura espresse (Surzycki *et al.*, 2009).

In aggiunta all'ottimizzazione dei codoni, in alcuni casi l'inserzione di introni nella sequenza genica da esprimere può contribuire positivamente ai livelli di espressione genica sia nelle piante superiori (Fiume *et al.*, 2004) che nelle microalghe (Surzycki *et al.*, 2009).

Molteplici aspetti vanno inoltre tenuti in considerazione nella scelta delle specie vegetali ospiti o dei sistemi vegetali a contenimento precedentemente citati, per la produzione della proteina ricombinante di interesse (Karg & Kallio, 2009). Il sistema di espressione più appropriato deve essere scelto caso per caso: nell'ambito dell'espressione in piante intere, alcune piante ospiti possono accumulare naturalmente una maggior quantità di proteina di altre, oppure possono produrre il prodotto appropriato mentre altre falliscono in questo proposito.

N. tabacum è una specie dicotiledone che rappresenta un sistema di espressione ben conosciuto nell'ambito del "molecular farming" (Fischer *et al.*, 2004). Il principale vantaggio offerto da questa specie include l'esistenza di una tecnologia di trasferimento genico ben stabilita sia per la trasformazione transiente che per quella nucleare o del cloroplasto, alte rese di biomassa, abbondanza nella produzione di semi e la possibilità di realizzare ultrastrutture per il processamento su larga scala. Inoltre, non trattandosi di una specie destinata all'alimentazione dell'uomo o alla realizzazione di mangimi animali, il rischio che materiale vegetale proveniente da piante esprimenti proteine eterologhe possa contaminare la catena alimentare è pressoché inesistente. La composizione chimica della foglia è significativamente diversa fra le differenti varietà: molte di queste hanno un elevato contenuto in alcaloidi, ma varietà a basso contenuto di questi composti possono essere utilizzate per la produzione di proteine a valore farmaceutico. La foglia di questa specie, dato l'abbondante numero prodotto per pianta, rappresenta l'organo principale per

la raccolta delle proteine eterologhe espresse. Uno dei principali svantaggi nell'uso di varietà con foglie è la sintesi della proteina eterologa in ambiente acquoso e quindi instabile, che può determinare basse rese. Le foglie devono essere congelate o disidratate per poter essere trasportate o processate immediatamente dopo la raccolta per estrarre quantità utili di prodotto. Al contrario, l'accumulo della proteina ricombinante nei semi (si pensi alle varietà cerealicole riso, frumento e mais, alle leguminose) consente la conservazione a lungo termine del prodotto a temperatura ambiente. I semi sono infatti in grado di accumulare proteine per mezzo di compartimenti di accumulo specializzati (corpi proteici e vacuoli), che derivano dalle strutture della via di secrezione ed in cui le proteine sono protette dalla degradazione proteolitica (Boothe *et al.*, 2010). Dunque, le varietà da seme possono essere prodotte in grandi quantità, protette e trasportate anche a lunga distanza a temperatura ambiente consentendo un più ampio serbatoio per la produzione di vaccini. Come già accennato, le varietà cerealicole sono attualmente usate come piattaforma di produzione dalla impresa biotecnologica Ventry Bioscience (sito web 2). Altre specie impiegate per la produzione di molecole di interesse farmaceutico sono rappresentate da specie edibili come pomodoro, carota, patata, lattuga, mais e molte altre (Sharma & Sharma, 2009). Inoltre più recentemente proteine eterologhe vengono prodotte in piante che possono crescere in sistemi a maggiore contenimento come le piante acquatiche della famiglia delle *Lemnaceae*, riconosciute come GRAS, quindi anch'esse eventualmente edibili, ed il muschio *Physcomitrella patens*, in grado di crescere in tempi relativamente brevi in fermentatori simili a quelli impiegati per i batteri (Liénard & Nogué, 2009). Tuttavia, questi due sistemi sono completamente in mano alle compagnie Biolex Therapeutics Inc. (sito web 4) e Greenovation (sito web 5).

Come già accennato, altri validi sistemi vegetali per l'espressione di proteine eterologhe sono rappresentati dalle sospensioni cellulari, è più recentemente, dalle colture di radici aeree e dalle colture di microalghe.

Nell'ambito delle sospensioni cellulari, le maggior parte dei lavori riportano l'uso di linee cellulari derivanti dalla cultivar di tabacco "Bright Yellow" (linea cellulare BY-2) e da *N. tabacum* (linea cellulare NT-1), in quanto sono le più caratterizzate. Tuttavia, altre linee cellulari provenienti da riso, soia, pomodoro, alfalfa e carota, sono state esplorate per incrementare i livelli di espressione della proteina di interesse (Franconi *et al.*, 2010a).

Le colture di radici permettono di ottenere elevati quantitativi di biomassa nel giro di poche settimane, e sebbene rappresentino un campo relativamente nuovo per la produzione di biofarmaceutici, è uno dei più promettenti, in quanto i livelli di espressione che si ottengono sono generalmente molto elevati (Franconi *et al.*, 2010a). Nella maggior

parte dei lavori di “molecular farming” le colture di radici vengono generate a partire da piante di *N. tabacum*, ma nel caso dell’espressione dell’antigene di superficie del virus dell’epatite B (HbsAg), sono state usate anche radici provenienti da patata (Sunil Kumar *et al.*, 2006).

Infine, nell’ambito delle microalghe, solo l’alga verde dulciacquicola *C. reinhardtii* è ad oggi realmente impiegata per il “molecular farming”. Tuttavia, specie marine in grado di crescere in condizioni di alta salinità come *Dunaliella salina*, potrebbero essere presto impiegate per questi scopi (Barzegari *et al.*, 2009).

1.1.4 LA PRODUZIONE DI VACCINI IN SISTEMI VEGETALI

Durante il ventesimo secolo la vita media umana si allungata di circa 30 anni, soprattutto grazie ai benefici tratti dalle vaccinazioni. Tuttavia, negli ultimi anni, il numero di vaccini sviluppati è leggermente diminuito, probabilmente a causa delle stringenti regolamentazioni e del modesto guadagno ottenuto dalle imprese farmaceutiche su questa tipologia di farmaci.

Nonostante questo rallentamento, nuovi vaccini per l’uomo, prodotti con nuove tecnologie e definiti vaccini di seconda generazione, sono stati approvati e commercializzati e si attende una notevole crescita nell’ambito dei vaccini nei prossimi dieci anni (Ulmer *et al.*, 2006).

Prima di procedere alla descrizione dei vaccini prodotti in sistemi vegetali, è necessario introdurre il concetto generale di vaccino e delle risposte immunitarie generate, e descrivere le principali categorie vaccinali ad oggi disponibili

1.1.4.1 I vaccini: concetti introduttivi e tipologie vaccinali

Si definisce vaccino qualsiasi sostanza che, introdotta nell’organismo, è capace d’indurre in maniera specifica uno stato d’immunità attiva verso una data infezione. Quando si progetta un vaccino è necessario valutare il tipo di risposta immunitaria che si desidera ottenere. I vaccini possono essere utilizzati a scopo preventivo, preparando il sistema immunitario a contrastare la futura invasione da parte di un microrganismo patogeno, o terapeutico, inducendo una forte risposta difensiva nei confronti di processi infettivi già in atto. Diversa è nei due casi la branca dell’immunità che deve essere attivata. Finalità della vaccinoprofilassi è l’induzione di una risposta anticorpale neutralizzante; al contrario, un vaccino terapeutico stimola prevalentemente una risposta immunitaria cellulo-mediata (CM). Entrambi i meccanismi richiedono risposte dei linfociti T, ma proteggono il corpo secondo meccanismi differenti (**figura 12**). La risposta CM è richiesta per l’eliminazione

dei patogeni che replicano all'interno delle cellule, come ad esempio i virus. La risposta umorale è invece essenziale per l'eliminazione dei patogeni extracellulari.

Entrambe le vie prevedono la presentazione dell'antigene del patogeno da parte di cellule specializzate chiamate cellule presentanti l'antigene (APC), in particolare dalle cellule dendritiche (DC). Queste cellule processano l'antigene del patogeno e lo espongono sulla superficie cellulare con il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), chiamato HLA nell'uomo. In base al tipo di antigene e quindi al tipo di risposta che si deve ottenere, si ha il coinvolgimento del complesso MHC di classe I o II.

Nel caso della **risposta cellulo-mediata**, l'interazione tra il complesso antigene-MHC I e cellule T "helper" (Th) (chiamate anche cellule $CD4^+$ perchè esprimono alla loro superficie il recettore CD4), permette l'attivazione di queste ultime, che differenziano in cellule Th effettrici chiamate Th1. Queste cellule secernono quindi una varietà di proteine di segnalazione chiamate citochine, che attivano i macrofagi, responsabili della fagocitosi dei microrganismi patogeni, e i linfociti T citotossici, CTL (chiamati anche $CD8^+$). Questi ultimi uccidono le cellule infettate dal patogeno che espongono alla loro superficie epitopi riconosciuti dai CTL, mediante la secrezione di enzimi e sostanze tossiche. Terminata la distruzione cellulare, la cellula T si distacca ed inizia a cercare un nuovo bersaglio. Nel sito di infezione le cellule T "helper" ed i macrofagi secernono interleuchine che aiutano a regolare la risposta immunitaria (attragono i macrofagi e producono altri linfociti in grado di aiutarli).

Nella **risposta umorale o anticorpale**, l'interazione tra il complesso antigene-MHC II e cellule Th, porta al differenziamento di quest'ultime in cellule effettrici Th2. Le cellule Th2, secernono citochine in grado di stimolare i linfociti B; questi ultimi innescano un processo di amplificazione denominato selezione clonale: aumentano di grandezza e si dividono per mitosi, dando origine ad un clone di cellule identiche che producono anticorpi specifici per un determinato antigene. Non tutte le cellule B saranno impiegate nella secrezione istantanea di anticorpi, ma solo le plasmacellule; altre si differenzieranno in cellule B della memoria che continueranno a produrre piccole quantità di anticorpo anche dopo aver superato l'infezione. Gli anticorpi vengono liberati nel circolo generale e nelle secrezioni mucose; essi neutralizzano ed eliminano i microbi e le tossine microbiche presenti nel sangue e nel lume degli apparati quali il tubo gastro-enterico e l'albero respiratorio, impedendo loro di penetrare nell'organismo e di colonizzare le cellule. L'attacco dell'anticorpo inattiva i patogeni, bloccando la loro capacità di legarsi ai recettori della cellula ospite. L'attacco dell'anticorpo marca anche i patogeni per la distruzione, rendendoli visibili alle cellule fagocitiche.

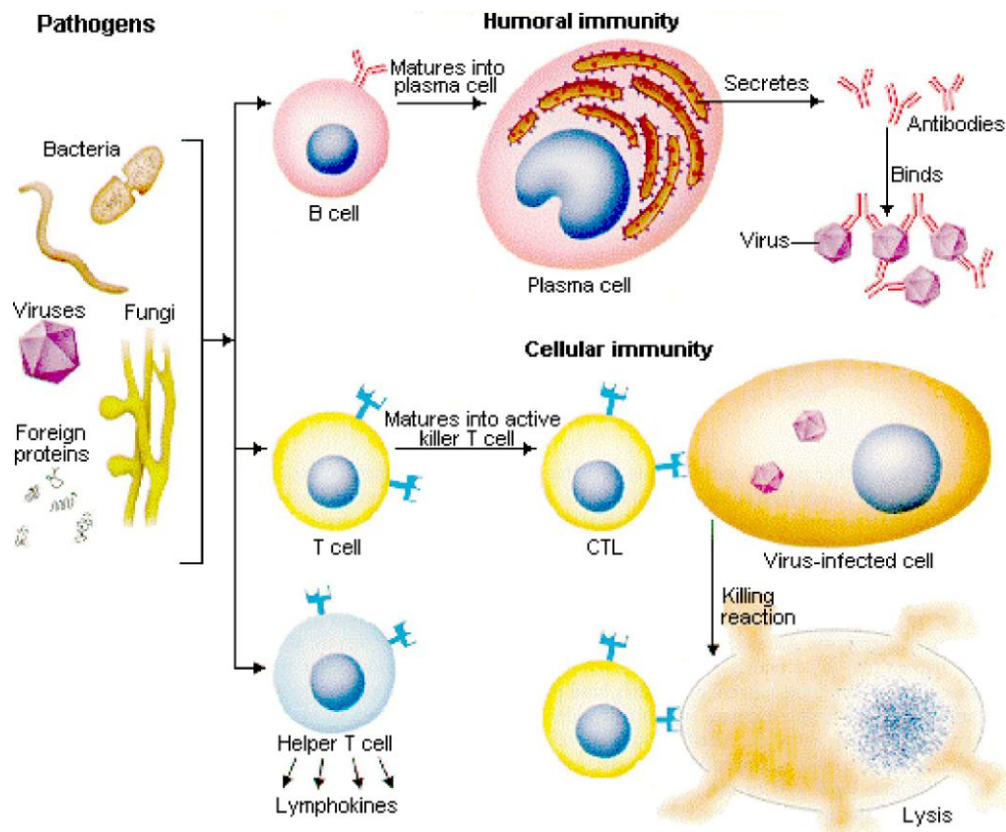


Figura 12: Risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata.

Le principali categorie vaccinali ad oggi disponibili possono essere sostanzialmente classificate in vaccini di prima generazione, costituiti da vaccini vivi attenuati o inattivati, e vaccini di seconda generazione, come i vaccini a subunità (peptidici/proteici o a DNA). I vaccini di prima generazione sono in genere molto efficaci nell'induzione dell'immunità protettiva, tuttavia generalmente non sono in grado di stimolare risposte cellulo-mediate; inoltre, alcuni patogeni sono difficili o a volte impossibili da crescere in coltura e alcuni vaccini tradizionali (ad esempio il vaccino per la pertosse) contengono componenti tossiche che causano effetti indesiderati. I vaccini di seconda generazione sono invece più sicuri e permettono di stimolare entrambe le branche dell'immunità, tuttavia sono generalmente poco immunogenici e quindi devono essere associati all'impiego di adiuvanti appropriati o altre strategie descritte più avanti.

I **vaccini vivi attenuati** utilizzano un ceppo mutante del patogeno attenuato, ossia privo della capacità di indurre la malattia. È necessario quindi intervenire con delle mutazioni geniche per rimuovere la patogenicità del virus o del batterio in questione, senza però portare a perdita di immunogenicità. Questo implica una conoscenza completa della struttura del virus e del genoma batterico. Ne sono esempi il vaccino contro il vaiolo, il vaccino orale contro la poliomelite ed il BCG (ceppo attenuato di *Mycobacterium bovis*,

usato per proteggere dalla tubercolosi). La protezione più efficace è raggiunta utilizzando un virus o un batterio capace di andare incontro ad un limitato grado di replicazione, prima di essere eliminato dalle difese dell'ospite. Tuttavia, se il ceppo viene eccessivamente attenuato, l'organismo lo eliminerà prima che esso abbia la possibilità di generare una risposta immunitaria completa.

I **vaccini inattivati** sono costituiti dal patogeno completamente inattivato o ucciso (ad esempio tramite il calore). Un esempio è costituito dai comuni vaccini dell'influenza o dal vaccino per la poliomelite di Salk. I vaccini prodotti in questo modo hanno alla base patogeni immunogenici ma incapaci di indurre la malattia. Una delle limitazioni dei vaccini inattivati (quindi non replicanti) è dovuta al fatto che l'effetto protettivo dell'immunizzazione iniziale può essere relativamente scarso e di breve durata. Sono per questo richiesti diversi richiami.

I **vaccini a subunità** sono costituiti da uno o più componenti del patogeno in grado di stimolare risposte immunitarie, escludendo le funzioni infettive, per cui risultano più sicuri dei vaccini basati sul patogeno intero.

Vaccini a subunità peptidici/proteici: Le subunità sono costituite da proteine o singoli peptidi immunogenici e possono essere ottenute mediante separazione e purificazione delle stesse dal microrganismo, oppure essere sintetiche o ricombinanti. L'antigene vaccinale viene scelto in base alla risposta immunitaria che si desidera ottenere. Per una risposta umorale protettiva sono generalmente scelte proteine o peptidi del capsido di un virus oppure glicoproteine virali di superficie o ancora, lipopolisaccaridi della parete di un batterio. Un'alternativa è l'impiego di tossine (come ad esempio la tossina termolabile LT di *E. coli* contenuta nei vaccini contro le enterotossicosi), prodotte da alcuni microrganismi batterici. Nel caso in cui si desideri ottenere una risposta cellulo-mediata, verranno invece scelti antigeni del patogeno che vengono espressi soltanto all'interno della cellula infettata.

Il problema maggiore di questa tipologia vaccinale risiede nel fatto che le subunità proteiche o peptidiche, prese singolarmente ed inoculate nell'organismo, suscitano una risposta immunitaria spesso incompleta o di breve durata e necessitano quindi di sistemi in grado di potenziarne l'immunogenicità. Uno di questi è rappresentato dall'uso di sostanze adiuvanti. L'azione degli adiuvanti è essenzialmente quella di garantire un graduale rilascio dell'antigene co-somministrato, e di provocare un'irritazione nel punto di inoculo richiamando cellule immunocompetenti e stimolando la fagocitosi dell'antigene. La risposta immunitaria che si induce risulta quindi più potente e più duratura nei confronti dell'antigene, del quale possono essere conseguentemente

impiegate quantità più ridotte. Esistono adiuvanti in grado di stimolare risposte di tipo Th1 o Th2, e quindi la scelta dell'adiuvante deve riflettere il tipo di risposta che si desidera ottenere. Gli adiuvanti sono una famiglia eterogenea di composti, sia in termini di struttura chimica, sia in termini di meccanismo d'azione (Singh, 2007). Gli unici adiuvanti approvati dalla FDA americana per uso clinico sono rappresentati dai sali d'alluminio e dallo squalene (emulsione oleosa); in altri paesi, compresa l'Unione Europea, sono stati invece commercializzati altri tipi di adiuvanti. Il principale meccanismo d'azione dei sali d'alluminio consiste nella formazione di siti di deposito nel luogo d'iniezione, con lento e prolungato rilascio dell'antigene. I sali d'alluminio sono anche in grado d'indurre una locale reazione infiammatoria, seguita dal rilascio di citochine e quindi, dal richiamo di cellule immuno-competenti. Su quest'ultimo meccanismo d'azione si basa anche l'efficacia degli adiuvanti costituiti da frammenti batterici, quali il lipide A e i suoi derivati. Le emulsioni oleose devono, invece, la loro efficacia, oltre che alla formazione di depositi locali d'antigene, anche ad una diretta azione immunostimolante. Altri adiuvanti sono costituiti da saponine, da complessi immunostimolatori e da liposomi, capaci d'indurre un incremento della concentrazione antigenica a livello dei macrofagi. I liposomi, ad esempio, mimano la struttura di una membrana cellulare, captano l'antigene ed una volta inoculati possono trasportarlo direttamente agli organi immuno-competenti dove sarà fagocitato e processato. La maggior parte della ricerca è stata rivolta in passato ad adiuvanti capaci di stimolare la risposta umorale. Con l'evolversi del concetto della vaccinazione terapeutica c'è molto interesse nella ricerca di nuovi adiuvanti capaci di stimolare la risposta immunitaria cellulo-mediata (Schijns & O'Hargan, 2006). Nuovi adiuvanti efficaci o nuove strategie di presentazione dell'antigene e di somministrazione sono discussi più avanti.

Vaccini composti da subunità ricombinanti sono attualmente impiegati per la prevenzione di varie patologie, quali per esempio la polmonite da pneumococco, l'epatite B, diverse classi di vaccini anti-influenzali e i vaccini contro i papilloma virus umani descritti nel paragrafo 1.3.7.1.

Vaccini a DNA: la preparazione di un vaccino genetico o a DNA comporta l'isolamento dall'agente patogeno di uno o più geni di interesse, che vengono successivamente clonati in plasmidi sotto il controllo di un promotore attivo nelle cellule dell'organismo da vaccinare. Il plasmide può essere veicolato in sospensione acquosa, liposomi, microparticelle d'oro e somministrato principalmente per via intramuscolare, mediante iniezione, o intradermica, mediante la tecnica della "pistola genica" ("gene gun"). Uno dei

maggiori vantaggi che questa tipologia di vaccino offre è la possibilità di ottenere una risposta cellulo-mediata nei confronti dei microbi intracellulari. Infatti, gli antigeni microbici somministrati per via generale od orale, sono in realtà antigeni extracellulari, capaci d'indurre prevalentemente una risposta anticorpale. Per evocare risposte mediate da linfociti T, può essere necessario far penetrare l'antigene all'interno di una cellula, e la cellula ideale in tal senso è rappresentata dalla APC. La tecnica del "gene gun" è molto vantaggiosa in quanto consente di trasfettare direttamente numerose cellule epidermiche del Langherans, le quali agiscono da APC.

Apparentemente il vaccino a DNA si presenta sicuro, in quanto sono completamente assenti gli agenti infettanti, vivi o inattivati che siano. Tuttavia, essendo privi di componenti batteriche infettive e quindi potenzialmente immunogeniche, necessita anch'esso della combinazione con adiuvanti. I sali colloidali dell'alluminio, tipicamente impiegati nei vaccini convenzionali, si sono dimostrati capaci di migliorare l'efficacia anche di quelli genetici (Stevenson *et al.*, 2004). Inoltre, nei vaccini genetici il potenziamento della risposta immunitaria è spesso garantito dall'inserzione all'interno del vettore plasmidico di particolari sequenze di derivazione batterica: le sequenze CpG. Si tratta di sequenze palindromiche, ipometilate, necessarie ad attivare una risposta immunitaria antigene-indipendente. Infatti, la conseguenza dell'interazione dei motivi CpG con il "Toll like receptor 9" (TLR9), localizzato sulla superficie delle cellule dendritiche plasmocitoidi, è la sovrapproduzione di citochine, come le interleuchine (IL) 6 e 12, il fattore di necrosi tumorale α , l'interferone (IFN) α , l'interferone γ e una polarizzazione della risposta cellulo-mediata in senso Th1 (Klinman *et al.*, 2004, Tudor *et al.*, 2005). Inoltre, è dimostrata una diretta stimolazione dei linfociti B, con conseguente produzione anticorpale (Krieg *et al.*, 1995). Sono già state condotte molte sperimentazioni cliniche sui vaccini a DNA contro malattie infettive come HIV-1, Ebola virus, malaria o per generare una protezione immunitaria contro i tumori.

1.1.4.2 Vaccini a subunità prodotti in sistemi vegetali

Lo sviluppo dei vaccini futuri è soprattutto orientato all'ottenimento di nuove formulazioni più efficaci e sull'abbattimento dei costi, in modo da rendere questi prodotti medici più accessibili per i Paesi in via di sviluppo, dove sono maggiormente necessari. Le piante e gli altri sistemi vegetali descritti finora, rappresentano una piattaforma sicura ed efficace per questi scopi. Tra gli innumerevoli vantaggi presentati da questi sistemi, vi è la possibilità di produrre vaccini indipendenti dalla "catena del freddo", oggi necessaria per la conservazione e distribuzione del vaccino. Infatti, alcuni compartimenti od organi

di stoccaggio, come ad esempio i semi, garantiscono la stabilità della proteina antigenica a temperatura ambiente, e negli altri casi il materiale vegetale può essere conservato a temperatura ambiente in seguito a liofilizzazione. Inoltre, la produzione dell'antigene vaccinale in specie edibili offre la possibilità di somministrare oralmente il vaccino, un vantaggio soprattutto nei Paesi in via di sviluppo, in quanto non richiede personale qualificato. Questa modalità di somministrazione potrebbe consentire, a differenza della vaccinazione intravenosa, la stimolazione dell'immunità mucosale (Mowat, 2005; Strugnell & Wijburg, 2010). Oltre alla capacità di generare le classiche risposte immunitarie associate alla somministrazione di vaccini (Ogra *et al.*, 2001), questo tipo di immunità è caratterizzata dalla produzione di immunoglobuline A secretorie (S-IgA) e dal trasporto di queste, attraverso l'epitelio, sulla superficie mucosale anche di distretti mucosali distanti. Ciò offre il vantaggio di potere indurre un'immunità protettiva in distretti mucosali dove è difficile stimolare una risposta locale o dove è difficile praticare una vaccinazione diretta contro patogeni specifici di quel sito. Le S-IgA attuano quindi una prima linea di difesa contro l'infezione da patogeni come virus e batteri che penetrano nell'organismo attraverso le superfici mucosali (Iwasaki A & Kelsall, 2001). Il maggior problema della somministrazione orale di un antigene è che il tratto gastrointestinale è un ambiente che degrada le proteine. Alcuni studi hanno però dimostrato che le cellule vegetali, grazie alla presenza della parete cellulare, sembrano fornire protezione all'antigene dalla degradazione che avviene nello stomaco, permettendo a quest'ultimo di giungere ai complessi immuno-competenti presenti a livello dell'intestino tenue (Walmsley & Arntzen, 2000; Daniell, 2001). A causa della difficoltà di ottenere dosi uniformi e stabili con un contenuto di antigene ben definito nei tessuti vegetali, una prospettiva più realistica della somministrazione orale dei vaccini vegetali, potrebbe prevedere l'uso di materiale parzialmente processato.

Una seconda problematica inerente l'uso di vaccini edibili riguarda la possibilità di indurre tolleranza con la somministrazione orale dell'antigene. Questo problema è tuttavia superato quando il livello di espressione e quindi il contenuto di antigene nelle dosi è elevato o quando si adottano strategie immunostimolanti.

Qualunque sia la modalità di somministrazione, il potenziamento delle risposte immunitarie associate ai vaccini a subunità è principalmente ottenuto mediante l'impiego di adiuvanti efficaci o mediante le strategie descritte di seguito. Frequentemente, quando espresse nelle cellule, le proteine capsidiche virali o le glicoproteine dell'involucro pericapsidico, mostrano la capacità di auto-assemblare in capsidi vuoti o involucri pericapsidici formando particelle virali simili a virioni (VLP). Queste VLP sono immunogeni in grado di generare

risposte anticorpali importanti, ed alcune preparazioni hanno mostrato di indurre anche buone risposte cellulo-mediate (Roy *et al.*, 2009). Attualmente sono presenti in commercio vaccini basati su VLP contro il virus dell'epatite B (HBV) e i papilloma virus umani (HPV) prodotti in lievito (Engerix-B, GlaxoSmithKline, Recombivax HB e Gardasil, Merck) e in cellule di insetto (Cervarix, GlaxoSmithKline). Le piante rappresentano un buon sistema per produrre VLP derivate da virus animali, e VLP immunogeniche dei virus commerciali appena descritti, HBV (Kapusta *et al.*, 1999) e HPV (Fernandez-San Millan *et al.*, 2008) sono già state ottenute in sistemi vegetali. In aggiunta, sono state prodotte in pianta VLP del virus Norwalk (NV) (Tacket *et al.* 2000; Santi *et al.*, 2008) e del virus dell'influenza (D'Aoust *et al.*, 2008) ottenendo risposte immunitarie potenziate.

Un'altra strategia efficace per la stimolazione delle risposte immunitarie è rappresentata dalla presentazione di antigeni sia come epitopi integrati in capsidi di virus vegetali, sia come proteine coniugate covalentemente a proteine capsidiche virali.

Sono stati impiegati diversi virus vegetali per questi scopi, come il virus del mosaico del tabacco (TMV), il virus del mosaico alfalfa, il virus del mosaico del fagiolo (CPMV), il virus che infetta il pomodoro (TBSV) e il virus X della patata (PVX) (Paul & Ma, 2010). Nel nostro laboratorio è stato dimostrato che la fusione della CP del PVX con l'oncoproteina E7 di HPV-16, quando fornita nell'ambito di una vaccinazione genetica, determina un significativo incremento della risposta immune antigene-specifica (Massa *et al.*, 2008).

Le formulazioni vaccinali basate sui virus vegetali ricombinanti sembrano molto promettenti anche nell'ottica della somministrazione orale. Infatti queste formulazioni proteggono l'antigene dalla degradazione che avviene nell'ambiente gastrointestinale (Nuzzaci *et al.*, 2010). In aggiunta, l'interazione di alcuni virus vegetali con i componenti del sistema immunitario può contribuire al successo di queste formulazioni vaccinali. Capsidi virali vuoti del virus CPMV prodotti in pianta hanno mostrato di interagire con le APC, incluse quelle presenti nelle placche di Peyer, tessuti organizzati presenti nel tratto intestinale (Saunders *et al.*, 2009). Questo principio può essere esteso ad altri marcatori di superficie cellulari e recettori presenti sulle cellule APC, in modo da indurre l'"uptake" e la presentazione dell'antigene da parte di queste cellule. E' stata riportata la produzione in pianta di molecole chimeriche costituite dall'antigene di interesse e da un anticorpo "self"-specifico, denominate immunocomplessi ricombinanti (Chargelegue *et al.*, 2005). Queste molecole hanno come bersaglio i recettori che riconoscono una regione dell'anticorpo (quella costante, Fc) espressa nella maggior parte delle APC, e mimano il legame e l'opsonizzazione dell'antigene da parte di un anticorpo, promuovendo una

risposta immunitaria verso l'antigene. In questo ambito, è stato dimostrato che un immunocomplesso ricombinante diretto contro il frammento C della tossina tetanica (TetC) induce una forte risposta immunitaria protettiva in topi, quando somministrato in via sistemica senza adiuvanti (Chargelegue *et al.*, 2005).

Oltre a quanto descritto finora, strategie efficaci sono rappresentate dalla somministrazione del vaccino secondo il regime “prime-boost” eterologo, in cui la somministrazione del vaccino vegetale viene accoppiata con altre tipologie vaccinali (Paul & Ma, 2010).

Determinanti antigenici di differenti patogeni umani sono stati espressi in sistemi vegetali, sia mediante trasformazione stabile, che transiente, da soli, fusi a “carrier” o come componenti di strutture più complesse. Circa la trasformazione stabile, si riportano numerosi lavori riguardanti l'espressione delle tossine CTB e LTB e dell'HBsAg in citoplasma e/o compartimento plastidiale di numerose specie vegetali come tabacco, patata, pomodoro, riso e mais, in colture di radici aeree e in sospensioni cellulari (per le referenze vedi le review Tiwari *et al.*, 2009; Sharma & Sharma, 2009; Franconi *et al.*, 2010). In aggiunta, un numero elevato di antigeni come ad esempio la proteina capsidica del virus Norwalk (NVCP), diverse proteine capsidiche di rotavirus, un antigene del virus della rabbia, antigeni del virus della malattia di Newcastle, antigeni dei patogeni batterici dell'antrace e del tetano e antigeni del “foot and mouth disease virus” (FMDV), sono stati espressi in diverse specie vegetali (Tiwari *et al.*, 2009; Sharma & Sharma, 2009). Nonostante *C. reinhardtii* sia impiegata per il “molecular farming” da pochi anni, diversi antigeni vaccinali sono stati già prodotti mediante trasformazione del cloroplasto, soprattutto per lo sviluppo di vaccini e adiuvanti per l'acquacoltura, ma anche antigeni di patogeni umani come la proteina VP1 del FMDV e un antigene di *Staphylococcus aureus* fuso alla CTB (per le referenze vedi Franconi *et al.*, 2010).

Diversi antigeni vaccinali sono stati prodotti in pianta anche mediante espressione transiente (già citati nell'ambito della descrizione dei sistemi di espressione) e almeno due esempi sono in “trial clinico” (descritti più avanti).

La maggior parte degli antigeni citati prodotti in sistemi vegetali sono stati impiegati per immunizzare animali modello per via orale o parenterale, ottenendo in alcuni casi risposte immunitarie elevate (Sharma & Sharma, 2009).

Ad oggi sono stati pubblicati i dati di almeno 11 “trial” clinici riguardanti l'immunizzazione con vaccini derivati da pianta. La prima sperimentazione clinica di fase I risale al 1997 (Tacket *et al.*, 1998). Questa si basava sull'espressione in patata transgenica della LTB di *E. coli*. E' stata riscontrata la presenza di anticorpi specifici nel siero e nelle mucose in dieci degli undici individui trattati per via orale con un opportuno dosaggio di patata. Risultati

simili sono stati ottenuti in seguito con tale antigene prodotto in semi parzialmente processati di mais transgenico (Tacket, 2005).

Patate transgeniche sono state impiegate anche per la produzione della proteina capsidica del Norwalk virus (NVCP) e sperimentate in fase clinica I (Tacket *et al.*, 2000). Nel 25-50% dei casi le proteine virali si assemblavano in VLP. Tutti i volontari hanno mostrato la produzione di IgA specifiche anti-NVCP mentre soltanto il 35% di essi hanno mostrato un aumento dei livelli di IgG. Ciò è dovuto al fatto che non tutte le proteine capsidiche entravano a far parte delle VLP, e le proteine libere risultano probabilmente meno stabili nel tratto gastro-intestinale e dunque meno immunogeniche. Sebbene le risposte anticorpali generate da questo vaccino non siano state potenti come nel caso della LTB, tale studio ha dimostrato comunque come un antigene prodotto in pianta, non in grado di replicarsi e diverso dalla tossina enterotossica LTB o dalla tossina colerica (note come potenti immunogeni orali), sia in grado di stimolare risposte immuni dopo somministrazione orale.

Sono stati riportati i risultati di due studi clinici condotti con l' HBsAg espresso in patata transgenica e in lattuga. Il gruppo di Koprowski ha riportato che la somministrazione orale di HBsAg prodotta in lattuga stimolava la produzione di IgG anti-HBsAg in pazienti umani (Kapusta *et al.*, 1999). In successivi studi clinici condotti al Roswell Park Cancer Institute, pazienti precedentemente vaccinati mediante iniezione di HBsAg prodotta in lievito, hanno mostrato un innalzamento dei titoli anticorpali in seguito a somministrazione orale di patata transgenica esprimente HBsAg (Thanavala *et al.*, 2005). Attualmente, questo vaccino si trova in fase clinica II (Tiwari *et al.*, 2009).

Un antigene del virus della rabbia prodotto in spinaci mediante l'uso di vettori virali è stato saggiato in fase clinica I. Peptidi antigenici della glicoproteina e della nucleoproteina del virus della rabbia fusi alla CP del virus del mosaico di alfa alfa (AIMV) espressi in spinaci sono stati somministrati a due gruppi di volontari (Yusibov *et al.*, 2002). Un gruppo consisteva di individui che erano stati precedentemente vaccinati con il vaccino anti-rabbia commerciale; il secondo gruppo consisteva invece di individui non vaccinati in precedenza (naïve). 3 dei 5 soggetti del primo gruppo e tutti e 9 i volontari naïve rimanenti, hanno sviluppato risposte anticorpali significative contro gli epitopi virali. A 7 giorni dall'ultima somministrazione orale di vaccino vegetale, i 9 soggetti inizialmente naïve sono stati vaccinati con la formulazione convenzionale del vaccino anti-rabbia, e tre di essi hanno prodotto anticorpi neutralizzanti. Questi dati dimostrano come il vaccino anti-rabbia (come anche il vaccino contro l'epatite B descritto precedentemente) di origine vegetale somministrato oralmente possa rappresentare un vaccino "di rinforzo" per quello convenzionale. Molto recentemente è entrato in fase clinica I un vaccino contro

il virus pandemico dell'influenza H5N1, basato sulla produzione di VLP in *N. benthamiana* mediante l'uso del sistema di espressione transiente basato su un vettore virale di seconda generazione derivante dal virus del mosaico del fagiolo (CPMV) (D'Aoust *et al.*, 2010). La compagnia Medicago che lo ha sviluppato ha dichiarato di essere in grado di produrre antigeni vaccinali nel giro di un mese dall'identificazione di nuovi virus pandemici (Karg & Kallio, 2009). Questi dati mostrano come i sistemi transienti siano realmente importanti per la produzione di questa classe di molecole.

Inoltre, i sistemi di espressione transiente si sono mostrati efficaci anche nel caso di formulazioni vaccinali paziente-specifiche, per le quali, non essendoci una richiesta massiva di antigene (ma solo la quantità per la vaccinazione di un paziente), la tecnologia dell'espressione transiente risulta altamente adeguata. Questo è il caso dell'approccio vaccinale, completamente differente rispetto a quelli descritti finora, riportato per la prima volta da McCormick e colleghi (McCormick *et al.*, 1999). Anticorpi a formato scFv generati dagli anticorpi di superficie delle cellule B di linfoma non-Hodgkin, sono stati prodotti in tabacco, purificati e iniettati in topi. Gli animali così immunizzati hanno sviluppato anticorpi anti-idiotipo, che mostravano protezione quando sfidati con le specifiche cellule B tumorali. Nel 2002 la Ditta Large Scale Biology Corporation aveva completato con successo la fase I di sperimentazione clinica; tuttavia nel 2006 questa compagnia ha dichiarato bancarotta. Nel 2008 la compagnia tedesca Bayer (che nel 2006 ha acquistato la Icon Genetics, titolare della tecnologia "magniffection") ha aperto un impianto pilota per la produzione di farmaceutici in pianta mediante quella tecnologia di espressione transiente. Con questa tecnologia sono stati riformulati i vaccini paziente-specifici contro il linfoma non-Hodgkin e sono stati nuovamente sperimentati in fase clinica I (McCormick *et al.*, 2008). La fase I è stata superata con successo, e il 69% dei pazienti ha sviluppato un'adeguata risposta immunitaria.

1.1.4.3 Le piante come biofabbrica e sorgente di molecole immunostimolanti

Negli ultimi anni, diversi adiuvanti già sviluppati in altri sistemi sono stati prodotti in pianta (Paul & Ma, 2010). Essi includono l'extradominio A della fibronectina (EDA), espresso in cloroplasto (Farran *et al.*, 2010), l'IL-12 di pollo espressa in tabacco (Medrano *et al.*, 2010) e le subunità B delle tossine di alcuni batteri patogeni (CTB e LTB). Queste ultime sono già state prodotte in diverse piante come patata, (Tacket *et al.*, 1998) mais (Chikwamba *et al.*, 2002), e riso (Yuki *et al.*, 2009) per uso vaccinale e più recentemente sono state investigate come adiuvanti mucosali, sia nel senso classico, cioè somministrate insieme all'antigene vaccinale, sia come proteine di fusione con l'antigene

di interesse. La CTB è stata usata con successo per incrementare l'immunogenicità di diversi vaccini orali prodotti in pianta e saggiati in modelli animali (Nochi *et al.*, 2007; Matoba *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 2009). La LTB prodotta in pianta ha mostrato proprietà adiuvanti promettenti quando somministrata per via intranasale in topi (Millar *et al.*, 2001). Tuttavia, nell'uomo la somministrazione intranasale di LTB è associata ad effetti collaterali come la paralisi facciale (Mutsch *et al.*, 2004) e sebbene le CTB e LTB siano entrambi forti adiuvanti di una risposta mucosale umorale, le preparazioni che le includono sono spesso associate ad una tolleranza sistemica (Sun *et al.*, 2010).

Oltre all'uso delle piante come bioreattori per la produzione eterologa di molecole a funzione immuno-stimolante, le piante stesse sono investigate come sorgente di molecole adiuvanti. Un esempio classico, come già accennato all'inizio di questa tesi, è rappresentato dai polisaccaridi di pianta. Essi infatti sono spesso dei potenti adiuvanti e tra questi, il fruttano inulina, è il più studiato tanto che su di esso si basano gli adiuvanti della famiglia ADVAX (Granell *et al.*, 2010). Un altro esempio di adiuvanti di origine vegetale è rappresentato dalle lectine, una classe di proteine presenti in molte specie vegetali. L'interesse delle lectine nello sviluppo dei vaccini deriva dalla loro capacità di legare i carboidrati presenti sulla superficie delle cellule, in particolare le cellule M presenti nelle placche di Peyer. Questa proprietà ha portato a postulare che alcune lectine di pianta possono essere usate per la presentazione di antigeni alle cellule immunocompetenti. Alcune tipologie di lectine studiate per questi scopi sono la concavalina A presente nei semi di una specie di fagiolo, la fitoemagglutina di *Phaseolus vulgaris*, la lectina di soia (*Glycine max*) e la subunità B della ricina di *Ricinus communis* (Granell *et al.*, 2010).

Uno studio investigativo del possibile impiego delle lectine vegetali come adiuvanti mucosali è stato condotto da Lavelle e colleghi (Lavelle *et al.*, 2001). Sebbene tutte le molecole analizzate abbiano mostrato proprietà antigeniche, solo alcune di esse hanno mostrato di funzionare da adiuvanti in grado di aumentare la risposta immunitaria contro l'antigene di controllo usato nella formulazione vaccinale. In altri studi, la subunità B di ricina (ricina B) è stata utilizzata come "carrier" per la presentazione di antigeni al sistema immunitario mucosale. La ricina B fusa all'antigene modello "green fluorescent protein" (GFP) è stata prodotta in piante di tabacco e in colture di radici aeree. In seguito a somministrazione intranasale in modello murino della proteina di fusione purificata, si è osservato un incremento delle IgG sieriche contro l'antigene (Medina-Bolivar *et al.*, 2003). Inoltre l'estremità N-terminale della ricina B fusa ad un peptide della proteina non strutturale NSP490 del simian rotavirus, prodotta in *E. coli*, ha mostrato l'induzione di una forte risposta cellulo-mediata (Choi *et al.*, 2006a). La stessa proteina di fusione è stata

inoltre prodotta in patata (Choi *et al.*, 2006b).

Un'altra classe di molecole indagate per le proprietà adiuvanti è rappresentata dalle saponine, metaboliti secondari riscontrati in diverse specie vegetali che mostrano differenti attività biologiche (antimicrobiche, citotossiche e antitumorali). Alcune saponine hanno mostrato di attivare il sistema immunitario dei mammiferi, perciò sono state considerate come potenziali adiuvanti da usare in formulazioni vaccinali (Granell *et al.*, 2010). Una di esse, denominata QuilA, estratta dalla corteccia dell'albero *Quillaja saponaria*, è stata già utilizzata in diverse formulazioni vaccinali sperimentali non derivate da pianta, mostrando di essere efficace (Granell *et al.*, 2010). Nel nostro laboratorio questo adiuvante è stato impiegato in formulazioni vaccinali derivate da pianta (Franconi *et al.*, 2002, 2006; Massa *et al.*, 2007) ed è il suo uso è stato proposto anche come adiuvante mucosale per la somministrazione orale di vaccini vegetali (Kirk *et al.*, 2004). Sebbene nell'uomo risulta essere altamente tossica e instabile (Waite *et al.*, 2001), questa saponina potrebbe essere usata per vaccini veterinari. Il QuilA è anche un componente fondamentale nella formulazione di complessi immunostimolatori (ISCOM), che vengono impiegati per la somministrazione di vaccini e costituiti dall'antigene di interesse e da molecole di colesterolo, fosfolipidi e saponine (Sun *et al.*, 2009a). Il relativo successo del QuilA ha aperto un grosso campo di ricerca nell'ambito delle saponine, in modo da individuare tipologie meno tossiche per l'uomo (Sun *et al.*, 2009b). In aggiunta, i chaperoni molecolari "heat shock proteins" (HSP) si sono rivelati capaci di interagire con le APC, e in particolar modo di indurre risposte cellulo-mediate (Srivastava, 2002). Alcuni di essi come HSP70 e Gp96 sono stati usati coniugati alla proteina o al peptide ricombinante impiegati per la formulazione di vaccini contro il cancro (Dubensky & Reed, 2010). Attualmente vi è interesse riguardo la possibilità di impiegare HSP derivate da pianta per incrementare le risposte immunitarie contro l'antigene di interesse, ed un lavoro condotto con la HSP70 (Buriani *et al.*, 2010) rafforza la visione che in futuro le piante non rappresenteranno solamente dei bioreattori per la produzione di un vaccino, ma saranno esse stesse sorgente di molecole in grado di potenziare la risposta immunitaria contro l'antigene vaccinale.

Nel nostro laboratorio sono state dimostrate le proprietà adiuvanti dell'estratto di *N. benthamiana* wt e dell'estratto contenente la proteina E7 di HPV-16 (Franconi *et al.*, 2001); gli estratti vegetali saggiati hanno infatti mostrato di indurre principalmente la maturazione delle DC (Di Bonito *et al.*, 2009). Inoltre l'estratto contenente E7 è in grado di indurre linfociti naïve a produrre una risposta T cellulare specifica contro E7.

1.1.4.3.1 Le Ribosome Inactivating Proteins (RIP)

Nell'ambito di questa tesi di dottorato sono proposte nuove molecole proteiche provenienti dal mondo vegetale a funzione immunostimolatoria da impiegare in fusione con l'antigene vaccinale di interesse, il cui razionale sarà spiegato nello scopo della tesi. Queste molecole appartengono alla famiglia delle "Ribosome inactivating proteins" (RIP), enzimi in grado di inattivare cataliticamente i ribosomi, poichè depurinano gli RNA ribosomali 23S/28S, con conseguente arresto della sintesi proteica e morte cellulare.

Le RIP si trovano nella maggior parte delle piante, anche in specie edibili come spinaci e pomodoro, e possono essere presenti in uno o più tessuti della stessa pianta, in più di una forma. Le RIP sono prodotte anche dai calli e dalle cellule vegetali in coltura. Inoltre esse sono state riscontrate in batterio (tossine Shiga e simili), nell'alga *Laminaria japonica* e nei funghi. Infine, la presenza di proteine con attività delle RIP sono state riscontrate anche in cellule in coltura e tessuti di mammifero (Stirpe & Battelli, 2006). Tuttavia, il nostro interesse è focalizzato solo alle RIP del mondo vegetale.

Le RIP sono classificate in tre gruppi in base alle loro proprietà fisiche (**figura 13**) (Mundy *et al.*, 1994; Nielsen & Boston, 2001).

Le RIP di tipo 1, come la proteina antivirale delle piante erbacee appartenenti al genere *Phytolacca*, la saporina presente nella saponaria (*Saponaria officinalis*) e l'inibitore della traduzione presente in orzo (*Hordeum vulgare*), sono enzimi monomerici di circa 30 KDa, che presentano solo la catena polipeptidica ad attività enzimatica. Esse presentano al sito attivo residui amminoacidici e struttura secondaria altamente conservati (Barbieri *et al.*, 1993). Tuttavia, l'omologia di sequenza complessiva è bassa all'interno di questa classe ed esistono differenze nelle modificazioni post-traduzionali (Hartley & Lord, 1993).

Le RIP di tipo 2, come la ricina presente nei semi di ricino (*Ricinus communis*) e l'abrina presente nei semi della pianta dei rosari (*Abrus precatorius*), sono eterodimeri altamente tossici, che oltre alla catena ad attività enzimatica (catena A), presentano una catena lectinica (catena B), ognuna di circa 30 KDa. Le due catene sono legate da ponti disolfuro. La catena B è in grado di legare le molecole di galattosio delle glicoproteine e/o glicolipidi che si trovano sulla superficie cellulare delle cellule eucariotiche (Lehar *et al.*, 1994).

Le RIP di tipo 3 sono sintetizzate come un precursore inattivo (proRIP) che richiede eventi di processamento proteolitico per rimuovere una regione compresa tra gli amminoacidi che costituiscono il sito catalitico (Mundy *et al.*, 1994). Questa classe è meno rappresentata delle altre due e ad oggi RIP di tipo 3 sono state caratterizzate solo in

mais e orzo.

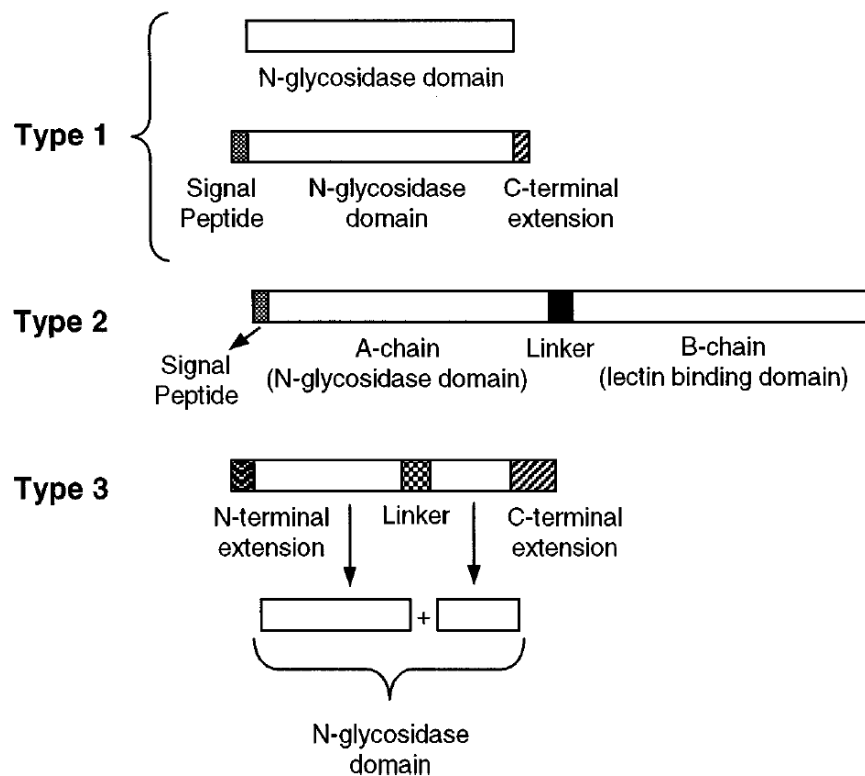


Figura 13. Classificazione delle RIP e comparazione delle strutture primarie (Fonte: Nielsen & Boston, 2001). Solo le regioni rappresentate dai rettangoli in bianco sono presenti nelle forme enzimatiche attive.

L'attività N-glicosidasi delle RIP è dovuta alla capacità di rimuovere una specifica adenina contenuta all'interno di una regione di 14 nucleotidi dell'rRNA (nota come "loop α -sarcinico", conservata dai batteri all'uomo), che porta a un blocco dei fattori di elongazione al ribosoma e quindi a un blocco della traduzione (Nilsson *et al.*, 1986). Il confronto della struttura primaria di RIP di tipo 1 e 2 ha evidenziato che molti sono i residui aminoacidici invarianti e altamente conservati. In particolare, quattro sono i residui invarianti presenti nel sito catalitico di tutte le RIP: Tyr 80, Tyr 123, Glu 177, Arg 180 (le posizioni si riferiscono alla catena A di ricina). Un ruolo comune a questi residui è quello delle tirosine, che tramite i loro anelli aromatici consentono di presentare al sito catalitico il substrato (l'adenina) in una conformazione energeticamente favorevole. Alcune RIP sono molto attive sia contro i ribosomi animali che vegetali, mentre alcuni mostrano scarsa reattività contro i ribosomi di pianta (Hartley *et al.*, 1996). Inoltre, poche RIP presentano attività contro i ribosomi procariotici (Chaddock *et al.*, 1994).

Le RIP svolgono principalmente un ruolo di difesa dall'attacco di patogeni, principalmente rivolto contro funghi e insetti (Hartley *et al.*, 1996). Inoltre, le RIP mostrano un'attività antivirale contro virus vegetali e animali, mediante un meccanismo

che non coinvolge il sito catalitico per l'attività N-glicosidasi (Wang & Tumer, 2000; Parikh & Tumer, 2004). In aggiunta, è stato dimostrato che la produzione delle RIP viene indotta a causa di stress abiotici (Nielsen & Boston, 2001). Oltre alla principale attività di depurinazione dell'rRNA, le RIP sono in grado di depurinare il DNA e l'RNA in altri siti rispetto a quello descritto per gli rRNA (Barbieri *et al.*, 1997; Nicolas *et al.*, 1998). La maggior parte delle RIP possiede una sequenza segnale all'estremità N-terminale, che le indirizza al sistema endomembranoso (Hartley & Lord, 1993). Infatti, le RIP sono generalmente localizzate nell'apoplasto o in compartimenti sub-cellulari come il vacuolo. Questa compartimentalizzazione ha il ruolo di proteggere i ribosomi ortologi della pianta dall'attacco delle RIP endogene. Tuttavia, esistono eccezioni, rappresentate ad esempio dalle RIP provenienti dai cereali, in cui le RIP risiedono nel citosol, ma non sono attive contro i ribosomi ortologi alle normali concentrazioni cellulari.

Sebbene la conoscenza della tossicità delle specie vegetali che producono le RIP ed il loro utilizzo da parte dell'uomo abbiano radici antichissime, è degli ultimi anni il forte interesse scientifico sviluppatosi intorno a questo gruppo di enzimi, in particolare per il loro potenziale utilizzo in medicina, nella realizzazione di tossine mirate (Stirpe, 2004; Hartley & Lord 2004; Zarovni *et al.*, 2007, 2009; Ng, *et al.* 2010).

L'efficacia citotossica delle RIP può essere infatti sfruttata per l'eliminazione di cellule tumorali o del sistema immunitario o nervoso, generalmente mediante l'ottenimento di immunotossine, molecole ibride in cui le RIP sono coniugate a ligandi specifici (generalmente anticorpi monoclonali) capaci di veicolarle sui bersagli cellulari. In particolare, un'isoforma da seme della saporina (denominata S06) è stata largamente utilizzata per la preparazione di immunotossine sfruttando l'attività citotossica indirizzata su specifiche cellule bersaglio, tramite ligandi tumore-specifici. La saporina presenta infatti una buona resistenza ai processi di derivatizzazione e coniugazione (Santanchè *et al.*, 1997), una scarsa tossicità aspecifica e un'alta attività catalitica una volta penetrata nel citoplasma (Ferrerias, *et al.* 1993). Tuttavia, queste tossine chimeriche non sono strumenti clinici perfetti in quanto è stato verificato che prolungate terapie basate su somministrazioni ripetute di immunotossine inducono una forte risposta immunitaria di tipo umorale diretta contro le RIP (che ne riduce la vita media ed inibisce la citotossicità) o soprattutto contro l'anticorpo terapeutico al quale sono legate, vanificando l'efficacia terapeutica (Frankel, 2004, Szalai *et al.*, 2005).

Oltre alla tossicità dovuta all'attività catalitica, alcune RIP (come la viscumina, la tricosantina e i peptidi dell'abrina) sono state identificate per la loro abilità di modulare risposte immunitarie aspecifiche, come l'incremento del numero e dell'attività delle

cellule NK e l'induzione della produzione di citochine (TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL -2, IL -6, IL-10, IL-12) (Hajto *et al.*, 1990, 1998; Bhutia *et al.*, 2009). E' stato dimostrato in modelli murini che peptidi derivanti dall'abrina sono coinvolti nella regressione dei tumori mediante incremento del numero delle cellule CD4⁺ e CD8⁺, dei marcatori di co-stimolazione delle cellule T (CD80, CD86) e dei marcatori dell'attivazione dei linfociti (CD25, CD71) negli splenociti, mediante l'attivazione di macrofagi associati a tumori e la presentazione di antigeni associati a tumori (Bhutia *et al.*, 2009).

Molte RIP (in particolare la viscumina, la proteina antivirale di *Momordica charantia*, la saporina, la tricosantina e i peptidi dell'abrina) sono potenti induttori dell'apoptosi attraverso diverse vie che coinvolgono la caspasi 3, l'ossido nitrico ed il fattore di necrosi tumorale, TNF (Battelli, 2004; Narayanan *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2010), con implicazioni terapeutiche importanti in quanto molte cellule tumorali sono resistenti all'uccisione attraverso l'azione delle caspasi e delle serine proteasi, ma potrebbero essere più suscettibili attraverso la via del TNF. In aggiunta, le RIP come la tricosantina creano un ambiente pro-infiammatorio attraverso la chemotassi dei leucociti (Zhao *et al.*, 1999). Queste attività delle RIP concernenti la modulazione aspecifica delle risposte immunitarie con effetti anti-tumoral, le proprietà pro-infiammatorie, l'antigenicità, l'induzione dell'apoptosi, sono considerate indipendenti dalla tossicità dovuta all'attività catalitica (Stirpe, 2004).

1.2 CASO DI STUDIO 1. L'AGENTE EZIOLOGICO DELLA SINDROME RESPIRATORIA ACUTA GRAVE (SARS): IL VIRUS SARS-CoV

1.2.1 GENERALITÀ E CARATTERISTICHE PRINCIPALI

La malattia infettiva nota come sindrome respiratoria acuta grave, SARS, si è manifestata per la prima volta nel novembre del 2002 nella provincia di Guangdong in Cina meridionale, antico focolaio di numerose epidemie come la peste bubbonica del 1894, le grandi influenze del 1957 e del 1968, e della recente influenza aviaria.

I sintomi della malattia comprendevano febbre alta, mialgia, cefalea, linfopenia, trombocitopenia, difficoltà respiratorie e presenza d'inclusioni polmonari visibili mediante radiografia. Dal 1 novembre 2002 al 31 giugno 2003, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ricevette complessivamente 8098 segnalazioni (provenienti da 29 paesi in tutto il mondo) di casi sospetti e/o probabili di SARS, con 774 decessi, per un tasso di letalità del 9.6%. Questi casi sono accuratamente documentati ed ogni passaggio è stato ricostruito, come mai è stato possibile nella storia dell'epidemiologia delle malattie infettive (Kamps & Hoffman, 2003). Grazie alla collaborazione fra laboratori e scienziati di tutto il mondo si riuscì rapidamente ad identificare l'agente eziologico della SARS, un coronavirus che venne denominato SARS-CoV (Marra *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2003; Drosten *et al.* 2003; Ksiazek *et al.*, 2003). Tale virus fu isolato da cellule in coltura precedentemente inoculate con campioni nasofaringei, orofaringei e salivari dei pazienti infetti (Peiris *et al.*, 2003) e l'associazione del virus con la malattia fu confermata quando si osservò che macachi inoculati con il SARS-CoV sviluppavano sintomi simili a quelli che si osservavano in casi umani di SARS (Fouchier *et al.*, 2003).

Mediante comparazione delle sequenze genomiche del SARS-CoV e degli altri coronavirus, si notò una stretta omologia (più del 99%) del SARS-CoV con il coronavirus che infetta lo zibetto cinese, considerato un cibo prelibato in Cina; la presenza di coronavirus strettamente simili al SARS-CoV fu evidenziata anche nel cane procione, nel tasso cinese e in individui umani che lavoravano a diretto contatto con questi animali. Ciò suggerì che il virus poteva aver oltrepassato la barriera di specie ed essere riuscito ad infettare l'uomo (Guan *et al.*, 2003). Successivamente, una forte omologia di sequenza si ottenne anche con il coronavirus che infetta i pipistrelli (Li *et al.*, 2005a; Lau *et al.*, 2005) e ad oggi la trasmissione zoonotica del SARS-CoV dagli animali all'uomo è accertata.

In seguito alla prima epidemia, qualche altro caso di SARS fu riportato nel 2004, a causa di contaminazioni accidentali, nei laboratori di Taiwan, Singapore, e Cina e di contatti

con animali infettati in Cina. I ceppi di SARS-CoV in questi eventi secondari differivano da quelli riportati nell'epidemia predominante (Peiris *et al.*, 2004).

Il SARS-CoV è stato dichiarato un patogeno di categoria C (può causare malattie gravi nell'uomo ed è pericoloso per chi lo manipola in laboratorio) dall'Istituto Nazionale Americano di Biodifesa da Allergeni e Malattie Infettive (sito web 6). Ad oggi la trasmissione della malattia si è fermata, ma non ci sono abbastanza informazioni su quando e se il SARS-CoV riemergerà nella popolazione umana. Come conseguenza di questa possibilità, e a causa del possibile utilizzo del SARS-CoV in attacchi bioterroristici, laboratori di tutto il mondo continuano a lavorare su questo virus, per ampliare le conoscenze su di esso e per ottenere metodi rapidi di individuazione della malattia e di vaccinazione.

Il SARS-CoV è un virus appartenente al genere dei *Coronavirus*, famiglia *Coronaviridae*. I coronavirus infettano gli uccelli e molti mammiferi, uomo compreso, causando malattie respiratorie, enteriche, epatiche e del sistema nervoso centrale. Nell'uomo sono considerati la causa più frequente del comune raffreddore. Il SARS-CoV penetra all'interno dell'organismo umano principalmente attraverso le mucose del tratto respiratorio e gastrointestinale (Lau & Peiris, 2005) e si trasmette prevalentemente tramite le goccioline che si liberano dalle secrezioni respiratorie delle persone infette.

I coronavirus devono il nome alla loro caratteristica forma a corona: il nucleocapside è circondato da una membrana pericapsidica a composizione lipidica dalla quale protrudono delle proteine chiamate "spike proteins" (S) che conferiscono al virus un aspetto a corona (**figura 14**). Inserite nello spessore della membrana, sono presenti le glicoproteine di membrana (M) e le proteine di rivestimento "envelope proteins" (E). A differenza degli altri coronavirus, nel SARS-CoV sono considerate proteine strutturali del capsido anche le proteine 3a, 7a e 7b, coinvolte potenzialmente nell'entrata e nell'assemblaggio del virione (Huang *et al.*, 2006a, b; Schaecher *et al.*, 2007). All'interno di quest'involucro è presente una molecola di RNA, con polarità positiva, associata a multimeri di proteina del nucleocapside (N), a formare una struttura elicoidale. Le particelle virali hanno un diametro compreso tra i 60 e 130 nm (Ksiazek *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003).

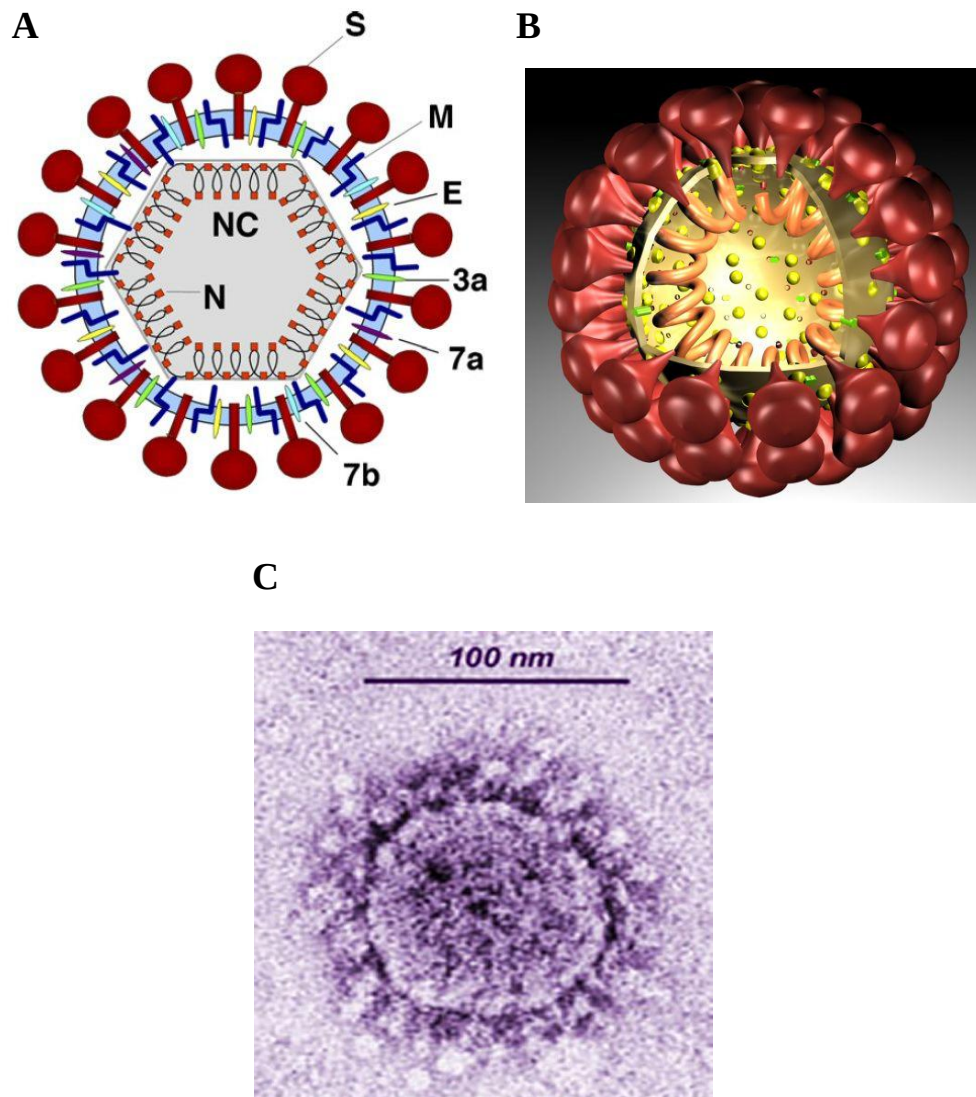


Figura 14. Una rappresentazione schematica (A), una tridimensionale (B), ed una foto al microscopio elettronico del virus SARS-CoV.

A) S: "Spike protein"; M: "Membrane protein"; E: "Envelope protein"; N: "Nucleocapsid protein"; NC: nucleocapside; **3a**, **7a** e **7b**: proteine accessorie strutturali (Fonte: Enjuanes *et al.*, 2007)

B) Fonte: sito web 7

C) Fonte: sito web 8

Il genoma del SARS-CoV comprende 29740 nucleotidi (sequenza FRA; GenBank Acc. No. AY310120) (Marra *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2003) e contiene complessivamente 14 ORF funzionali (Thiel *et al.*, 2003). Esso viene suddiviso concettualmente in due regioni: la regione coinvolta nella replicazione virale (formata da due lunghe ORF, 1a e 1b, che codificano per proteine necessarie per la sintesi dell'RNA virale) e la regione strutturale (formata dalle rimanenti 12 ORF che codificano per 7 proteine strutturali del virus e per 5 proteine accessorie a funzione non ancora completamente chiarita) (**figura 15**).

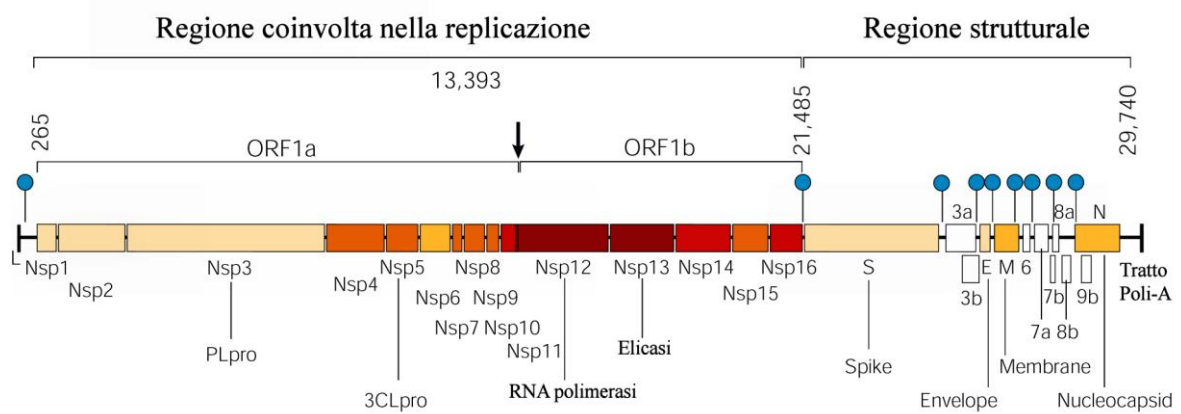


Figura 15. Struttura genomica del SARS-CoV (Fonte: Stadler *et al.*, 2003).

Nsp: proteine non strutturali

L'attacco e la penetrazione del virus all'interno della cellula ospite sono mediati principalmente dalla proteina S. Essa interagisce con il recettore di membrana dell'ospite ACE2, appartenente alla famiglia dei CEACAM (Li *et al.*, 2005c). Il primo evento che segue l'entrata del virus nel citoplasma dell'ospite è la traduzione delle proteine coinvolte nella replicazione del genoma virale, che si associano principalmente a formare un complesso chiamato “replicasi-trascrittasi virale” (Thiel *et al.*, 2003). La molecola di RNA con polarità positiva viene poi trascritta in una con polarità negativa che funge poi da stampo per la sintesi degli mRNA subgenomici e dell'RNA genomico con polarità positiva, il quale costituirà il nuovo genoma virale.

Le molecole di mRNA subgenomiche codificano per le proteine della regione strutturale, che comprendono le proteine strutturali e le proteine accessorie, nell'ordine riportato in **figura 16**. La sintesi della proteina N avviene a livello dei ribosomi liberi nel citoplasma; qui molteplici copie della proteina si associano alla molecola di RNA virale con polarità positiva a formare il “core” nucleocapsidico, il quale viene poi diretto verso il lume del reticolo endoplasmatico (RE) rugoso.

La sintesi delle proteine S, E e M avviene invece direttamente a livello dei ribosomi associati al RE rugoso; esse vengono inserite nello spessore delle membrane del RE. Il RE rugoso contenente le particelle virali perde gradualmente i ribosomi in superficie, si gonfia e diventa una matrice vescicolare coinvolta nella morfogenesi virale (Qin *et al.*, 2004). Queste vescicole si dirigono verso l'apparato del Golgi, dove le particelle virali vengono assemblate a formare dei virioni maturi. Essi vengono esocitati negli spazi intercellulari mediante trasporto vescicolare dal Golgi alla membrana plasmatica (Stadler *et al.*, 2003).

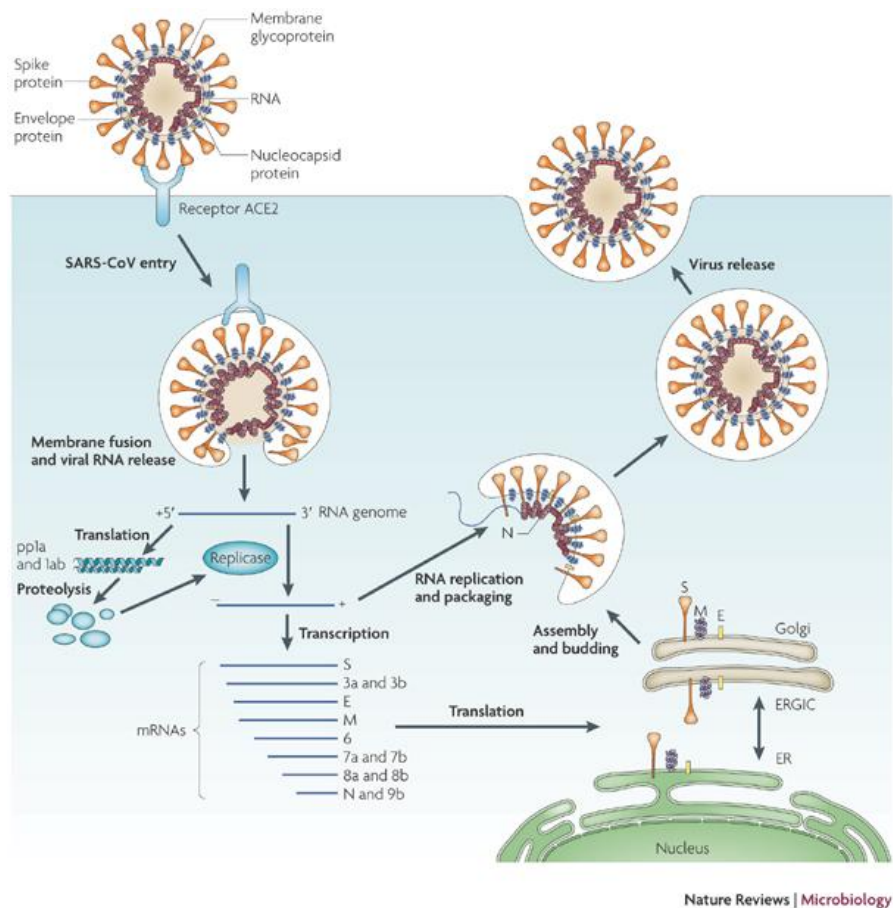


Figura 16. Ciclo replicativo del SARS-CoV (Fonte: Du *et al.*, 2009).

1.2.2 LE PROTEINE STRUTTURALI

La struttura virale del SARS-CoV è costituita da almeno sette proteine (S, 3a, E, M, 7a, 7b, e N) (**figura 12A**) (Weiss & Navas-Martin, 2005; Huang *et al.*, 2006a, b; Enjuanes *et al.*, 2007). Come accennato in precedenza, la membrana pericapsidica, a composizione lipo-proteica, contiene le proteine S, 3a, E, M, 7a e 7b, mentre il nucleocapside è formato dall'RNA genomico associato a multimeri della proteina N, a formare una struttura elicoidale. Le proteine S, E, M, ed N sono riscontrabili in tutti i coronavirus e sono quindi le più caratterizzate. La proteina S è la più grande e più studiata proteina strutturale del SARS-CoV, soprattutto per quanto riguarda la possibilità di sviluppo di un vaccino anti-SARS, in quanto è quella che per prima interagisce con le strutture cellulari dell'ospite e rappresenta il componente principale dell'immunità protettiva contro il SARS-CoV (Qiu *et al.*, 2005a). Tuttavia, nonostante la proteina S contenga diversi epitopi immunogenici, è in grado di indurre solamente la produzione di anticorpi neutralizzanti (Gao *et al.*, 2003; Pang *et al.*, 2004; Sui *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005a; Tripp *et al.*, 2005) e non una risposta immunitaria di tipo cellulo-mediata in pazienti affetti da SARS; inoltre, spesso, quando impiegata in saggi immunologici non viene riconosciuta dai sieri di pazienti convalescenti (Han *et al.*, 2004).

1.2.2.1 La proteina N

Il gene N, lungo 1269 nucleotidi, codifica per una fosfoproteina di 422 amminoacidi del peso di 46 KDa, la cui funzione principale è quella di interagire con l'RNA virale a formare una struttura nucleocapsidica elicoidale (Surjit & Lal, 2007). La sua composizione in amminoacidi polari la rende altamente idrofila. E' l'unica proteina del SARS-CoV che non presenta ponti disolfuro in quanto è totalmente priva di residui di cisteina. Ciò le conferisce una stabilità molto bassa rispetto alle altre proteine strutturali del virus (Qin *et al.*, 2003). Studi termodinamici condotti in vitro sulla proteina N ricombinante purificata hanno mostrato che essa è stabile a valori di pH compresi tra 7 e 10, con un massimo di stabilità conformazionale intorno a pH 9 (Luo *et al.*, 2004). E' stato inoltre dimostrato che tale proteina inizia a perdere la conformazione a 35°C ed è irreversibilmente denaturata a 55°C (Wang *et al.*, 2004), mentre la denaturazione ottenuta con agenti chimici (ad esempio urea) è reversibile (Surjit & Lal, 2007).

La regione N-terminale consiste principalmente di amminoacidi carichi positivamente ed è responsabile del legame con l'RNA virale (Huang *et al.*, 2004) mentre la regione C-terminale, ricca di lisine presente tra gli amminoacidi 373 e 390, è probabilmente un segnale di localizzazione nucleare. Nella regione centrale, tra gli amminoacidi 177 e 207, è presente un motivo ricco in serine e arginine (SR-rich motif) (Surjit & Lal, 2007) (**figura 17**).

Studi biofisici condotti da Chang e colleghi hanno suggerito che la proteina N è composta da due domini strutturali indipendenti e una regione linker (Chang *et al.*, 2006) (**figura 18**). Il primo dominio, presente all'N-terminale, si trova all'interno del dominio di legame all'RNA. Il secondo dominio consiste di una regione C-terminale in grado di auto-assemblaggio. Tra i due domini è presente una regione altamente disordinata che serve da linker. Questa regione interagisce con la proteina M e con la ribonucleoproteina umana cellulare hnRNPA1 (Fang *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2005a, b). Inoltre, questa regione sembra essere sito delle numerose fosforilazioni presenti nella proteina N. Le fosforilazioni, ad opera di diverse chinasi, avvengono, infatti, a livello delle serine, presenti nel "SR-rich motif" (Chang *et al.*, 2006).

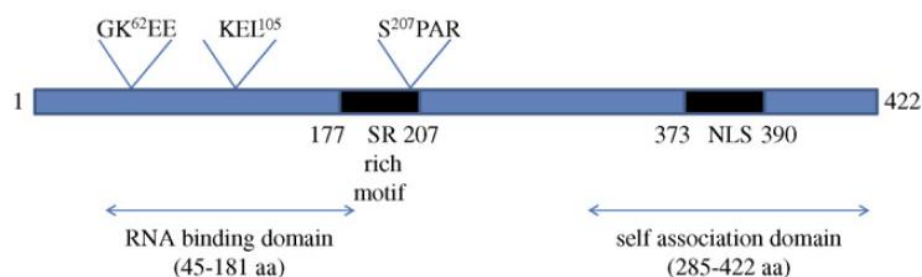


Figura 17. Struttura della proteina N del SARS-CoV. (Fonte: Surjit & Lal, 2007)

GK⁶²EE: motivo di sumoilazione (residui di lisina); **KEL¹⁰⁵**: motivo RXL, responsabile del legame con la ciclina D; **S²⁰⁷PAR**: motivo soggetto a fosforilazione ad opera del complesso ciclina-CDK (residui di serina).

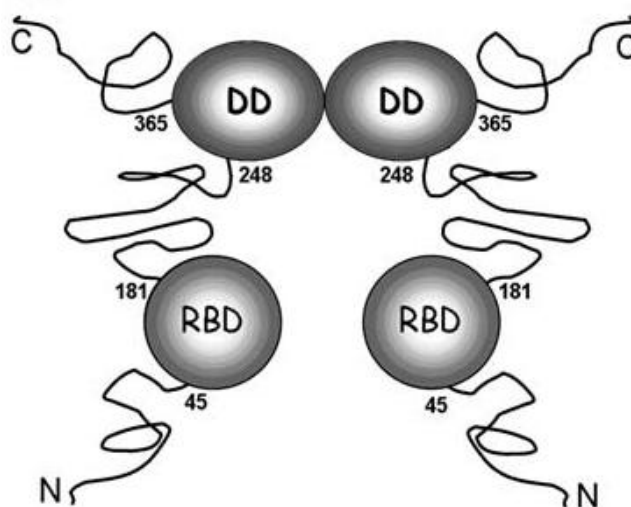


Figura 18. Modello proposto da Chang e collaboratori per la struttura della proteina N (Fonte: Chang *et al.*, 2006). E' mostrata l'interazione tra due proteine N. **RBD**: dominio di legame all'RNA; **DD**: dominio di dimerizzazione.

Come nel caso degli altri coronavirus, la proteina N del SARS-CoV è soggetta a varie modificazioni post-traduzionali come l'acetilazione, la fosforilazione e la sumoilazione. La prima metionina della proteina è rimossa, le altre metionine all'N-terminale sono ossidate, e la serina all'N-terminale è acetilata (Krokhin *et al.*, 2003).

La sumoilazione avviene a livello del residuo di lisina 62, presente all'interno del putativo sito di sumoilazione GKEE mostrato in **figura 17** (Li *et al.*, 2005b), e sembra svolgere un ruolo chiave nel modulare l'oligomerizzazione della proteina, nella sua traslocazione nucleolare e nelle proprietà della proteina di de-regolare il ciclo cellulare (Surjit & Lal, 2007). Inoltre è stato dimostrato che la maggior parte delle serine presenti nella proteina N sono fosforilate ad opera di diverse chinasi (Surjit *et al.*, 2005).

Diversamente dalla maggior parte dei coronavirus, la proteina N del SARS-CoV è distribuita prevalentemente nel citoplasma, sia in cellule infettate che quando espressa in maniera eterologa (Surjit *et al.*, 2005; You *et al.*, 2005; Rowland *et al.*, 2005).

In aggiunta, alcuni studi condotti su cellule infettate mostrano una localizzazione nucleolare della proteina (You *et al.*, 2005). E' ancora da chiarire completamente la localizzazione intracellulare della proteina. Tuttavia, uno studio condotto dal gruppo di Timani e colleghi su mutanti per delezione della proteina N, ha mostrato che l'estremità N-terminale si localizza nel nucleo, mentre l'estremità C-terminale si riscontra nel citoplasma e nel nucleolo. Usando diverse combinazioni di differenti mutanti di delezione, questi ricercatori sono giunti alla conclusione che la proteina N potrebbe agire da "shuttle" tra il citoplasma, il nucleo e il nucleolo (Timani *et al.*, 2005).

Come accennato in precedenza, la principale funzione della proteina N è quella di interagire con l'RNA virale a formare la struttura nucleocapsidica e questa interazione avviene principalmente a livello del dominio N-terminale; tuttavia studi recenti hanno dimostrato che esiste un altro dominio in grado di legare più fortemente l'RNA, nella regione C-terminale della proteina (Chen *et al.*, 2007). La proteina N è anche in grado di oligomerizzare, formando dimeri, trimeri, tetrameri o esameri dipendentemente dalla concentrazione della stessa (Surjit & Lal, 2007).

In aggiunta alla capacità di formare il nucleocapside, la proteina N presenta numerose altre funzioni. Essa è in grado di deregolare il ciclo cellulare dell'ospite, principalmente attraverso il motivo di sumoilazione (Li *et al.*, 2005b), inibendo la progressione della fase S del ciclo cellulare e la sintesi dei geni specifici di questa fase come la ciclina E e la CDK2 (Surjit *et al.*, 2006). E' stato osservato che la proteina N inibisce direttamente l'attività dei complessi ciclina-CDK, che risulta nell'ipofosforilazione della proteina del retinoblastoma, ma sono ancora da chiarire completamente i meccanismi che portano alla deregolazione del ciclo cellulare (Surjit & Lal, 2007). E' stato inoltre dimostrato il ruolo che la proteina N svolge nell'attivazione del fattore nucleare kappa B (NF- κ B) (Liao *et al.*, 2005a), un fattore di trascrizione che attiva numerosi geni coinvolti in risposte immunitarie cellulari e nei processi infiammatori, come l'interferon- β , il fattore di necrosi tumorale (TNF)- α e le interleuchine (IL) 2, 6 ed 8. Altri studi hanno suggerito che la proteina N è coinvolta anche nell'attivazione della via di trasduzione del segnale dell'attivatore proteico AP1. Questo attivatore è coinvolto in processi come la proliferazione cellulare, la differenziazione e l'apoptosi (He *et al.*, 2003a).

La proteina N risultata essere un buon marcatore di diagnosi precoce dell'infezione da parte del SARS-CoV. Essa può essere riscontrata il giorno successivo l'insorgenza della malattia ed è la proteina virale più abbondante nel plasma di pazienti infetti (Che *et al.*, 2004; Di *et al.*, 2005). Inoltre, la maggior parte degli anticorpi rilevati nel siero di pazienti infetti da SARS sono diretti contro la proteina N. Essi sono stati riscontrati in tutti i

pazienti infetti da SARS (Shi *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2004), mentre solo nel 63% dei pazienti sono stati rilevati anticorpi diretti contro la proteina S (Leung *et al.*, 2004).

La proteina N rappresenta anche un buon antigene da impiegare nella formulazione di un vaccino contro il SARS-CoV, in quanto è in grado di promuovere la produzione di anticorpi e di linfociti T citotossici (CTL), questi ultimi importanti per l'eliminazione delle cellule infettate (Gao *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2004).

1.2.2.2 La proteina M

Il gene M (666 nucleotidi) codifica per una glicoproteina di membrana di 221 amminoacidi, con un peso di 25 KDa, principalmente coinvolta nell'assemblaggio e nel rilascio dei virioni dalla cellula, e nell'interazione con le proteine N e S.

Essa consiste in un breve ectodominio N-terminale con un sito N-glicosilato (Oostra *et al.*, 2006), tre segmenti transmembrana e una lunga coda citosolica al C-terminale (Voß *et al.*, 2009) (**figura 19**). Una caratteristica distintiva è la presenza di una bassa percentuale di cisteine (1.4%) rispetto alle altre proteine virali (eccetto la proteina N che ne è totalmente priva). Il 40% della proteina è formata da 4 residui amminoacidici non polari alifatici (Leu, Ala, Ile, e Val).

La proteina M del SARS-CoV presenta una bassa omologia di sequenza con la proteina M degli altri coronavirus. Da studi condotti dal gruppo di Hu *et al.* (2003) si evince inoltre che, tra i vari isolati del SARS-CoV, la proteina M è quella che presenta maggiori variazioni di sequenza rispetto alle altre proteine del virus. Le sostituzioni nucleotidiche portano a tre principali cambiamenti delle proprietà della proteina:

- le sostituzioni che fanno variare il punto isoelettrico (pI) e la carica netta sono probabilmente correlate alle proprietà antigeniche della proteina. E' noto, infatti, che un alto valore di pI genera un'antigenicità più marcata;
- le sostituzioni che portano ad un cambiamento d'idrofobicità, sono correlate alla stabilità della membrana. Un abbassamento dell'idrofobicità dei segmenti transmembranari porta ad una riduzione della stabilità della membrana che influenza le interazioni tra la proteina M e la membrana dell'ospite;
- le sostituzioni che portano ad un cambiamento d'idrofilicità sono correlate all'interazione della proteina con le molecole interne.

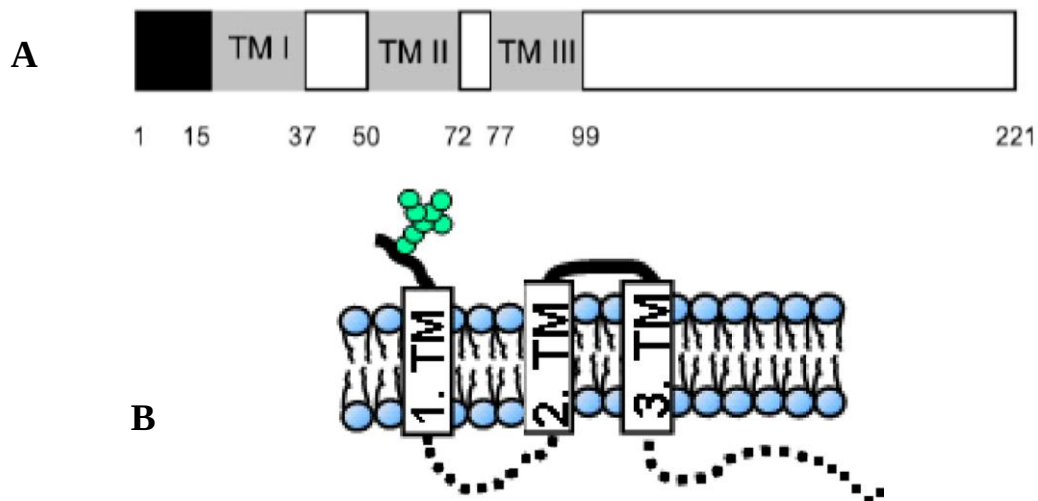


Figura 19. Rappresentazione della proteina M del SARS-CoV

TM: domini transmembranari

A) Fonte: He *et al.*, 2005.

B) Figura modificata da: Voß *et al.*, 2009

L'intera proteina risulta essere basica (pI 9.63) e carica positivamente. La regione transmembranaria, costituita da tre domini, comprende circa 80 amminoacidi. Il primo di questi domini, è composto in prevalenza da amminoacidi non polari alifatici (83%), risultando quindi altamente idrofobo. Il secondo dominio presenta l'81% di amminoacidi non polari alifatici. Il segmento compreso tra i primi due domini transmembrana si trova all'interno del virione. Il terzo dominio transmembrana è meno idrofobico degli altri due, presentando il 68.2% di amminoacidi non polari alifatici. Il segmento compreso tra il secondo e il terzo dominio transmembrana è collocato all'esterno. La regione ammino-terminale esterna è composta da 15 codoni, è localmente acida e idrofilica, e a livello del quarto codone è presente un sito di glicosilazione. La regione carbossi-terminale è composta da 123 residui altamente idrofilici ed è collocata all'interno del virione. Sono presenti tre siti di fosforilazione a livello dei codoni 98, 171 e 183 correlati ad una possibile interazione con le proteine S ed E, e tre siti di N-miristilazione (codoni 125, 187 e 211) (Hu *et al.*, 2003). Inoltre, la regione compresa fra i codoni 94 e 114 (che sembra essere la più conservata tra i vari coronavirus) contiene una sequenza consenso correlata all'interazione con la proteina N e con l'RNA virale durante la morfogenesi virale. E' stato, infatti, dimostrato che la proteina M contiene un sito legante la proteina N, ed uno legante l'RNA virale, il quale interagisce con il segnale di impacchettamento dell'RNA (Narayanan *et al.*, 2003; He *et al.*, 2004, Fang *et al.*, 2005).

Il gruppo di Hu e colleghi ha inoltre evidenziato, mediante analisi BLAST, nella zona C-terminale della proteina, una sequenza identica a quella osservata nel recettore 1 Vomeronasale (V1 rf2) di topo (Hu *et al.*, 2003). Tale recettore si trova nel bulbo

olfattorio dei topi ed è un recettore di feromoni che media una trasduzione del segnale Ca^{2+} -dipendente. Questa scoperta indica che tale motivo svolge un ruolo cruciale nell'infezione delle cellule epiteliali del tratto respiratorio, suggerendo un possibile collegamento con la manifestazione di sintomi a livello respiratorio nell'infezione mediata da SARS-CoV. La proteina M è correlata all'infettività virale mediante il legame con la proteina S ed il successivo legame con i recettori cellulari, aiutando la fusione del virione con la membrana dell'ospite. Tale funzione è svolta dall'estremità N-terminale della proteina M (Hu *et al.*, 2003). La proteina M è coinvolta anche in meccanismi che consentono al virus di evadere le prime barriere dell'ospite (immunità innata), alterando l'espressione genica di molecole infiammatorie chiave come ad esempio il fattore di trascrizione nucleare kappa B (NF- κ B) (Fang *et al.*, 2007).

Sono stati rilevati otto possibili siti antigenici, sei dei quali a livello della regione C-terminale della proteina. E' stato postulato che tali siti rivolti verso l'interno del virione, sono correlati con l'antigenicità virale, dopo l'entrata del virione nella cellula ospite, quando esso è collassato e la regione interna della proteina M è rilasciata ed esposta nel citoplasma, o immediatamente dopo la sua traduzione. Quattro segmenti (codoni 1-20, 137-157, 189-211, 206-221), hanno mostrato reattività con anticorpi provenienti da pazienti affetti da SARS (Hu *et al.*, 2003). Inoltre sono stati identificati due epitopi immunodominanti, localizzati all'estremità della regione N-terminale (aa 1-31) e all'interno della regione C-terminale (aa 132-161). Peptidi sintetici comprendenti tali regioni hanno mostrato di essere altamente reattivi con i sieri di pazienti convalescenti affetti da SARS, suggerendo la loro potenziale applicazione nella diagnosi sierologica della SARS (He *et al.*, 2005b).

Inoltre, questi peptidi hanno mostrato di essere capaci di indurre forti risposte anticorpali in conigli in seguito ad immunizzazione (He *et al.*, 2005). Diversi esperimenti effettuati su animali modello con la proteina M hanno mostrato che essa è in grado d'indurre la produzione di anticorpi neutralizzanti, suggerendo che tale proteina può essere utilizzata per lo sviluppo di un vaccino preventivo anti-SARS-CoV (Pang *et al.*, 2004; Tripp *et al.*, 2005). Recentemente è stato dimostrato che cellule CD4^+ e CD8^+ della memoria M-specifiche persistono nel sangue periferico di pazienti infettati dal SARS-CoV dopo più di un anno dall'infezione (Yang *et al.*, 2007).

1.2.3 DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA SARS-CoV

Un elemento chiave per limitare la diffusione di un'epidemia è rappresentato dall'abilità nel diagnosticare l'agente causale nel minor tempo possibile. Ciò può essere ottenuto mediante l'identificazione di alcuni marcatori che sono specificamente espressi dal patogeno, oppure mediante l'identificazione di alcuni fattori prodotti dall'ospite in maniera specifica solo durante l'infezione.

Sono stati elaborati diversi test di laboratorio che consentono di evidenziare la presenza del SARS-CoV; essi comprendono i test immunoenzimatici (EIA) per la ricerca sierologica degli anticorpi, i test RT-PCR per la ricerca del materiale genetico (genoma) virale e l'isolamento virale su colture cellulari. I test EIA e RT-PCR sono sensibili e altamente specifici. Tuttavia, va sottolineato che la capacità diagnostica è legata alla concentrazione virale, per la RT-PCR, e al momento della malattia in cui si fa la ricerca sierologica degli anticorpi, per l'EIA, per cui la conferma laboratoristica deve essere effettuata su più campioni biologici, di diversa provenienza anatomica, in diversi momenti della malattia (sito web 9).

La proteina N, essendo una delle proteine espresse in maniera predominante durante gli stadi precoci (anche dopo un giorno) dell'infezione da SARS-CoV, contro la quale si verifica una forte risposta anticorpale, è stata proposta come un efficace strumento diagnostico (Surjit *et al.*, 2007). Anticorpi IgM e IgA diretti contro la proteina N si riscontrano anche dopo soli 2 giorni dall'inizio della malattia, e il livello di IgA specifiche per N è notevolmente alto al 9° giorno (Tan *et al.*, 2004). Inoltre, come già accennato, a differenza di quanto verificato per la proteina S, tutti i sieri dei pazienti convalescenti affetti da SARS, mostrano una reattività immunologica verso la proteina N (Shi *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2004).

La ricerca sull'impiego di questa proteina come strumento di diagnosi si è focalizzata principalmente su due strategie: lo sviluppo di efficienti anticorpi monoclonali contro la proteina N, e la produzione di proteina N ricombinante da usare per la rilevazione di anticorpi nei pazienti infettati. Mediante l'approccio del "phage display", Flego e colleghi hanno identificato frammenti anticorpali umani che riconoscono distinti epitopi di N (Flego *et al.*, 2005). In aggiunta, diversi gruppi di ricerca hanno sviluppato anticorpi monoclonali efficienti contro l'epitopo immunodominante maggiore di N, che possono essere usati in saggi ELISA per l'identificazione del SARS-CoV negli stadi precoci dell'infezione (Shang *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005b, c; Woo *et al.*, 2004).

Nel caso della strategia che prevede invece l'impiego della proteina N per l'allestimento di saggi immunologici, si punta soprattutto alla produzione a basso costo dell'antigene N

prodotto in sistemi ricombinanti. Ad esempio, la proteina N è stata prodotta con alte rese esprimendo il gene con i codoni ottimizzati in *E. coli* (Das & Suresh, 2006) o in cellule di lievito (Liu *et al.*, 2004). Inoltre è stato allestito un saggio ELISA efficiente, basato sulla proteina N prodotta in cellule di insetto, mediante il sistema basato sul baculovirus (Saijo *et al.*, 2005). Tuttavia, l'impiego della proteina N ricombinante in saggi immunologici presenta alcune problematiche. La proteina N prodotta in batterio, ad esempio, produce falsi positivi a causa dell'interferenza degli antigeni derivanti dal batterio stesso (Leung *et al.*, 2006; Yip *et al.*, 2007). Altri studi hanno riportato una cross-reattività della proteina N ricombinante del SARS-CoV con gli antisieri di pazienti infettati con altri coronavirus che causano il comune raffreddore. Tuttavia, i falsi positivi possono essere minimizzati mediante l'uso della proteina N insieme alla proteina S e questa strategia è stata esplorata da numerosi ricercatori (Woo *et al.*, 2004; Haynes *et al.*, 2007; Gimenez *et al.*, 2009). Successivamente è stato dimostrato che la porzione C-terminale della proteina N agisce in maniera più specifica della proteina intera, in quanto questa regione contiene la maggior parte dei siti antigenici (Qiu *et al.*, 2005b; Bussmann *et al.*, 2006).

1.2.4 STATO DELL'ARTE DEI VACCINI CONTRO IL SARS-CoV

Nei pazienti immunocompetenti affetti da SARS dopo 2-3 settimane dall'inizio della malattia sono stati riscontrati anticorpi neutralizzanti e nel 90% dei casi la malattia si è risolta senza bisogno di cure (Ksiazek *et al.*, 2003). Questi dati indicano che la maggior parte dei pazienti risponde con successo all'infezione da SARS-CoV. Tuttavia, al fine di prevenire una possibile ricomparsa dell'epidemia nella popolazione umana, molti gruppi di ricerca si sono focalizzati sullo sviluppo di vaccini profilattici efficaci.

Diverse formulazioni vaccinali, comprendenti virus inattivati, VLP, vaccini a subunità peptidici/proteici, vaccini genetici e vaccini basati su vettori virali sono attualmente in elaborazione (Enjuanes *et al.*, 2007; Roper & Rehm, 2009). Le prime formulazioni ad essere state sviluppate si basano sull'impiego di vaccini inattivati o attenuati in quanto l'urgenza dell'epidemia poteva essere assecondata più facilmente mediante l'uso di tecnologie già ben radicate. Diversi lavori dimostrano che virioni del SARS-CoV purificati e inattivati, somministrati in concomitanza con adiuvanti, generano risposte anticorpali alte (Kong *et al.*, 2005; See *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2006). Tuttavia, queste tipologie vaccinali non sono facili da ottenere con un livello di biosicurezza 3 (ricordiamo che il SARS-CoV è un patogeno di classe C) e proprio a causa dell'alta patogenicità non sono completamente sicuri per l'uso clinico (Roper & Rehm, 2009).

Numerosi lavori riportano la produzione di VLP del SARS-CoV basate principalmente

sulle proteine S, M ed E, usando diversi sistemi di espressione e diversi tipi cellulari, ma non forniscono dati riguardo la loro efficacia nell'indurre risposte immunitarie (Enjuanes *et al.*, 2007). Solo recentemente un gruppo di ricerca ha riportato l'induzione di una forte risposta umorale, anche di tipo neutralizzante in topi immunizzati per via intraperitoneale o mucosale con VLP costituite dalle proteine S, M ed E espresse in cellule di insetto (Lu *et al.*, 2009).

Nel caso dei vaccini a subunità o basati su vettori virali, il candidato vaccinale più studiato è rappresentato dalla proteina S, che interagisce per primo con i recettori di membrana dell'ospite ed è in grado di indurre una forte risposta anticorpale neutralizzante in grado di bloccare l'infezione virale con alta efficienza. Tuttavia, essendo presenti alla superficie virale altre proteine che hanno mostrato di essere in grado di elicitare risposte anticorpali, riscontrate in sieri di pazienti SARS convalescenti, si è sviluppato un certo interesse anche su di esse, al fine di incrementare la risposta immunitaria protettiva generata dal vaccino a subunità (Roper & Rehm, 2009). Ad esempio, è stato osservato che la proteina M è in grado di stimolare la produzione di anticorpi neutralizzanti in topi immunizzati (Pang *et al.*, 2004). In aggiunta, la proteina N rappresenta un candidato vaccinale molto interessante. Essa, di per sé, non fornisce protezione contro il SARS-CoV; non sono stati riscontrati anticorpi neutralizzanti contro la proteina N negli anti-sieri dei pazienti infettati dal SARS-CoV (Buchholz *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2005). Questo è dovuto principalmente alla localizzazione della proteina all'interno del capsido virale, che non risulta quindi accessibile agli anticorpi durante l'infezione (Surjit & Lal, 2007). D'altra parte però, la proteina N è in grado di indurre una risposta cellulo-mediata efficiente (Buchholz *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2004) e un vaccino più efficace potrebbe quindi essere costituito dalla co-somministrazione delle proteine N e S oppure N e M.

Diversi approcci basati su vaccini a DNA sono stati descritti; alcuni di essi si basano su strategie di "prime-boost" eterologo, che combinano vaccini a DNA con vaccini basati sul virus inattivato (Woo *et al.*, 2005; Zakhartchouk *et al.*, 2005). Altri vaccini a DNA si basano sull'antigene N, espresso da solo, fuso alla calreticolina, o insieme agli antigeni S ed M (Kim *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2006). Attualmente è in studio clinico un vaccino a DNA basato sulla proteina S (Martin *et al.*, 2008). Sorprendentemente, uno studio comparativo di vaccinazioni a DNA basate sugli antigeni S, M ed N, mostra che la risposta cellulo-mediata più forte è stata generata da M (Wang *et al.*, 2005), e i pazienti affetti da SARS mostrano una memoria duratura di tipo CD4 e CD8 contro l'antigene M (Yang *et al.*, 2007).

In aggiunta, diverse tipologie di vaccini basati su vettori adenovirali contenenti le sequenze degli antigeni S, N ed M, o su altre strategie, sono stati formulati e descritti nel dettaglio (Enjuanes *et al.*, 2007; Roper & Rehm, 2009).

E' stato riportato uno studio interessante circa l'uso di vettori adenovirali basati su S ed N in vaccinazioni di topi per via intramuscolare o nasale. Questo studio mostra come la somministrazione intramuscolare sia più efficiente nella induzione di anticorpi neutralizzanti sierici, mentre la somministrazione intranasale induce la produzione di anticorpi mucosali IgA e risulta più efficiente nel bloccare la replicazione virale nei tessuti nasali e polmonari (See *et al.*, 2006). Questi dati mostrano l'importanza della stimolazione dell'immunità mucosale nel caso del SARS-CoV che entra nell'organismo proprio attraverso le superfici mucosali (Roper & Rehm, 2009).

1.2.4.1 Vaccini a subunità peptidici/proteici basati sugli antigeni N e M

Come già discusso, questa categoria vaccinale presenta alcuni vantaggi rispetto ai vaccini convenzionali, soprattutto in termini di sicurezza, per cui risulta molto adeguata per l'uso in pazienti umani per la prevenzione dell'infezione da SARS-CoV.

Per quanto riguarda l'antigene M, è stato riportato un solo studio che mostra che un peptide ricombinante (M106-221) è in grado di indurre una risposta umorale virus neutralizzante in topi immunizzati (Pang *et al.*, 2004). In aggiunta, questo studio dimostra la capacità di indurre una risposta umorale specifica da parte dei peptidi M1-31 ed M132-161.

Nel caso dell'antigene N, invece, questo campo di ricerca è stato sviluppato maggiormente. In un caso la proteina N è stata espressa in *E. coli*, purificata ed impiegata per la vaccinazione di topi Balb/c in emulsione di Montanide ISA-51 contenente le sequenze ipometilate CpG o in PBS (Liu *et al.*, 2006). Nel primo caso è stata ottenuta prevalentemente una risposta cellulo-mediata. Al contrario, nel secondo caso la risposta immunitaria riscontrata è stata principalmente di tipo umorale.

Un altro studio ha riportato che l'immunizzazione di topi con peptidi della proteina N comprendenti gli epitopi immunodominanti, risulta nell'induzione di una forte immunità cellulare (Zhao *et al.*, 2007). Inoltre, uno studio condotto con la proteina N prodotta in *Lactobacillus lactis* mostra il suo potenziale uso in somministrazioni vaccinali mucosali (Pei *et al.*, 2005). Recentemente Schulze e colleghi hanno riportato una forte risposta umorale sia a livello sistemico che mucosale in topi e una risposta cellulo-mediata, in seguito a vaccinazione con un protocollo di "prime-boost" eterologo consistente in una prima somministrazione ("prime") intranasale con la proteina N insieme ad un adiuvante

e ad una seconda somministrazione (“boost”) intramuscolare con il virus modificato vaccinia Ankara (MVA) esprimente la proteina N (Schulze *et al.*, 2008). Altri lavori riportano l’induzione di risposte mediate da cellule T in seguito alla vaccinazione con la proteina N in modelli animali (Gupta *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006).

1.2.4.2 Vaccini in pianta contro il SARS-CoV

Al fine di sviluppare vaccini sicuri, efficienti e a basso costo, la piattaforma di espressione basata sulla produzione di proteine eterologhe in pianta è stata esplorata anche per gli antigeni della SARS.

Il dominio S1 della proteina S del SARS-CoV è stato espresso stabilmente in pomodoro e in tabacco a basso livello di nicotina, nel citoplasma o nel cloroplasto (Pogrebnyak *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Tale antigene prodotto in pianta è in grado di indurre in topi risposte immunitarie sistemiche e mucosali specifiche per il SARS-CoV, in seguito a somministrazione orale (Pogrebnyak *et al.*, 2005).

Recentemente è stata prodotta la proteina N del SARS-CoV in tabacco mediante agroinfiltrazione. Questa proteina ha mostrato di essere in grado di indurre una forte risposta immunitaria sia di tipo umorale che cellulo-mediata in topi. Infatti, alti titoli anticorpali appartenenti alle sottoclassi IgG1 e IgG2 sono stati riscontrati nei sieri dei topi immunizzati. Inoltre, durante la vaccinazione è stata identificata l’espressione di IFN e IL 10 negli splenociti, ma non di IL 2 e 4 (Zheng *et al.*, 2009).

Ad oggi non è stata riportata l’espressione in pianta della proteina M.

1.3 CASO DI STUDIO 2. L'AGENTE CAUSALE DEL TUMORE ALLA CERVICE UTERINA: IL VIRUS DEL PAPILLOMA UMANO

1.3.1 GENERALITÀ E CARATTERISTICHE PRINCIPALI

I virus del papilloma umano (HPV) costituiscono un gruppo eterogeneo di virus appartenenti alla famiglia dei *Papillomaviridae*, con più di 160 differenti genotipi ad oggi identificati. Essi sono piccoli virus a DNA a doppio filamento provvisti di un capsido icosaedrico, che mostrano un tropismo per gli epitelio squamosi.

Gli HPV possono essere classificati in virus non genitali cutanei, ossia a tropismo epidermico e virus mucosali non genitali e genitali, che infettano, invece, rispettivamente, le superfici mucosali del cavo oro-faringeo, della laringe, dell'albero respiratorio oppure dell'epitelio ano-genitale (Burd, 2003). Esistono tipi di HPV cancerogeni in ciascuna di queste tre categorie.

Circa 40 tipi di HPV sono responsabili di infezioni genitali (de Villiers *et al.*, 2004) ed in base allo spettro di lesioni che inducono, possono essere classificati in due categorie, a basso (lr-HPV) e ad alto rischio od oncogeni (hr-HPV).

Gli lr-HPV (tipo 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) inducono principalmente lesioni iper-proliferative benigne delle cellule epiteliali definite condilomi o verruche e lesioni squamose intraepiteliali di basso grado (SIL). In quest'ultimo caso si tratta generalmente di lesioni asintomatiche che possono regredire spontaneamente in 3-4 mesi, oppure persistere a lungo ed aumentare in numero e dimensioni, senza tuttavia portare al cancro (Burd, 2003). Gli lr-HPV a basso rischio di tipo 6 ed 11 sono, da soli, la causa del 90% della casistica delle verruche ano-genitali (von Krogh, 2001; Bosch *et al.*, 2003). In altri casi, si può instaurare un'infezione latente o inattiva, raramente sintomatica, caratterizzata da aree infette citologicamente normali in cui la replicazione virale è sincrona con il ciclo cellulare ed avviene in un epitelio squamoso normale (zur Hausen, 2002; Burd, 2003).

Gli hr-HPV (tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 e probabilmente anche 26, 53 e 66) sono gli agenti causali di differenti manifestazioni neoplastiche, principalmente a carico delle mucose (zur Hausen, 2002; Munoz *et al.*, 2003). Questi virus sono soprattutto associati allo sviluppo di carcinomi ano-genitali e sono riscontrabili nel 99% dei casi di carcinoma cervicale (Walboomers *et al.*, 1999). In quest'ambito, HPV-16 e -18 sono responsabili per oltre il 70% di tutti i casi riscontrati di cancro cervicale e di neoplasia cervicale intra-epiteliale di alto grado. HPV-16 è il tipo virale più frequentemente associato ad infezioni cervicali latenti, benigne o pre-neoplastiche ed alla metà dei casi di carcinoma cervicale nel mondo (Da Silva *et al.*,

2001).

Gli HPV genitali si trasmettono principalmente per via sessuale, tuttavia non sono virus a trasmissione sessuale tipici, poiché anche semplicemente il contatto cutaneo può rappresentare una modalità di contagio a livello genitale e la trasmissione può avvenire attraverso il contatto con i tessuti labiali o scrotali (Giles, 2003). HPV è inoltre molto resistente al calore e all'essiccamento, cosicché il contagio si può realizzare anche attraverso l'esposizione prolungata a tessuti o abiti contaminati che abbiano assorbito e trattenuto il virus.

Oltre il 70% delle donne sessualmente attive va incontro ad infezione da HPV nel corso della vita (Bosch *et al.*, 2003) e le stime epidemiologiche suggeriscono che attualmente a livello mondiale circa 630 milioni di soggetti presentano infezione da HPV e di questi, circa 30 milioni presentano infezioni genitali. Ogni anno nel mondo vengono diagnosticati circa 500000 casi di cancro cervicale, l'80% dei quali proprio nelle regioni più arretrate e 280000 decessi l'anno, principalmente nei Paesi in via di sviluppo, nella cui popolazione femminile tale neoplasia, in termini di incidenza, è seconda solo al cancro al seno (McLaughlin-Drubin & Münger, 2009a).

Lo "screening" basato sullo "smear test" di Papanicolau ("Pap test") e la disponibilità di trattamenti tempestivi, rendono il cancro della cervice uterina una neoplasia relativamente poco diffusa nel mondo sviluppato (35000 decessi l'anno dovuti a neoplasie cervicali rappresentano, comunque, la media stimata per Europa e Stati Uniti); al contrario, la carenza di tali strumenti è la principale ragione di una così significativa incidenza nei Paesi in via di sviluppo. Tuttavia tali procedure, pur riducendo il rischio di sviluppare lesioni cervicali, non possono, ovviamente, proteggere dall'infezione da HPV o curare dallo sviluppo delle neoplasie a questa associate, le quali necessitano di un attento "follow-up" e, spesso, di escissione chirurgica o di trattamenti chemio-terapici (Peto *et al.*, 2004; Sadler *et al.*, 2004).

Come già accennato, gli HPV sono virus provvisti di involucro capsidico icosaedrico ma privi di "envelope", con genoma a DNA circolare a doppio filamento di circa 7.9 Kb (zur Hausen, 2002).

I primi studi strutturali condotti sui Papillomavirus sono stati fortemente limitati dall'incapacità di tali virus di replicare in colture tissutali convenzionali. Tuttavia, tali studi hanno rivelato strutture del diametro di 55-60 nm contenenti il DNA genomico virale impacchettato come complesso nucleo-istonico a formare una struttura simile alla cromatina (Doorbar, 2005). Il capside è composto di 72 capsomeri pentamerici di proteina capsidica maggiore L1 ed ogni pentamero forma una rete di ponti disolfuro intra- ed inter-

pentamerici che servono a stabilizzare l'intera struttura (Kondo *et al.*, 2007). Oltre alla proteina L1, il capside è costituito da una quantità, non ancora nota con precisione, di proteina capsidica minore L2. Analisi SDS-PAGE di virioni purificati di HPV-1, analisi biochimiche delle proteine L1 e L2 di HPV-11 e recenti immagini di microscopia crioelettronica di pseudo virioni di HPV-16 suggeriscono che le particelle virali del papilloma umano possono contenere più di 36 e con un massimo di 72, molecole di L2 (Buck *et al.*, 2008).

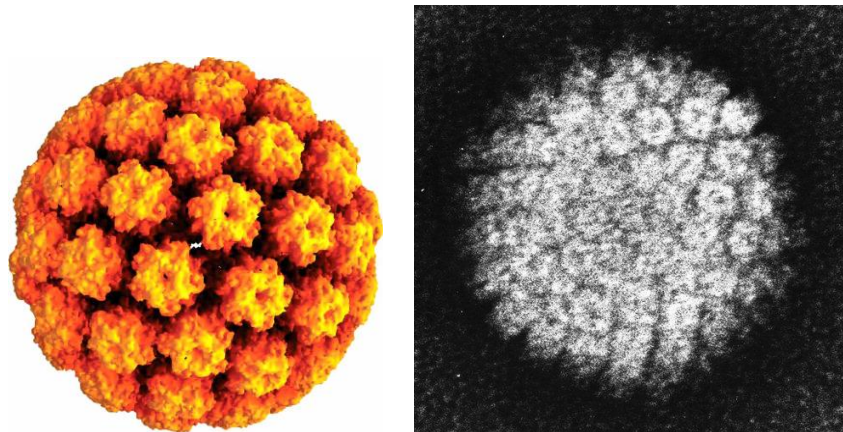


Figura 20. Una rappresentazione tridimensionale del capside (A) e una foto al microscopio elettronico (B) del virus del papilloma umano

A: (Fonte: Cid-Arregui, 2009).

B: (Fonte: sito web 10)

L'organizzazione del DNA virale è una caratteristica ben conservata tra i papillomavirus. Il genoma di HPV può essere suddiviso in tre regioni distinte (Zheng & Baker, 2006):

- i) regione codificante contenente i geni precoci (“early”, E) che codificano per proteine non strutturali;
- ii) regione codificante contenente i geni tardivi (“late”, L) che codificano per le proteine strutturali capsidiche;
- iii) regione non codificante chiamata “upstream regulatory region” (URR) o “long control region” (LCR).

Considerando HPV-16 come modello, il genoma virale, che nelle cellule infettate è solitamente mantenuto in forma episomale come molecola circolare chiusa superavvolta, comprende otto ORF (zur Hausen, 2002) (**figura 21**).

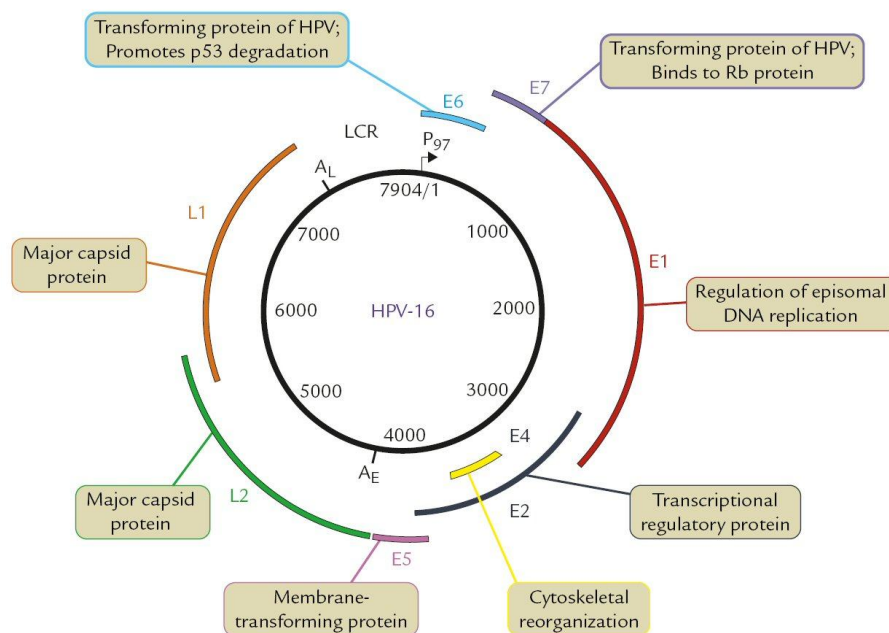


Figura 21. Rappresentazione schematica del genoma di HPV-16, con caratterizzazione delle funzioni di ogni proteina virale. (Fonte: Lin *et al.*, 2010)

Le ORF sono espresse a partire da mRNA policistronici che sono trascritti da un solo filamento di DNA (Zheng & Baker, 2006).

i) Le ORF precoci codificano per le proteine E: E1, E2, E4, E5, E6, ed E7 (Zheng & Baker, 2006; Buck *et al.*, 2008; Conway & Meyers, 2009).

Le proteine E1 ed E2 regolano la replicazione virale e coordinano l'espressione degli altri geni precoci. La proteina E4 (indicata come E1^ΔE4 in quanto è tradotta da un trascritto che codifica per i primi 5 amminoacidi di E1 fusi all'intera sequenza di E4) è anch'essa coinvolta nella replicazione del genoma virale attraverso l'inibizione del passaggio dalla fase G2 a M del ciclo cellulare; inoltre interagisce con la rete di cheratine cellulari, causando il loro collasso e permettendo quindi la fuoriuscita dei virioni maturi dallo strato corneo dell'epidermide. Le proteine E5, E6, ed E7 degli HPV ad alto rischio sono oncogeni in quanto in grado di trasformare le cellule e di stimolarne la divisione.

ii) Le ORF tardive codificano per le proteine strutturali L1 e L2, corrispondenti rispettivamente alla proteina capsidica maggiore e minore (Chen *et al.*, 2000; Buck *et al.*, 2008).

iii) La regione non codificante URR contiene tutti gli elementi regolatori in *cis* necessari per la trascrizione dei geni di HPV, compresi il promotore precoce, l'origine di replicazione ed i siti di legame per la proteina regolatrice virale E2.

Gli HPV ad alto rischio iniziano la maggior parte della trascrizione mediante due promotori virali maggiori (Conway & Meyers, 2009).

Il primo promotore, chiamato promotore precoce, inizia la trascrizione a monte della ORF

di E6 e porta alla formazione di trascritti che sono tradotti precocemente nel ciclo vitale del virus. Questo promotore funziona indipendentemente dallo stadio differenziativo della cellula e agisce prima della fase produttiva del ciclo vitale virale. Il secondo promotore, più tardivo, funziona in maniera dipendente dallo stato differenziativo cellulare, ciò significa che è attivato solo nelle cellule dei tessuti in via di stratificazione/differenziazione. Questo promotore serve a produrre diversi tipi di trascritti che portano alla traduzione delle proteine L1 e L2.

Il ciclo vitale di HPV è intimamente associato al programma di differenziamento dei cheratinociti dell'ospite, tanto che l'assemblaggio di virioni maturi avviene solo nelle cellule dello strato soprabasale allo stadio finale di differenziamento. Gli HPV sono, infatti, parassiti intracellulari obbligati il cui ciclo vitale e la conseguente espressione delle proteine virali è intimamente correlata con lo stadio di differenziamento delle cellule dello strato spinoso degli epitelii (Chow & Broker, 1997).

L'infezione iniziale da parte degli HPV avviene attraverso micro-abrasioni del tessuto epiteliale, che permettono l'entrata delle particelle virali nelle cellule dello strato basale (**figura 22**). Le cellule dello strato basale consistono principalmente di cellule parzialmente indifferenziate in continua divisione per rimpiazzare le cellule che sono perse con la desquamazione (Kaur & Li, 2000).

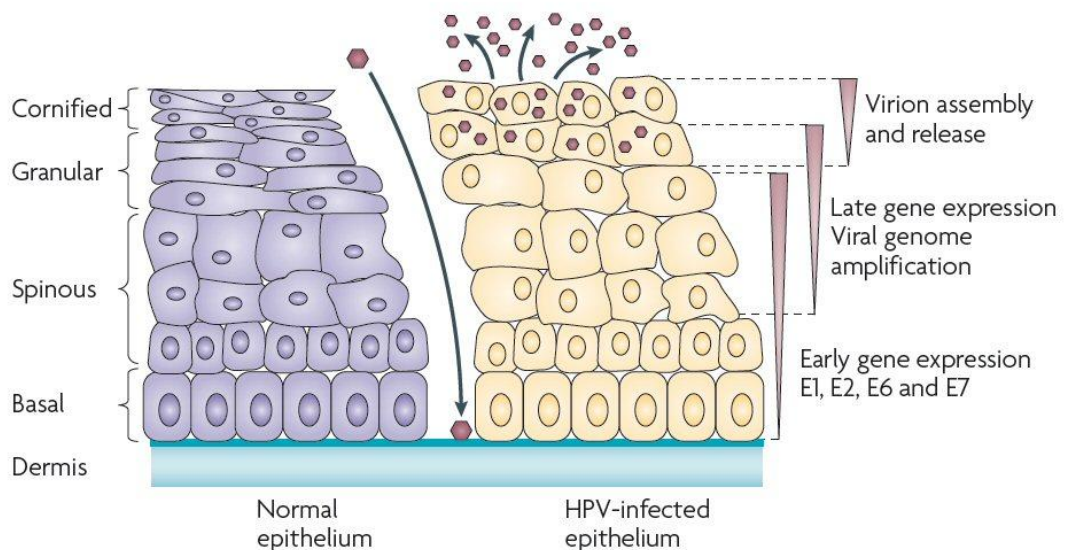


Figura 22. Infezione, ciclo vitale ed espressione differenziale dei geni di HPV parallelamente al processo differenziativo dell'epitelio cervicale (Fonte: Moody & Laimins, 2010).

Esistono controversie riguardo il meccanismo di entrata virale; possibili recettori per l'entrata di HPV nella cellula sono l'alfa integrina, l'eparina solfato e la laminina 5. (Giroglou *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2001; Culp & Christensen, 2004; Doorbar, 2005) e in base al tipo di HPV, l'entrata sembra essere guidata da clatrina o caveole (Bousarghin *et*

al., 2003; Day *et al.*, 2003; Hindmarsh & Laimins, 2007; Smith *et al.*, 2007). Una volta che il virione si trova nel citoplasma, sembra che l'estremità N-terminale della proteina L2 venga tagliata nel compartimento endosomiale e il complesso L2-genoma rilasciato nel citosol (Richards *et al.*, 2006). La proteina L2 potrebbe poi traslocare il genoma nel nucleo attraverso il suo sito di localizzazione nucleare (NLS) (Fay *et al.*, 2004; Bordeaux *et al.*, 2006). Una volta nel nucleo, inizia una sofisticata cascata di espressione genica che serve a garantire un minimo numero di copie di DNA virale per cellula (Doorbar, 2005).

Le proteine E1 ed E2, coinvolte nella replicazione virale, sono tra le prime ad essere espresse, aiutando la stabilizzazione di circa 20-100 copie episomali per ogni cellula basale (Mohr *et al.*, 1990). Inoltre, E2 serve per regolare la trascrizione dei geni E6 ed E7 attraverso una specifica interazione con il promotore precoce (Mohr *et al.*, 1990; Meyers *et al.*, 1992). Negli HPV a tropismo genitale come HPV-16, E2 reprime la trascrizione dei geni precoci E6 ed E7 interagendo con specifici siti bersaglio all'interno della URR, inducendo lo slittamento dell'apparato di trascrizione in corrispondenza di tali geni e di conseguenza, la loro repressione. Il basso livello di trascrizione dei geni E6 ed E7, determinato da E2 consente alla cellula ospite di continuare il proprio normale processo differenziativo. In questa fase il numero di copie di DNA virale è mantenuto basso e costante (circa 20-50 copie per cellula) e solo una percentuale ridotta di trascritti è effettivamente espressa.

Nello strato spinoso prossimale dell'epitelio cervicale infettato, numerosi fattori di trascrizione cellulari interagiscono con la URR determinando l'inizio della trascrizione dei due geni precoci trasformanti E6 ed E7. I prodotti di tali geni sono implicati nella deregolazione del ciclo cellulare a favore del virus e dunque interferiscono con i meccanismi di controllo dell'ospite inducendo la continua sintesi di DNA cellulare, essenziale per la replicazione produttiva del DNA virale stesso in tessuti che ormai sono giunti ad uno stadio differenziativo terminale.

Le proteine E6 ed E7 degli hr-HPV ma non dei lr-HPV sono oncoproteine. L'oncoproteina E6 è in grado di legare la proteina soppressore tumorale p53 quando complessata con la proteina cellulare ubiquitina ligasi chiamata proteina associata ad E6 (E6AP). L'attività della E6AP legata ad E6 porta all'ubiquitinazione e alla degradazione di p53 (Ghittoni *et al.*, 2010; Moody & Laimins, 2010). D'altra parte, l'oncoproteina E7 è in grado di legare e modulare una varietà di proteine come la famiglia dei soppressori tumorali del retinoblastoma (pRB) e proteine regolatorie del ciclo cellulare, portando ad un incremento della replicazione cellulare (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009a, b; Moody & Laimins, 2010). A seguito della divisione delle cellule dello strato basale

infettate da HPV, ogni cellula figlia conterrà diverse copie di genoma virale. Dopo la mitosi, una cellula rimane attaccata allo strato basale, mentre l'altra si stacca e inizia a migrare nello strato sovrastante, lo strato soprabasale. Durante tale migrazione, la cellula inizia il processo di differenziamento.

Negli epitelii non infettati da HPV, una volta che si sono staccate dallo strato basale, le cellule normalmente escono dal ciclo cellulare e ciò è spesso accompagnato dalla perdita dei nuclei. Nel caso di epitelii infettati da HPV invece, le cellule staccate rimangono mitoticamente attive a causa delle proprietà oncogeniche di E6 ed E7 (Ghittoni *et al.*, 2010). Di conseguenza, le cellule differenziate possono rientrare nella fase S ed incrementare l'espressione dei fattori di replicazione richiesti sia per l'amplificazione del genoma virale, sia per l'espressione dei geni tardivi (Conway & Meyers, 2009). Come conseguenza, procedendo verso strato spinoso distale, HPV si replica in un alto numero di copie (100-1000 per cellula).

Anche se designate come proteine precoci, E1^{E4} ed E5 sono tradotte in maniera dipendente dal differenziamento e sono coinvolte nella replicazione del genoma virale, attraverso l'inibizione del passaggio dalla fase G2 alla fase M del ciclo cellulare e la stimolazione della progressione del ciclo cellulare, rispettivamente (Fehrman *et al.*, 2003; Knight *et al.*, 2006). Anche le proteine tardive L1 e L2 (per mezzo del promotore tardivo) sono espresse solo nei cheratinociti all'ultimo stadio di differenziamento. Studi condotti con papillomavirus e poliomavirus suggeriscono che, una volta espresse, tali proteine assemblano a formare il capside icosaedrico grazie all'aiuto di chaperoni (Buck *et al.*, 2005; Chromy *et al.*, 2003, 2006; Bird *et al.*, 2008). Infine, nello strato corneo si pensa che la proteina E1^{E4} interagisca con una rete di cheratine cellulari, causando il loro collasso e permettendo la fuoriuscita dei virioni maturi (Bryan & Brown, 2000; Brown *et al.*, 2006).

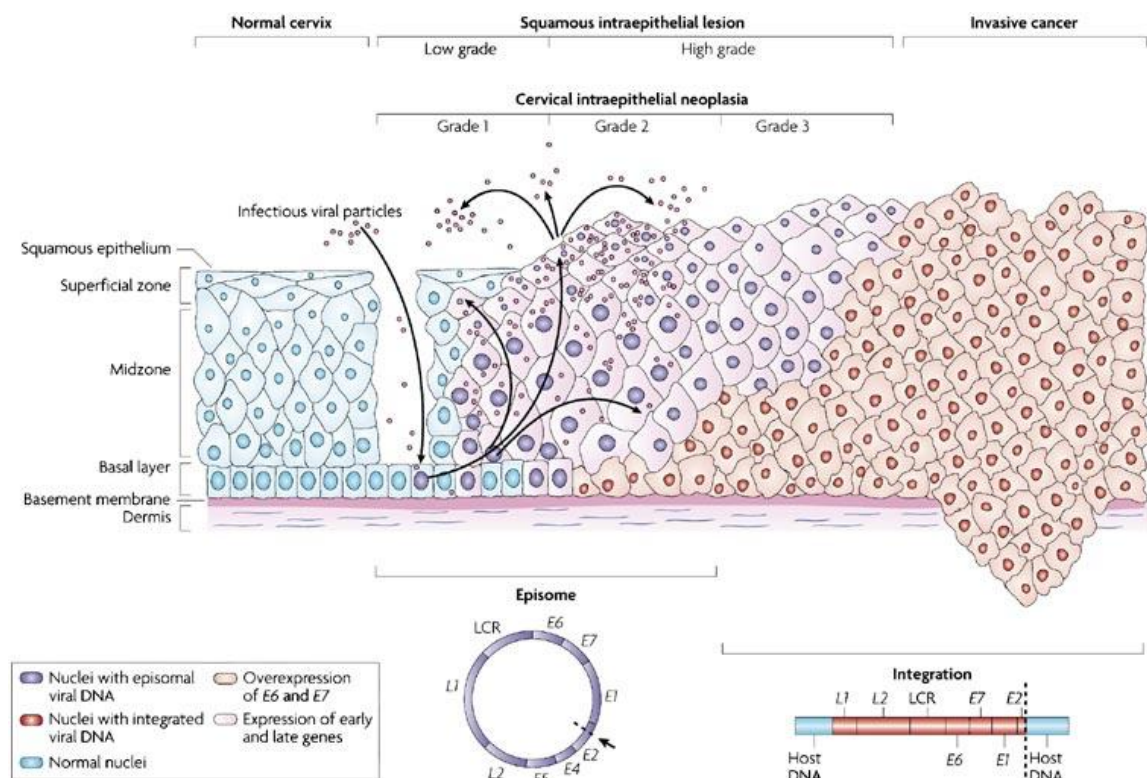
1.3.2 HPV E CANCEROGENESI

L'associazione tra HPV e carcinoma cervicale è stata proposta per la prima volta dal virologo tedesco Harald zur Hausen, che per questa importante scoperta, ha vinto il premio Nobel per la medicina nel 2008.

Il DNA di HPV può essere individuato sostanzialmente in tutti i tumori cervicali (99.7%) ed HPV-16 rappresenta il tipo virale più comunemente riscontrato in essi (circa nel 50%), seguito da HPV-18 (15%), da HPV-45 (8%) e da HPV-31 (5%). La restante parte di tumori cervicali contiene uno (o più di uno) dei dodici rimanenti tipi di HPV ad alto rischio. Inoltre, una percentuale di altri tumori come il cancro anale, il cancro del pene, le

neoplasie vulvari e vaginali e il tumore testa-collo, è associata alla presenza di hr-HPV, soprattutto HPV-16 (Ghittoni *et al.*, 2010). In particolare, nei casi di tumore testa-collo attribuibili all'infezione da HPV, HPV-16 è stato riscontrato nel 99% dei casi (Kreimer *et al.*, 2005). La maggior parte delle infezioni genitali da HPV non porta ad anomalie citologiche o cancro e sono eliminate dal sistema immunitario in breve tempo (6-12 mesi). Tuttavia, una piccola percentuale di infezioni, definite attive, diviene persistente e dà inizio ad eventi di trasformazione a livello epiteliale che possono regredire o progredire a carcinoma cervicale invasivo (zur Hausen, 2002).

I cambiamenti iniziali dell'epitelio cervicale, prima della vera e propria degenerazione neoplastica, sono denominati neoplasie cervicali intraepiteliali (CIN), caratterizzate istologicamente da modificazioni displastiche, ossia dalla sostituzione di parte dell'epitelio con cellule indifferenziate (Bosch *et al.*, 1995). Le CIN sono classificate patologicamente (sulla base della progressiva acquisizione di una morfologia atipica delle cellule e dell'alterazione della citoarchitettura del tessuto) in CIN1 (displasie di entità moderata), associate ad una replicazione virale ininterrotta e da un continuo rilascio di virioni, CIN2 e CIN3 (lesioni di entità grave), che rappresentano le vere e proprie lesioni che precedono il cancro cervicale (**figura 23**).



Nature Reviews | Cancer

Figura 23. Rappresentazione del processo di carcinogenesi mediato da HPV. (Fonte: Woodman *et al.*, 2007)

La degenerazione neoplastica dell'infezione si verifica generalmente in un periodo di 10-20 anni; alcune lesioni, invece, evolvono più rapidamente, in 1 o 2 anni (Burd, 2003). La progressione da CIN2/3 a carcinoma *in situ* è un evento che si realizza con un'elevata probabilità ma richiede, frequentemente, l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite. Infatti, l'infezione da HPV, di per sé, è insufficiente a determinare l'insorgenza del cancro, dato che essa rappresenta un evento comune in donne che spesso presentano comunque una citologia normale e che non svilupperanno mai un cancro cervicale. Lo stato del DNA di HPV nella cellula ospite ha un ruolo fondamentale nell'eventuale progressione tumorale. Nelle lesioni benigne (verruche genitali) e nelle displasie leggere, il DNA di HPV generalmente non si integra nel genoma dell'ospite ed è presente principalmente in forma episomale; esso, dunque, esprime sia i geni precoci che quelli tardivi determinando un'infezione produttiva.

Al contrario, nelle cellule dei tumori cervicali, spesso il DNA di HPV risulta integrato nei cromosomi oppure in esse coesistono la forma integrata e quella episomale. Inoltre, nelle cellule trasformate, il DNA di HPV può essere multimerico o contenere mutazioni nella URR (Kalantari *et al.*, 2001). Ciò suggerisce che l'integrazione o qualche altro evento che disturbi l'organizzazione e/o l'espressione del DNA virale (come, appunto, mutazioni o multimerizzazioni) rappresenti un fattore critico nella tumorigenesi indotta da HPV.

Le cellule che contengono una forma integrata del DNA di HPV-16 hanno un vantaggio selettivo nella crescita sulle cellule che contengono un DNA di HPV16 in forma episomale. L'integrazione, infatti, interrompe il ciclo virale annullando l'attività dei geni E2 ed E1 che regolano la trascrizione virale ed il controllo della replicazione. Essa comporta l'apertura dell'episoma in corrispondenza della regione codificante di E2 con la delezione parziale di tale regione (zur Hausen, 2002) e, quindi, l'assenza o l'inattivazione del prodotto corrispondente (**figura 24**). Poiché la proteina E2 regola la trascrizione delle proteine E6 ed E7, questo evento ne determina la deregolazione dell'espressione. In queste condizioni i geni E6 ed E7 vengono espressi costitutivamente dalla regione di regolazione della trascrizione virale.

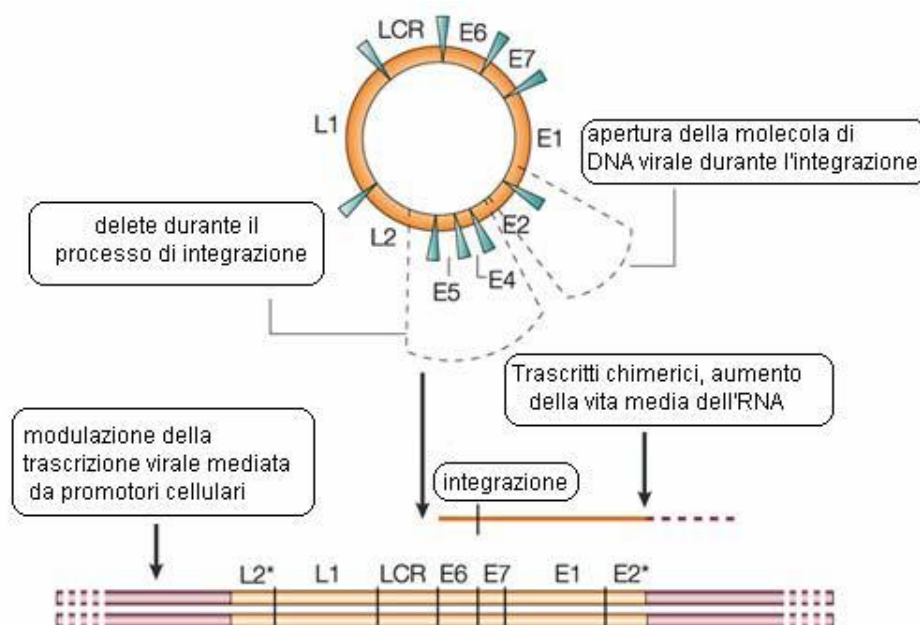


Figura 24. Meccanismo di integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite. (Figura modificata da zur Hausen, 2002).

Le oncoproteine E6 ed E7 degli hr-HPV sono le principali proteine coinvolte nella trasformazione cellulare e nella cancerogenesi. Tali proteine sono espresse in tutti i tumori contenenti HPV e nelle linee cellulari da essi derivate e sono richieste per l'immortalizzazione e per il mantenimento di un fenotipo trasformato (Munger *et al.*, 1989a). Come già accennato, il principale meccanismo con il quale le oncoproteine E6 ed E7 degli hr-HPV agiscono nel deregolare il ciclo cellulare è rappresentato dall'interazione con gli oncosoppressori (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009a; Moody & Laimins 2010). Inoltre le due proteine sono coinvolte in numerosi altri processi e sono responsabili dell'induzione di una marcata instabilità genomica.

La proteina E6 degli hr-HPV interagisce con il prodotto del gene onco-soppressore p53 determinandone la degradazione attraverso la via dell'ubiquitina. Al contrario, la proteina E6 degli HPV a basso rischio 6, 11, 44, 54 e 61 non induce la degradazione di p53 e ciò correla con il loro scarso potere trasformante (Hiller *et al.*, 2006). L'assenza di una proteina p53 funzionale rende la cellula altamente suscettibile al danno al DNA e impedisce l'innescare del fenomeno apoptotico mediato, appunto, dal prodotto di questo gene onco-soppressore. Di conseguenza si ha un aumento della probabilità di evolvere in tumore maligno. In aggiunta al principale meccanismo d'azione, l'oncoproteina E6 degli hr-HPV svolge un ruolo anti-apoptotico in quanto coinvolta nella perdita del contatto cellula-cellula e nella polarità cellulare (Gardioli *et al.*, 1999) ed è in grado di stimolare l'espressione di inibitori delle proteine coinvolte nell'apoptosi (James *et al.*, 2006). Un'altra importante caratteristica di tale oncoproteina è rappresentata dalla capacità di

attivare la trascrizione delle "human Telomerase Reverse Transcriptase" (hTERT) (Klingelutz *et al.*, 1996), causando il mantenimento di lunghi telomeri e quindi la proliferazione cellulare indefinita.

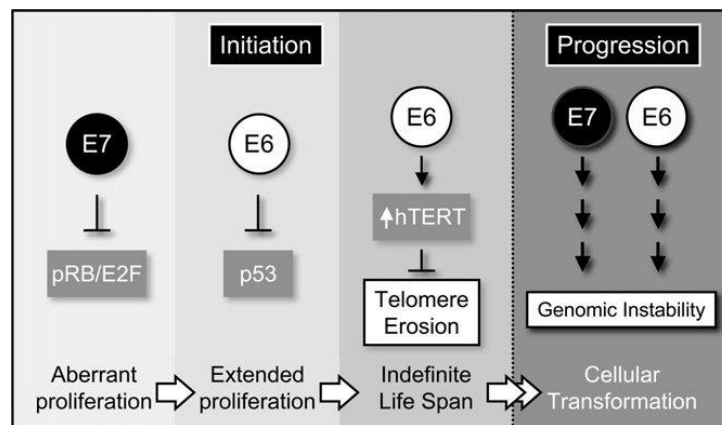


Figura 25. Ruolo delle oncoproteine E6 ed E7 nella carcinogenesi. (Fonte: McLaughlin-Drubin & Munger 2009b)

1.3.2.1 L'oncoproteina E7

La proteina E7 di HPV-16 è una fosfoproteina acida composta da 98 aa, strutturalmente e funzionalmente correlata ad altre oncoproteine virali, in particolare alla proteina E1A di Adenovirus (Ad) e all'antigene tumorale (TA_g) del Simian Virus 40 (SV40) (Munger *et al.*, 2001). All'interno della sequenza di questi antigeni sono state individuate tre regioni conservate note come CR1, CR2 e CR3. La proteina E7 di HPV-16 può essere suddivisa in tre domini corrispondenti, che consistono, rispettivamente, degli amminoacidi 1-15 (CR1), 16-37 (CR2) e 38-98 (CR3). L'omologia di sequenza tra E7 e E1A o TA_g è sorprendentemente estesa nelle regioni CR1 e CR2 e queste due regioni conservate contribuiscono significativamente all'attività trasformante dell'oncoproteina E7 degli hr-HPV (Phelps *et al.*, 1988).

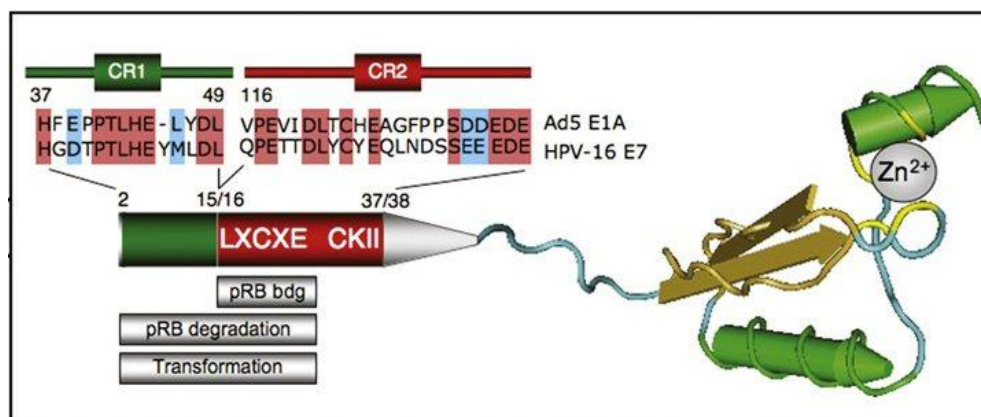


Figura 26. Rappresentazione della struttura della proteina E7 (a) e suoi domini (b). (Fonte: McLaughlin-Drubin & Munger, 2009a)

Il motivo conservato Leu-X-Cys-X-Glu (LXCXE) nel dominio CR2 è necessario e sufficiente per l'associazione della proteina E7 con la proteina del retinoblastoma pRB (Munger *et al.*, 1989b). Tale motivo lega una regione di pRB che giace tra gli aminoacidi 379 e 772 (Welch & Wang, 1995) e mutazioni nel motivo LXCXE determinano una perdita sostanziale dell'affinità per pRB (Heck *et al.*, 1992).

Adiacente al motivo LXCXE è presente un sito di fosforilazione ad opera della casein chinasi II (CK II) e anche l'estremità carbossi-terminale è fosforilata da una chinasi non ancora identificata (Fitzlaff *et al.*, 1989; Barbosa *et al.*, 1990; Massimi & Banks, 2000). Questa regione contribuisce in maniera importante all'attività trasformante di E7 (Helt & Galloway, 2001; Helt *et al.*, 2002) e contiene inoltre un dominio a dita di zinco composto da due motivi Cys-X-X-Cys (Barbosa *et al.*, 1989) che funziona da dominio di dimerizzazione (Ohlenschlager *et al.*, 2006). Tuttavia, non esistono evidenze convincenti che E7 esista come dimero in vivo e/o che la dimerizzazione è necessaria per l'attività biologica di E7 (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b). Anche la proteina E6 di HPV presenta due copie in tandem del motivo Cys-X-X-Cys con alta omologia di sequenza con l'estremità C-terminale di E7, indicando che E6 ed E7 potrebbero avere un precursore ancestrale comune (Cole & Danos, 1987). La struttura tridimensionale di E7 è stata ottenuta mediante risonanza magnetica nucleare e cristallografia a raggi X. Questi studi hanno rivelato che il dominio N-terminale non è foldato mentre il dominio C-terminale forma un unico ripiegamento legante zinco, strettamente impacchettato (Liu *et al.*, 2006; Ohlenschlager *et al.*, 2006).

La proteina E7 di HPV16 migra in gel SDS-PAGE con peso molecolare apparente di 17-20 KDa, mentre il peso reale è di circa 11 KDa; questa migrazione aberrante è mediata dal dominio CR1 ed è causata dall'alto contenuto di residui acidi (Armstrong & Roman, 1993). La proteina E7 di HPV16 è localizzata in gran parte nel citoplasma (Nguyen *et al.*, 2007), ma esiste anche nel nucleo (Smith-McCune *et al.*, 1999). Essa non contiene una tipica sequenza di localizzazione nucleare ed è trasportata attivamente nel nucleo attraverso recettori Ran-dipendenti (Angeline *et al.*, 2003). Inoltre è stata riportata una localizzazione nucleolare di E7 di HPV16 (Zatsepina *et al.*, 1997). Studi più recenti hanno mostrato che E7 contiene anche una sequenza di esportazione nucleare e può fare la spola tra il citoplasma e il nucleo (Knapp *et al.*, 2009).

L'emivita di E7 di HPV-16 è inferiore a 2 ore (Smotkin & Wettstein, 1987). E7 è degradata mediante un meccanismo proteosomale mediato da ubiquitina che coinvolge la coniugazione di ubiquitina all'estremità N-terminale di E7 (Reinstein *et al.*, 2000).

Mentre molte attività biologiche di E7 necessarie per il ciclo vitale virale devono ancora

essere delucidate, è ormai noto che l'abilità di E7 di HPV16 di far supportare la sintesi di DNA virale alle cellule dello strato soprabasale dipende dalla capacità di E7 di legare i membri della famiglia di pRB (Collins *et al.*, 2005). La proteina E7 si associa a pRB e alle proteine correlate chiamate "pocket proteins", p107 and p130, attraverso il motivo LXCXE presente in CR2 (Dyson *et al.*, 1992; Munger *et al.*, 1989b).

La funzione più studiata delle "pocket proteins" è l'abilità di regolare l'entrata nella fase G1/S della mitosi e la progressione mediante la modulazione dell'attività trascrizionale dei fattori di trascrizione E2F (Frolov & Dyson, 2004). Tali fattori sono eterodimeri che contengono le subunità E2F (E2F1-8) e DP (DP-1, DP-2) e sono regolatori critici dell'uscita dalla fase G1 e della progressione della fase S. Inoltre i fattori E2F controllano numerosi altri processi cellulari come il differenziamento, l'apoptosi e l'instabilità genomica. Il complesso costituito da pRB ed E2F agisce come repressore della trascrizione. In cellule normali, la distruzione di tale complesso avviene in seguito a fosforilazione di pRB ad opera delle chinasi ciclina-dipendenti (CDK4/6 e CDK2) in tarda fase G; la dissociazione di E2F agisce da attivatore trascrizionale dei geni necessari per l'entrata e la progressione in fase S (**figura 27**).

La proteina E7 degli hr-HPV si associa in maniera preferenziale alla pRB legata ad E2F e ne induce la degradazione proteosomale (Huh *et al.*, 2007). Questo causa la rottura del complesso pRB/E2F e quindi ad una incontrollata uscita dalla fase G1 ed entrata nella fase S. La proteina E7 di lr-HPV lega pRB con efficienza circa 10 volte inferiore a quella di E7 di hr-HPV (Gage *et al.*, 1990; Munger *et al.*, 1989b). Questa differenza di legame dipende da un singolo amminoacido (Asp 21 in E7 di HPV-16 contro Gly 22 in HPV-6) ed esperimenti di sostituzione amminoacidica in quella regione hanno indicato che proprio quell'amminoacido è il responsabile dell'affinità di legame di E7 a pRB e della capacità trasformante degli HPV mucosali (Heck *et al.*, 1992; Sang & Barbosa, 1992). Nel caso degli HPV cutanei, invece, la presenza dell'aspartato in quella posizione della proteina E7 e il legame con pRB non sono associati con una classificazione clinica ad alto rischio (Ciccolini *et al.*, 1994).

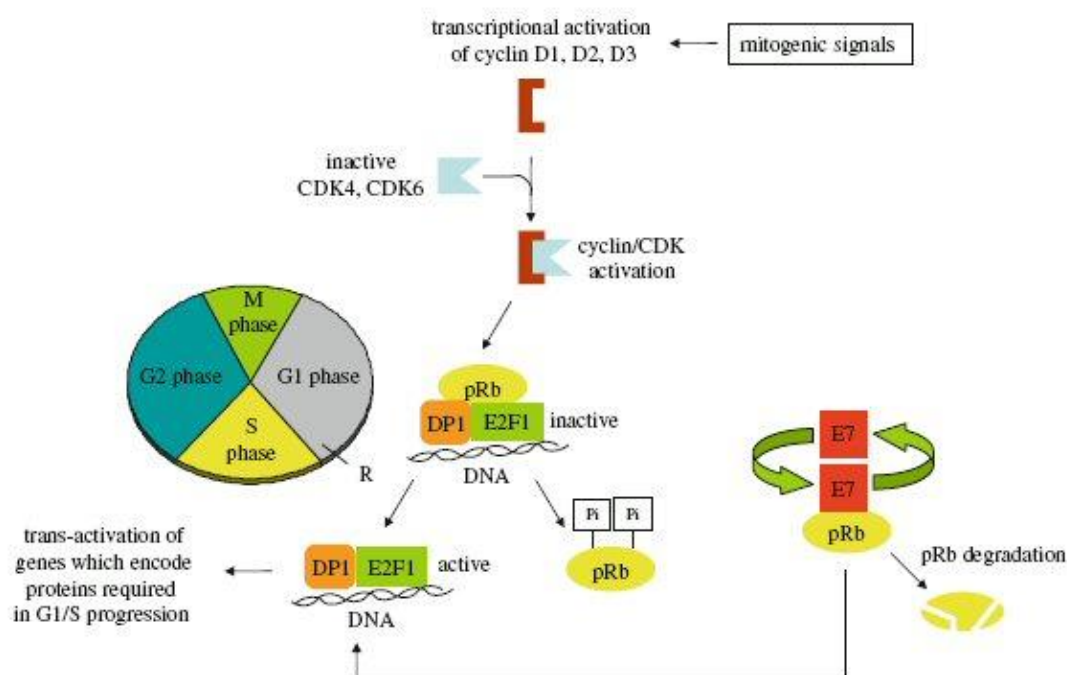


Figura 27. Interazione E7-pRB (Fonte: Ghittoni *et al.*, 2010).

La proteina E7 lega pRB e porta al rilascio del fattore di trascrizione E2F che promuove, di conseguenza, la progressione del ciclo cellulare anche in assenza di stimoli di crescita o in presenza di segnali inibitori

In aggiunta alla destabilizzazione di pRB, la proteina E7 presenta numerose altre funzioni (descritte nel dettaglio in Moody & Laimins, 2009). Essa contribuisce all'immortalizzazione attraverso l'interazione con proteine chiave che controllano la progressione del ciclo cellulare, come gli inibitori di chinasi dipendenti da ciclina (CDK), p21 e p27. L'estremità C-terminale di E7 degli hr-HPV lega p21 e p27, inattivandoli. In aggiunta E7 è in grado di influenzare l'assetto della cromatina mediante interazione con la proteina Mi2 β che fa parte del complesso di rimodellamento nucleare dell'istone deacetilasi (HDAC). La proteina E7, in cooperazione con E6 è in grado di creare instabilità genomica, ad esempio attraverso l'induzione di danni al DNA, l'incremento dell'integrazione del DNA virale nel genoma dell'ospite e l'attivazione della via ATM-ATR implicata nella riparazione dei danni al DNA. Inoltre la proteina E7 è in grado di legarsi a due componenti del fattore genico 3 stimolato dall'interferone, denominati IRF1 e p48 bloccando l'induzione dei geni responsivi all'INF- α , che non può, quindi, esercitare la propria azione antivirale contro HPV. E7 è anche in grado di allungare la capacità proliferativa delle cellule infettate mediante interazione con la proteina p600 associata a RB che funziona da ubiquitina ligasi. E' importante notare che essendo p600 una proteina citoplasmatica, E7 è in grado di legare fattori presenti sia nel nucleo che nel citoplasma. Tutte le principali attività di E7 sono schematizzate in **figura 28**.

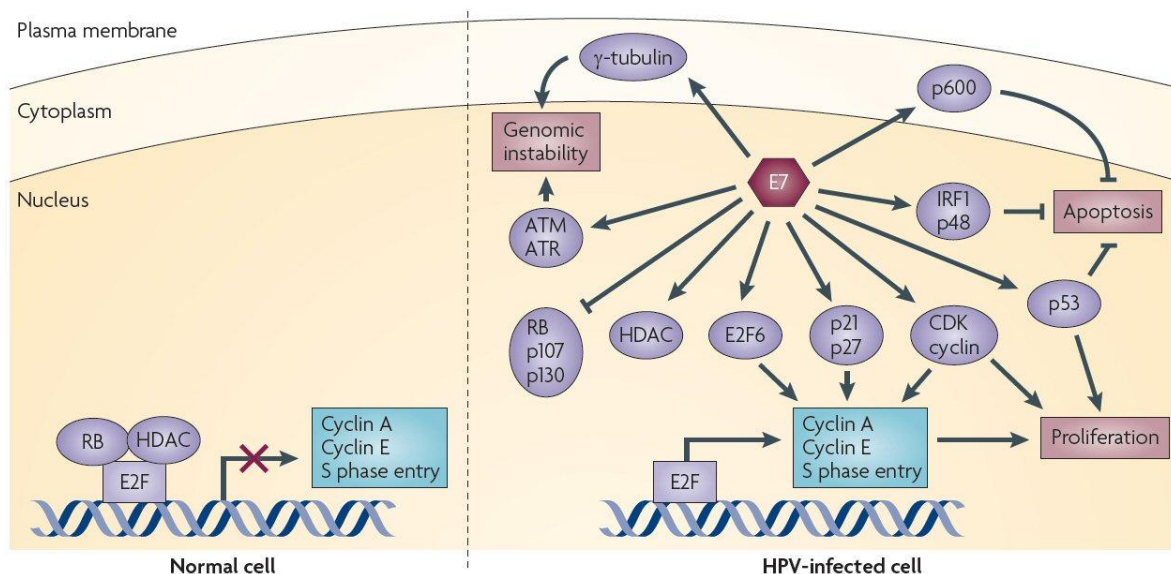


Figura 28. Principali interazioni/funzioni della proteina E7 degli hr-HPV (Fonte: Moody & Laimins, 2009)

1.3.3 STATO DELL'ARTE DEI VACCINI CONTRO HPV

1.3.3.1 Vaccini preventivi contro HPV

La strategia corrente nei vaccini preventivi contro HPV prevede l'impiego delle proteine capsidiche L1 ed L2, in modo da indurre anticorpi in grado di neutralizzare e prevenire l'entrata di HPV nelle cellule. L'espressione di L1 ricombinante in vari tipi cellulari risulta nell'assemblaggio spontaneo di VLPs che sono simili ai virioni di HPV dal punto di vista morfologico ed immunologico. Recentemente sono stati commercializzati due vaccini preventivi: il Gardasil (Merck & Co, Inc) e il Cervarix (GlaxoSmithKline Biologicals).

Il Gardasil è un vaccino quadrivalente composto da VLP di L1 ricombinanti, prodotte in lievito, dei genotipi HPV-6, -11, -16 e -18 mentre il vaccino bivalente Cervarix è costituito da VLP di L1 ricombinanti, prodotte in cellule di insetto dei genotipi HPV-16 e -18. La FDA americana ha recentemente approvato l'uso del Gardasil anche per gli uomini, al fine di prevenire i carcinomi maschili associati ad HPV e le verruche genitali e di ridurre la trasmissione di HPV alle donne sane (sito web 11).

Il tasso di sieroconversione per il Cervarix e il Gardasil nelle donne è del 97.5% o maggiore (Block *et al.*, 2006; Garland *et al.*, 2007; Paavonen *et al.*, 2007; Reisinger *et al.*, 2007). Tuttavia, la risposta anticorpale generata è ristretta al genotipo di HPV contenuto nel vaccino, sebbene una piccola cross-protezione si ottiene contro i genotipi strettamente correlati (Harper *et al.*, 2006). Studi in corso mostrano che la protezione contro l'infezione da HPV è ancora attiva dopo più di 6.4 anni dalla vaccinazione con le VLP di L1 di HPV-16 and HPV-18, con qualche cross-protezione contro i genotipi correlati HPV-

45 e -31 (Lin *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2010). Uno studio clinico recente ha dimostrato la sicurezza, l'immunogenicità e l'efficacia del vaccino quadrivalente in donne di età compresa tra 24 e 25 anni (Munoz *et al.*, 2009).

Sebbene tali vaccini siano altamente efficaci nel proteggere dalle infezioni da HPV che possono progredire a carcinoma, è stato stimato che la riduzione del tasso di incidenza del carcinoma cervicale sarà visibile solo fra circa 20 anni, a causa dell'alta prevalenza nella popolazione e al lento processo della carcinogenesi (Lin *et al.*, 2010). Inoltre, i vaccini presenti in commercio sono costosi, vengono somministrati mediante iniezione intramuscolare e richiedono refrigerazione per la conservazione. Queste caratteristiche rendono complicata la vaccinazione di massa nei paesi in via di sviluppo, in cui l'incidenza di carcinoma cervicale è più alta (Parkin, 2006). Risulta pertanto necessario sviluppare vaccini profilattici di seconda generazione che proteggano contro un più ampio spettro di genotipi di HPV, abbiano costi ridotti, siano termostabili e quindi non necessitino della catena del freddo e siano somministrati in singola dose senza la necessità di impiegare siringhe.

Approcci promettenti per la riduzione dei costi dei vaccini profilattici basati sulla proteina L1 potrebbero essere rappresentati dalla produzione delle VLP di L1 in sistemi di espressione alternativi alle cellule di insetto e di lievito (usate attualmente per la produzione dei vaccini commerciali) come le piante o sistemi derivati da essi (Giorgi *et al.*, 2010), che verranno descritti nel sottoparagrafo 1.3.7.3.1, oppure la produzione di capsomeri di L1 in *E. coli*, che si sono dimostrati efficaci nell'induzione di anticorpi in modelli animali (Li *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000). I capsomeri di L1 sono stabili a temperatura ambiente e potrebbero essere somministrati per via transdermica (Rechtsteiner *et al.*, 2005) o per inalazione nasale (Nardelli-Haeffliger *et al.*, 2005).

Per garantire una protezione contro un numero maggiore di genotipi di HPV, potrebbe essere impiegata nella formulazione vaccinale la proteina L2 che è altamente conservata nei vari HPV e quindi è in grado di garantire una cross-protezione nei confronti di molti genotipi. Tuttavia, L2 è meno immunogenica di L1 e porta quindi a titoli anticorpali neutralizzanti inferiori a quelli ottenuti con L1. Questo problema potrebbe essere superato dall'uso di forti adiuvanti e l'agonista dei "Toll-like receptor 2" rappresenta un promettente candidato (Alphs *et al.*, 2008). Infine, un metodo alternativo per aumentare lo spettro di protezione dei vaccini profilattici è rappresentato dall'uso di VLP di L1 da diversi tipi di HPV; ad esempio la Merck sta testando in fase clinica II un vaccino nonoivalente, V503 (sito web 12).

1.3.3.2 Vaccini terapeutici contro HPV

Le considerazioni fatte nel precedente paragrafo evidenziano quanto vi sia necessità di sviluppare un vaccino terapeutico piuttosto che preventivo. Questa necessità è soprattutto dettata dal fatto che nel mondo c'è un'alta prevalenza di infezioni da HPV già esistenti, sulle quali i vaccini preventivi non hanno effetto (Hildesheim *et al.*, 2007; Markowitz *et al.*, 2007). A differenza dei vaccini preventivi, i vaccini terapeutici devono essere in grado di indurre risposte cellulo-mediate contro antigeni di HPV espressi durante l'infezione.

Gli antigeni E6 ed E7 rappresentano i candidati ottimali per lo sviluppo di tali vaccini, in quanto sono essenziali per l'induzione ed il mantenimento dello stato trasformato e sono costitutivamente espressi nelle cellule infettate da HPV, nelle lesioni precancerose e nei tumori, ma non nelle cellule sane. Queste oncoproteine contengono delle regioni antigeniche che sono presentate dal complesso MHC e la loro immunogenicità è stata dimostrata in modelli animali e nell'uomo (Kanodia *et al.*, 2008).

Tuttavia, un vaccino ideale contro i carcinomi associati ad HPV deve superare i problemi causati dal fatto che il virus crea un ambiente immunosoppressivo e di conseguenza le risposte immunitarie contro di esso sono generalmente inefficienti. Un vaccino terapeutico contro il cancro dovrebbe essere in grado di stimolare un traffico di cellule T effettrici, superando l'immunosoppressione e generando un'inflammatione acuta al sito tumorale. Queste richieste potrebbero essere soddisfatte dal legame dell'antigene tumore-specifico impiegato per la vaccinazione con molecole in grado di aumentarne la visibilità al sistema immunitario o con altre strategie che presentino l'antigene direttamente alle cellule immunocompetenti (Giorgi *et al.*, 2010).

Sono stati sviluppati numerosi vaccini terapeutici sperimentali basati sui geni E6 ed E7 che comprendono principalmente vaccini basati su vettori vivi, su cellule dendritiche, vaccini a DNA e vaccini peptidici e proteici. Molti di essi si trovano in "trial" clinico e sono descritti nel dettaglio in recenti lavori (Cid-Arregui, 2009; Lin *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2010). Di seguito sono riportati i principali esempi di "trial" clinico di ciascuna delle principali categorie vaccinali terapeutiche basati sull'antigene E7, ponendo particolare attenzione ai vaccini a subunità proteici, in quanto maggiore campo d'interesse di questa tesi di dottorato.

Nell'ambito dei vaccini basati su vettori vivi, è attualmente in corso uno studio clinico del vaccino basato sul batterio *Listeria* esprimente E7 di HPV-16 (Lovaxin C) in donne con carcinoma cervicale in stadio avanzato (Lowry, 2008) e recentemente è stato dimostrato che una formulazione vaccinale basata su questa tecnologia in pazienti con carcinoma cervicale allo stadio terminale è sicura e ben tollerata (Maciag *et al.*, 2009). Studi clinici

di fase I/II hanno dimostrato che l'impiego di virus vaccinia ricombinanti esprimenti la proteina di fusione E6-E7 di HPV-16 e -18 (TA-HPV), porta all'induzione di una forte risposta immunitaria sia di tipo umorale che cellulo-mediato, in pazienti con CIN III e carcinoma cervicale (Borysiewicz *et al.*, 1996; Kaufmann *et al.*, 2002) e numerose altre formulazioni saggiate in modelli preclinici mostrano risultati promettenti (Lin *et al.*, 2010). Anche i vaccini basati sulle cellule dendritiche (DC) risultano molto efficienti nel trattamento delle lesioni associate ad HPV, ma richiedono molto tempo nella preparazione e hanno costi alti. In studi in fase clinica, DC autologhe, caricate con l'antigene E7 di HPV-16 o -18, sono state somministrate in donne con cancro cervicale causato da HPV-16 o -18, rispettivamente. Una risposta cellulo-mediata specifica contro E7 è stata riscontrata in 4 degli 11 pazienti (Ferrara *et al.*, 2003). Uno studio simile di DC caricate con E7 di HPV-16 o -18 ha mostrato una risposta E7-specifica di tipo CD4⁺ in 2 pazienti su 4 e di tipo CD8⁺ in tutti e 4 i pazienti (Santin *et al.*, 2006). Attualmente è in corso uno studio su pazienti con carcinoma cervicale ricorrente causato da HPV-16 con un vaccino basato su DC caricate con E7 di HPV-16 (sito web 13).

Un'altra tipologia vaccinale ampiamente utilizzata è rappresentata dai vaccini a DNA. Attualmente è in fase clinica I un vaccino a DNA contenente i geni E6 ed E7 di HPV-16 e -18, somministrato per via intramuscolare ed elettroporazione in pazienti con CIN II/III (Best *et al.*, 2009). Altri studi in fase clinica su pazienti con CIN II/III che si basano su un vaccino a DNA, chiamato ZYC-101, contenente le sequenze codificanti per epitopi immunogenici di E7 di HPV-16, o su un vaccino a DNA basato sul gene E7 mutagenizzato e fuso alla HSP70 di *M. tuberculosis*, mostrano risposte cellulari specifiche contro E7 (Sheets *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2004; Trimble *et al.*, 2009). Anche nel nostro laboratorio sono stati elaborati vaccini a DNA terapeutici basati sull'antigene E7; in particolare sono state preparate formulazioni vaccinali basate sul gene E7 mutagenizzato (E7GGG) e sulla fusione di E7GGG con la CP del PVX. Il vaccino genetico basato sul gene di fusione E7GGG-CP è in grado di inibire con più efficacia la crescita del tumore in modello pre-clinico rispetto al gene E7GGG da solo ed è in grado di generare risposte immunitarie sia di tipo umorale che cellulo-mediato (Massa *et al.*, 2008).

Nel caso dei vaccini peptidici, il problema di trovare un unico epitopo immunogenico che vada bene per tutti (a causa della natura polimorfica delle molecole del complesso MHC) sembra essere superato dall'uso di lunghi peptidi che contengono diversi epitopi di E6 ed E7. Studi preclinici in topi (Vambutas *et al.*, 2005) e conigli (Zwaveling *et al.*, 2002) condotti con tali peptidi mostrano che essi sono efficaci nell'indurre risposte di cellule T antigene-specifiche. Diversi vaccini peptidici basati su E7 hanno mostrato di essere ben

tollerati in studi clinici di fase I e II (Steller *et al.*, 1998; van Driel *et al.*, 1999; Rensing *et al.*, 2000; Muderspach *et al.*, 2000). Recentemente, Kenter e colleghi hanno condotto uno studio in fase I in pazienti allo stadio terminale di carcinoma cervicale con un lungo peptide che comprende epitopi di E6 ed E7 di HPV-16 e l'adiuvante Montanide ISA-51, ottenendo una risposta T cellulare specifica per E6 (Kenter *et al.*, 2008). Una vaccinazione simile condotta su 6 pazienti con carcinoma cervicale indotto da HPV-16 ha mostrato l'induzione di una risposta immunitaria di tipo CD4⁺ e CD8⁺ E6-specifica in tutte le pazienti ed E7-specifica in 5 pazienti su 6 (Welters *et al.*, 2008). Attualmente è in fase di valutazione lo studio condotto in fase II con vaccino peptidico basato sul lungo peptide comprendente epitopi di E6 ed E7 di HPV-16 in pazienti con carcinoma cervicale in stadio avanzato e metastatico (sito web 14).

Nel caso dei vaccini proteici, il maggiore interesse è incentrato nello sviluppo di strategie che permettano di stimolare le risposte cellulo-mediate (ricordiamo che a causa della loro somministrazione esogena, i vaccini proteici sono presentati mediante la via che coinvolge il complesso MHC di classe II e ciò genera una risposta anticorpale piuttosto che una risposta cellulo-mediata) (Lin *et al.*, 2010). Ad esempio, gli adiuvanti “liposome-polycationic-DNA” (LPD) (Cui & Huang, 2005) e l' ISCOMATRIX basato sulla saponina (Stewart *et al.*, 2004) hanno la capacità di promuovere il processamento endogeno e quindi l'espressione dell'antigene con il complesso MHC I. In aggiunta, la fusione di antigeni di HPV con molecole che sono in grado di renderle più visibili alle APC, può incrementarne l'“uptake” e quindi la presentazione in associazione al complesso MHC I, portando quindi ad un aumento della risposta CD8⁺. Alcuni esempi includono la fusione di E7 di HPV-16 con l'adenilato-ciclastasi di *Bordetella pertussis* che interagisce con i recettori integrina delle DC (Preville *et al.*, 2005) e la fusione di E7 di HPV-16 con un dominio dell'esotossina A di *Pseudomonas*, che facilita la traslocazione della proteina per la presentazione in associazione al complesso MHC I (Liao *et al.*, 2005b). Un'altra importante molecola immunostimolatoria in grado di incrementare la risposta CTL è l'HSP70 di *Mycobacteria* (Chu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2008).

Diversi vaccini proteici contro HPV sono stati impiegati in studi clinici. Ad esempio, il vaccino denominato PD-E7 creato dalla fusione della proteina E7 mutagenizzata di HPV-16 con un frammento della proteina D di *Haemophilus influenzae*, sviluppato in una formulazione contenente il Monofosforil lipide A, l'adiuvante QS-21 basato sulla saponina e un'emulsione di olio in acqua (adiuvante AS02B, GlaxoSmithKline), ha mostrato l'induzione di una risposta di tipo CD8⁺ E7-specifica in pazienti con lesioni CIN 1 o CIN 3 (Hallez *et al.*, 2004). Un vaccino costituito da una proteina di fusione di E6 ed

E7 di HPV-16 con l'adiuvante ISCOMATRIX ha mostrato la generazione di risposte CD8+ specifiche per E6 ed E7 (Frazer *et al.*, 2004). In aggiunta, una proteina di fusione costituita da E7 di HPV-16 e la HSP65 di *M. bovis* usata come vaccino in pazienti con lesioni CIN 3, ha mostrato una risposta patologica completa in 13 di 58 pazienti e incompleta (una regressione della lesione maggiore del 50% in dimensioni) in 32 di 58 pazienti (Einstein *et al.*, 2007). Recentemente, la Nventa Biopharmaceuticals ha investito su questo vaccino, potenziandolo con l'uso dell'adiuvante Poly-ICLC e testandolo in fase I (sito web 15).

Oltre ai vaccini terapeutici proteici appena descritti, sono stati formulati e saggiati in studi clinici vaccini combinati terapeutici/profilattici che comprendono epitopi provenienti dalle proteine virali (L1 o L2) e dalle oncoproteine (E6 e/o E7). Questi vaccini dovrebbero essere in grado sia di stimolare risposte anticorpali virus neutralizzanti e quindi funzionare da vaccini preventivi, sia di elicitare risposte cellulo-mediate contro le oncoproteine e quindi funzionare da vaccini terapeutici, nel caso in cui l'infezione da HPV sia già presente.

Ad esempio, una proteina di fusione composta dalle proteine L2 ed E7 di HPV-6 (TA-GW) è stata saggiata su 42 uomini sani (Thompson *et al.*, 1999) e 27 pazienti con verruche genitali (Lacey *et al.*, 1999). Questo vaccino è stato ben tollerato dai pazienti ed è stato in grado di generare una risposta cellulo-mediata in 19 pazienti e la scomparsa delle verruche genitali in 5 pazienti. Un altro vaccino proteico denominato TA-CIN, costituito dalla fusione degli antigeni L2, E6 ed E7 di HPV-16, è stato saggiato su 40 pazienti sani, mostrando l'induzione di risposte anticorpali contro L2 in tutti i pazienti e di risposte cellulo-mediate contro le proteine E6 ed E7 in 8 degli 11 pazienti che hanno ricevuto la dose vaccinale più alta (de Jong *et al.*, 2002).

1.3.3.3 Vaccini in pianta contro HPV

1.3.3.3.1 Vaccini profilattici prodotti in pianta

Nel caso dei vaccini profilattici contro HPV sono state prodotte numerose formulazioni in pianta basate sulla proteina capsidica L1.

Nel 2003 sono stati pubblicati, quasi simultaneamente, tre lavori riguardo la produzione di VLP di L1 in pianta e della loro immunogenicità in modello preclinico: Varsani e colleghi hanno ottenuto VLP di L1 di HPV-16 in tabacco transgenico, in grado di generare una risposta immunitaria, sebbene debole, quando iniettata in conigli in presenza dell'adiuvante di Freund incompleto (FIA) (Varsani *et al.*, 2003); il secondo lavoro, riporta l'ottenimento di VLP di L1 di HPV-11 in patata transgenica e l'induzione di una

debole risposta immunitaria, in seguito alla somministrazione orale in topi di materiale non concentrato (Warzecha *et al.*, 2003); infine, il terzo lavoro riporta la produzione di VLP di L1 di HPV-16 con i codoni ottimizzati per l'espressione in pianta, in patata e tabacco transgenici. Tale ottimizzazione ha permesso di incrementare notevolmente i livelli di espressione di L1 rispetto ai precedenti lavori, tuttavia, in seguito a somministrazione orale del materiale vegetale in un modello murino, anche in questo caso la risposta immunitaria riportata è stata bassa (Biemelt *et al.*, 2003). Successivamente, la proteina L1 di HPV-16 è stata prodotta in pianta transientemente, mediante un vettore basato sul TMV, ottenendo livelli di espressione più alti di quelli ottenuti in transgenico (Varsani *et al.*, 2006). Una prova importante dell'efficacia dei vaccini prodotti in pianta contro i papillomavirus è stata fornita da due lavori sul papillomavirus che infetta i conigli ("Cottontail Rabbit Papilloma Virus", CRPV). Nel primo caso viene mostrato come i conigli sono completamente o parzialmente protetti contro l'infezione da CRPV, in seguito a immunizzazione parenterale con particelle di TMV purificate che espongono peptidi di proteina L2 alla loro superficie (Palmer *et al.*, 2006). Il secondo lavoro mostra invece una protezione completa contro CRPV in seguito a somministrazione intramuscolare, in presenza dell'adiuvante FIA, di estratti di pianta concentrati derivanti da tabacco transgenico o infettato con il TMV ricombinante, esprimenti la proteina L1 di CRPV (Kohl *et al.*, 2006).

Altri lavori mostrano che VLP o capsomeri di L1 di HPV possono essere prodotti in pianta mediante trasformazione stabile o transiente, ad alte concentrazioni, circa 10-20 mg/kg tessuto fresco, che tuttavia rappresentano lo 0.5% delle TSP e quindi non sono sufficienti ad avviare una produzione commerciale (Cardi *et al.*, 2010; Giorgi *et al.*, 2010). Recentemente Rybicki e colleghi, mediante strategie di ottimizzazione dei codoni, di tecnologie di espressione e compartimentalizzazione, sono riusciti ad ottenere livelli di espressione di proteina L1 di HPV-16 notevolmente alti (17 % delle TSP, nella versione plastidiale, 15 % di TSP nella versione citoplasmatica) (Maclean *et al.*, 2007). E' stato osservato un apprezzabile accumulo di VLP e i topi immunizzati per via parenterale con gli estratti vegetali concentrati, senza l'impiego di adiuvanti, hanno mostrato l'induzione di alti titoli anticorpali neutralizzanti, comparabili a quelli ottenuti con le VLP prodotte in cellule di insetto del vaccino commerciale. Questo lavoro rappresenta la migliore evidenza che la produzione del vaccino profilattico contro HPV può essere avviata in pianta, rappresentando una valida alternativa a basso costo ai vaccini commerciali attuali. Altri gruppi di ricerca si sono focalizzati sulla produzione del vaccino profilattico contro HPV nel cloroplasto di pianta, ottenendo alte rese di proteina L1, in un caso del 24%

delle TSP, con formazione di VLP altamente immunogeniche (Fernández-San Millán *et al.*, 2008).

Come già accennato, in aggiunta all'abbattimento dei costi, il miglioramento dei vaccini profilattici contro HPV, rispetto a quelli attualmente in commercio, può essere ottenuto anche mediante la formulazione di un vaccino che sia cross-protettivo contro molti tipi di HPV e non solo contro quelli presenti nella formulazione vaccinale stessa. Ciò può essere ottenuto attraverso il coinvolgimento della proteina L2 di HPV, che mostra proprio queste caratteristiche (Slupetzky *et al.*, 2007; Jagu *et al.*, 2009). La proteina L2 è stata prodotta con successo in pianta mediante sistemi transienti o transgenici (Pereira *et al.*, 2009) e lo sviluppo di vaccini profilattici di seconda generazione contro HPV prevede la produzione di chimere costituite dalle proteine L1 ed L2 in pianta, con alcuni risultati preliminari incoraggianti (Whitehead M, Hitzeroth I, Rybicki EP, dati non pubblicati).

1.3.3.3.2 Vaccini terapeutici prodotti in pianta

Rispetto ai vaccini profilattici, i vaccini terapeutici contro HPV prodotti in pianta sono rappresentati da un numero minore di lavori in letteratura. La prima dimostrazione della possibilità dell'impiego delle piante per la produzione di questa tipologia di vaccini risale al 2002, quando nel nostro gruppo di ricerca è stata espressa transientemente l'oncoproteina E7 di HPV-16 in tabacco (Franconi *et al.*, 2002). In seguito ad immunizzazione di topi con l'estratto vegetale contenente E7 è stata riportata una risposta immunitaria sia di tipo umorale che cellulo-mediata E7-specifica. Inoltre, l'attività antitumorale del vaccino è stata valutata dopo sfida con una linea cellulare tumorale esprime la proteina E7 di HPV-16, mostrando una riduzione della crescita tumorale e una protezione totale dallo sviluppo del tumore nel 40% degli animali, la stessa ottenuta con la proteina E7 purificata da *E. coli* in presenza dell'adiuvante QuilA. Questi dati mostrano che l'estratto vegetale possiede intrinseche proprietà adiuvanti (spiegate più avanti).

L'attività antitumorale di questa formulazione vaccinale è stata in seguito migliorata, mediante l'incremento della quantità di proteina E7 nell'estratto vegetale, ottenuta grazie alla veicolazione della proteina nella via secretoria (Franconi *et al.*, 2006). A 50 giorni dalla sfida con la linea cellulare tumorale, l'80 % dei topi immunizzati con tale estratto non mostrava la presenza di tumore. In seguito ad immunizzazione orale di topi con il materiale vegetale liofilizzato esprime E7, sono stati riportati alti titoli anticorpali contro E7, suggerendo la possibilità dell'impiego di questa formulazione in vaccinazioni orali (Franconi *et al.*, dati non pubblicati).

Inoltre, come già accennato in precedenza, le proprietà adiuvanti dell'estratto ed un possibile impiego dell'estratto contenente E7 nell'immunoterapia delle lesioni associate ad HPV, sono state investigate mediante l'uso di DC umane derivanti da pazienti sani (Di Bonito *et al.*, 2009). L'estratto non si è mostrato tossico per queste cellule, non influenza l'"uptake" di E7 nelle cellule, non affligge la differenziazione delle DC, ma ne induce la maturazione. Di maggiore importanza, l'estratto contenente E7 è in grado di indurre linfociti naïve a produrre una risposta T cellulare specifica contro E7.

In un altro studio, mediante l'uso di un vettore virale di seconda generazione basato sul TMV, la proteina E7 mutagenizzata fusa alla lichenasi ingegnerizzata di *Clostridium thermocellum*, già impiegata in altri studi come "carrier" per la produzione di molecole ricombinanti in pianta (Musiychuk *et al.*, 2007), è stata espressa transientemente in tabacco con alte rese (1 mg/g tessuto fresco). L'immunizzazione di topi con la proteina di fusione purificata ha portato all'induzione di IgG e di risposte T citotossiche specifiche contro E7 e alla protezione del 100% degli animali in seguito a sfida con le cellule tumorali (Massa *et al.*, 2007). In aggiunta, la vaccinazione terapeutica di topi con questo antigene previene la crescita tumorale nel caso di tumori già stabilizzati (Venuti *et al.*, 2009). Questo antigene è stato espresso anche in colture di radici aeree di tabacco, mediante l'uso dello stesso vettore virale usato per la pianta intera (Massa *et al.*, 2009). I risultati incoraggianti ottenuti con la formulazione basata sulla proteina di fusione LicKM-E7GGG, aprono la strada alla possibilità di saggiare questo antigene in studi di fase clinica I. La produzione dell'antigene in colture di radici, grazie al maggiore contenimento e all'adattabilità delle procedure di GMP, potrebbe inoltre rappresentare una piattaforma di espressione migliore rispetto alla pianta intera.

Un altro gruppo di ricerca, riporta la produzione di una forma inattiva della proteina E7 di HPV-16 ad alti livelli in *N. benthamiana* mediante agroinfiltrazione, fusa ad un peptide derivato da zeina (Zera®, Era Biotech, Barcellona), che promuove l'aggregazione ed il sequestro delle proteine accoppiate in un corpo proteico circondato da membrana del RE. Risultati preliminari indicano che l'immunizzazione di topi con questa formulazione purificata da pianta li protegge quando sfidati con cellule tumorali esprimenti E7 e causa una regressione di tumori stabilizzati (Whitehead M *et al.*, dati non pubblicati).

Recentemente, è stata riportata l'espressione della proteina E7 di HPV-16 da sola o fusa alla CP del PVX nei cloroplasti di tabacco (Morgenfeld *et al.*, 2009). Sebbene i livelli di espressione per la proteina di fusione non siano elevati nel cloroplasto (0.5% delle TSP), l'impiego della CP aiuta a stabilizzare la proteina E7 e ad incrementarne i livelli di espressione rispetto alla proteina da sola (0.1% delle TSP).

Cerovská e colleghi hanno recentemente riportato la produzione di un epitopo di L2 e di un epitopo di E7, fusi rispettivamente, all’N-terminale e al C-terminale della CP del virus A della patata (PVA) (Cerovská *et al.*, 2008). Tale costrutto è stato espresso in pianta mediante l’uso di un vettore virale di seconda generazione basato sul PVX. In un altro studio, è riportata l’espressione in pomodoro transgenico della proteina di fusione costituita dalla proteina L1 di HPV-16 e da una fila di tre epitopi di E7 ed uno di E6, noti nel mediare l’attività CTL (Paz De la Rosa *et al.*, 2009). Tale proteina di fusione è in grado di assemblare in VLP, ma il livello di espressione non è molto alto. L’immunizzazione intraperitoneale di topi con le VLP, ha mostrato l’induzione sia di anticorpi neutralizzanti, sia di attività cellulo-mediata contro E6 ed E7.

Come già detto, i benefici della vaccinazione profilattica saranno visibili solo fra molti anni e i vaccini preventivi non hanno effetti terapeutici sulle donne che presentano già infezione da HPV. Perciò l’uso combinato di vaccini profilattici e terapeutici potrebbero superare alcuni limiti della vaccinazione profilattica ed in particolare essere efficaci in pazienti con infezione e/o lesioni pre-cancerose.

2. SCOPO DELLA TESI

Nel presente lavoro di dottorato si è scelto di impiegare le piante e le microalghe come biofabbrica per la produzione di antigeni dei virus umani SARS-CoV e HPV, importanti per la realizzazione di saggi diagnostici e per lo sviluppo di nuovi vaccini efficaci. Inoltre le piante sono state considerate anche come sorgente di molecole in grado di potenziare le risposte immunitarie associate alla somministrazione di vaccini a subunità per la terapia dei tumori associati all'infezione da HPV.

La scelta di utilizzare le piante come biofabbrica per la produzione di antigeni virali è scaturita innanzitutto dalla possibilità di ottenere delle proteine con elevata autenticità strutturale, un aspetto importante per proteine complesse che presentano modificazioni post-traduzionali. Inoltre, rispetto ad altri sistemi di espressione, le piante rappresentano delle piattaforme sicure per la produzione di vaccini per l'uomo (non presentando patogeni umani noti). La produzione in pianta è vantaggiosa anche in termini economici ed utilizzando tecnologie di espressione transiente è possibile ottenere grandi quantità di biomassa esprimente l'antigene di interesse in tempi rapidi.

In questo lavoro sono state impiegate piante di *N. benthamiana* (piante modello che consentono di accumulare rapidamente biomassa) per la produzione transiente della nucleoproteina N e della glicoproteina M del SARS-CoV e dell'oncoproteina E7 di HPV-16.

La proteina N del SARS-CoV era stata già espressa in precedenza nel nostro laboratorio in piante di *N. benthamiana* mediante l'uso di un vettore per l'espressione transiente derivante dal PVX (pPVX201). L'intento di questo lavoro è stato quello di caratterizzare questo antigene al fine di realizzare principalmente saggi diagnostici della SARS sensibili, specifici e a basso costo.

Numerosi lavori riportano infatti l'uso di questo antigene prodotto in sistemi eterologhi come *E. coli*, cellule di lievito o di insetto per l'allestimento di saggi sierologici diagnostici della SARS. Anticorpi contro questa proteina sono predominanti nei sieri dei pazienti infetti e possono essere rivelati precocemente (Leung *et al.*, 2004). La produzione di questa proteina prodotta in forma ricombinante a basso costo da impiegare in saggi diagnostici rappresenta quindi uno sviluppo molto attraente. Tuttavia, è stato osservato che la proteina N prodotta in batterio produce falsi positivi, probabilmente a causa dell'interferenza con antigeni batterici che non siano stati completamente allontanati nei processi di purificazione (Leung *et al.*, 2006; Yip *et al.*, 2007). È interessante quindi esprimere tale proteina in forma ricombinante in un sistema vegetale, in modo da

sviluppare un antigene con una autenticità strutturale maggiore. Inoltre, la provenienza dal mondo vegetale dovrebbe scongiurare la presenza nei sieri umani di anticorpi cross-reattivi che potrebbero generare falsi positivi nella diagnosi, aprendo la possibilità di impiegare materiale vegetale parzialmente processato e permettendo quindi un ulteriore abbattimento dei costi.

Il nostro obiettivo è stato quello di caratterizzare l'espressione della proteina N in pianta verificando la stabilità del virus ricombinante, la stabilità della proteina, quantificandone le rese e verificando la sua antigenicità. La verifica della qualità antigenica è stata effettuata con sieri umani, in quanto si dispone di sieri di pazienti affetti da SARS della prima epidemia verificatasi ad Hong-Kong nel 2003.

Oltre all'impiego in saggi sierologici, la proteina N da noi ottenuta in pianta è un antigene che potrebbe essere utilizzato per lo sviluppo di vaccini sicuri contro un virus altamente patogenico come il SARS-CoV. Infatti, attualmente non esistono in commercio vaccini per la prevenzione dell'infezione da SARS-CoV ma sono state elaborate diverse formulazioni vaccinali sperimentali, basate principalmente su vaccini a subunità (VLP, peptidici/proteici e genetici, Roper & Rehm, 2009) in quanto i vaccini basati sul virus inattivato non sono completamente sicuri per l'uso clinico. Le piante non solo permetterebbero la produzione sicura degli antigeni del SARS-CoV, ma offrendo anche la possibilità della somministrazione orale, consentirebbero di stimolare l'immunità mucosale, un aspetto importante in quanto il SARS-CoV penetra nell'organismo attraverso le mucose respiratorie e gastrointestinali (Lau & Peiris, 2005).

Parallelamente a quanto appena descritto, l'altro obiettivo di questo lavoro sperimentale è stato quello di esprimere la glicoproteina transmembranaria M del SARS-CoV in pianta, una proteina difficile da produrre in diversi sistemi eterologhi e per questo meno caratterizzata di altri antigeni della SARS. La disponibilità della proteina M ricombinante consentirebbe una migliore valutazione del suo possibile impiego nella diagnosi e nello sviluppo di vaccini contro il SARS-CoV. Durante la preparazione della tesi di laurea della sottoscritta era stata già provata l'espressione della proteina in pianta mediante PVX, ma i livelli di espressione erano piuttosto bassi e non riproducibili. Si è scelto quindi di esprimere in forma transiente la proteina mediante la tecnologia dell'agroinfiltrazione, utilizzando il vettore binario pBI121. Un'attraente caratteristica di questa tecnologia è che *A. tumefaciens* è altamente efficiente nel veicolare il gene di interesse nella cellula vegetale e l'ottenimento di materiale vegetale esprimente la proteina corrispondente può essere ottenuta nel giro di pochi giorni a seguito della infiltrazione manuale o sotto-vuoto di piante intere con la sospensione batterica ricombinante.

La stessa tecnologia è stata scelta per l'espressione dell'oncoproteina E7 di HPV-16. Come già descritto nell'introduzione, nel nostro laboratorio sono stati sviluppati diversi vaccini terapeutici basati tale proteina espressa in pianta, potenzialmente utilizzabili contro le lesioni associate ad HPV. I risultati ottenuti con le diverse formulazioni saggiare in modello pre-clinico ci hanno mostrato che aumentando i livelli di espressione della proteina E7, e quindi la dose di antigene nel vaccino, si riescono a formulare vaccini più potenti in grado cioè di indurre una risposta immunitaria più efficace. Inizialmente era stato ottenuto un incremento dei livelli di espressione mediante la compartimentalizzazione della proteina nell'apoplasto fogliare, grazie all'uso di una sequenza segnale vegetale (PGIPss) (Franconi *et al.*, 2006). Tuttavia la quantità di proteina espressa non era sufficiente per permettere la purificazione. Successivamente i livelli di espressione erano stati notevolmente incrementati (permettendo la purificazione della proteina) non solo mediante compartimentalizzazione, ma anche mediante la fusione di E7 (nella forma mutagenizzata E7GGG, che non è più oncogenica) con un enzima batterico ingegnerizzato molto stabile (LicKM) e grazie all'impiego di una tecnologia basata sull'agroinfiltrazione delle piante con un vettore virale di seconda generazione (Massa *et al.*, 2007).

In questa parte del lavoro di dottorato si è cercato di incrementare i livelli di espressione in pianta della proteina E7 non fusa a "carrier", con l'intento principale di purificare la proteina per poterne studiare le proprietà biochimiche. Si è scelto quindi di esprimere la proteina E7 nella forma secretoria PGIPss-E7, che aveva già mostrato livelli di accumulo superiori alla proteina E7 nella versione citoplasmatica.

Oltre alle piante come biofabbrica, questo lavoro di dottorato ha previsto l'impiego della microalga fotosintetica *Chlamydomonas reinhardtii* per la produzione della proteina E7 di HPV-16.

Il "molecular farming" basato su questo organismo è un campo promettente e in rapida espansione. Come già discusso in introduzione, l'espressione di antigeni vaccinali in microalghe fotosintetiche risulta molto vantaggiosa in termini di contenimento del transgene (*C. reinhardtii* può crescere in condizioni di sterilità in fotobioreattori), migliore adattabilità alle procedure GMP richieste per la produzione del vaccino e possibilità di somministrare l'antigene vaccinale oralmente sotto forma di biomassa microalgale non processata o parzialmente processata. Infatti, essendo *C. reinhardtii* un organismo unicellulare, tutte le cellule derivanti da un clone trasformato hanno uguali dimensioni e accumulano la stessa quantità di proteina. Inoltre *Chlamydomonas*, come le altre microalghe appartenenti alla classe *Chlorophyceae*, è stata definita GRAS, ovvero

potenzialmente edibile.

Si è scelto in primo luogo di esprimere la proteina E7 nella forma mutagenizzata E7GGG mediante trasformazione nucleare, in quanto tale tecnologia ed i relativi vettori erano già disponibili. In particolare, si è scelto di produrre la proteina E7GGG in maniera costitutiva o inducibile, fusa all’N-terminale ad un “tag” di istidine (His₆-E7GGG), anche per proteggere questa estremità che nella proteina E7 è instabile ed è soggetta ad ubiquitinazione e quindi degradazione (Reinstein *et al.*, 2000).

In seguito abbiamo deciso di sviluppare e mettere a punto la tecnologia della trasformazione plastidiale per aumentare le probabilità di selezionare con successo trasformanti che esprimessero la proteina E7GGG ad elevati livelli. *C. reinhardtii* presenta un unico grande cloroplasto, che occupa approssimativamente il 40% del volume cellulare, contenente circa 80 copie di genoma. Queste caratteristiche rendono la trasformazione di questo organello molto più semplice rispetto alla trasformazione del cloroplasto nelle piante superiori. Inoltre, i tempi per l’ottenimento di linee trasformanti omoplasmiche sono notevolmente ridotti (circa 4-6 settimane). Ad oggi, numerosi lavori riportano l’espressione di molecole terapeutiche nel cloroplasto di *C. reinhardtii*, con rese fino al 5% delle TSP (Specht *et al.*, 2010). Sebbene tali rese siano notevolmente inferiori a quelle ottenute nelle piante superiori, questa piattaforma di produzione è molto recente, per cui diverse strategie migliorative potranno essere apportate in futuro.

Nell’ultima parte del lavoro, le piante sono state considerate sotto un’altra prospettiva e cioè come una sorgente di molecole immunostimolatorie, da impiegare per il potenziamento delle formulazioni vaccinali contro le lesioni associate ad HPV, in fusione all’antigene E7 di HPV-16. Tra le numerose proteine di origine vegetale che presentano un potenziale immunostimolante elevato si è scelto di impiegare le “Ribosome Inactivating Proteins” (RIP), enzimi ad attività N-glicosidasi coinvolte nella difesa della pianta contro i patogeni e gli organismi invasori (Stirpe, 2004). La capacità delle RIP di inattivare cataliticamente i ribosomi è attualmente sfruttata in medicina, ad esempio per la terapia dei tumori (Stirpe, 2004; Hartley & Lord 2004; Ng *et al.* 2010). Infatti, l’efficacia citotossica delle RIP può essere sfruttata per l’eliminazione di cellule tumorali mediante l’ottenimento di immunotossine, molecole ibride in cui le RIP sono coniugate a ligandi capaci di veicularle sugli specifici bersagli cellulari.

Quello che si propone nel presente lavoro è un nuovo uso delle RIP, che trae vantaggio da altre caratteristiche che questa classe di molecole presenta, estremamente interessanti per la formulazione di vaccini per la terapia dei tumori. Alcune RIP presentano infatti la capacità di modulare risposte immunitarie aspecifiche stimolando un ambiente pro-

infiammatorio e di indurre apoptosi (Ng *et al.*, 2010; Sikriwal *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009). Inoltre è stato osservato che alcune RIP sono altamente immunogeniche (Castelletti *et al.*, 2004; Frankel *et al.*, 2004) e potrebbero essere quindi in grado di stimolare l'immunità cellulo-mediata antigene-specifica quando usate in fusione con l'antigene di interesse. In aggiunta, la formulazione di un vaccino terapeutico contro i tumori ad eziologia virale potrebbero trarre vantaggio dalle proprietà antivirali contro virus umani dimostrate per alcune RIP di tipo 1 (Foa'-Tomasini *et al.*, 1982; Stirpe, 2004). Infine, l'impiego di molecole di origine vegetale, scongiura il pericolo di eventuali reazioni auto-immuni a seguito di vaccinazioni.

Abbiamo deciso quindi di impiegare la saporina apoplastica fogliare di *Saponaria officinalis* in quanto, oltre a condividere le principali caratteristiche delle RIP, è quella che presenta una tossicità aspecifica molto bassa (Ferrerias *et al.*, 1993) ed essendo una RIP di tipo 1 manca della porzione lectinica in grado di legare le cellule, risultando meno tossica delle RIP di tipo 2.

Proprio perché il nostro intento non è quello di sfruttare la tossicità della saporina abbiamo scelto di usare il doppio mutante E₁₇₆>K, R₁₇₉>Q, denominato SAPKQ, mutagenizzato in due posizioni nel sito catalitico, che risulta non tossico sia *in vitro* sia *in vivo* (Pittaluga *et al.* 2005; Zarovni *et al.*, 2007; Marshall *et al.*, 2010) e fuso alla proteina E7 (E7GGG).

Il nostro obiettivo è stato quello di esprimere le fusioni costituite da E7GGG e la SAPKQ in *E. coli* (per verificarne in primo luogo l'espressione e per avere dei controlli per l'espressione in pianta) e in piante di *N. benthamiana*, mediante la tecnologia basata sul PVX, al fine di sviluppare vaccini a subunità proteici. Inoltre, abbiamo scelto di utilizzare le stesse fusioni per realizzare costrutti per la vaccinazione genetica (la cui espressione è stata verificata in cellule di mammifero in coltura), utilizzati in un modello pre-clinico di vaccinazione terapeutica a DNA al fine di ottenere una prima valutazione dell'efficacia della saporina sul potenziamento delle risposte immunitarie. Tale valutazione è stata possibile in quanto si dispone di un animale modello in grado di sviluppare tumore in seguito ad iniezione di cellule tumorali murine esprimente l'oncoproteina E7 (TC-1*). La disponibilità del modello animale e le conoscenze acquisite negli anni su HPV ci hanno spinto all'impiego della SAPKQ come nuova molecola 'carrier' principalmente per incrementare l'antigenicità della formulazione vaccinale terapeutica basata sulla proteina E7 di HPV-16, ma l'uso di questa molecola potrà essere applicato in futuro anche ad altre patologie.

3. MATERIALI E METODI

Materiali

3.1 REAGENTI DI BASE

TAE 50X. Composizione per litro: Tris-base 242 g, acido acetico glaciale 57 ml, 0.5 M EDTA pH 8.0 100 ml, H₂Odd.

PBS 10X. Composizione per litro: Na₂HPO₄ x 12H₂O 30 g, NaH₂PO₄ x H₂O 2.56 g, NaCl 88 g, H₂Odd, pH 7.2.

PBST PBS 1X, 0.1% Tween 20.

PBST-NaCl. PBS 1X, 0.1% Tween 20, NaCl 1 M.

MPBS. PBS 1X contenente 2% w/v (MPBS 2%) o 5% w/v (MPBS 5%) di latte in polvere a basso contenuto di grassi.

“RUNNING BUFFER” 10X (per SDS-PAGE). Composizione per litro: glicina 72 g, Tris-base 15 g, SDS 5 g, H₂Odd, pH 8.3.

“TRANSFER BUFFER” 10X (per SDS-PAGE). Composizione per litro: glicina 144 g, Tris Base 30.3 g, H₂Odd, metanolo 20%, pH 8.3.

“GEL LOADING BUFFER” PER DNA 5X. Glicerolo 6%, blu di bromofenolo 0.02% ed SDS 0.02%.

“GEL LOADING BUFFER” PER PROTEINE 5X. Glicerolo 10%, Tris-HCl 0.06M pH 6.8, blu di bromofenolo 0.025%, SDS 2% e β-mercaptoetanol 3%.

3.2 TERRENI DI COLTURA

Terreni per *Escherichia coli*

LB (Luria-Bertani): Impiegato per la crescita ed il mantenimento. Composizione per litro: 10 g bacto-triptone, 5 g estratto di lievito, 5 g NaCl, H₂Odd, pH 7.2. Per il terreno solido sono stati aggiunti 15 g/l di agar.

NZY+ : Impiegato per la selezione dei cloni trasformati con il plasmide pBS-apoSAP all'atto della mutagenesi del gene apoSAP.

Composizione per litro: NZ amina (idrolisato di caseina) 10 g, estratto di lievito 5 g, NaCl 5 g, H₂Odd, pH 7.5. Autoclavare. Prima dell'uso vengono aggiunti: 12.5 ml di MgCl₂ 1 M e 12.5 ml di MgSO₄ 1 M, 10 ml di glucosio 2 M filtrato 0.22 µm, o 20 ml di glucosio 20% (w/v). Sterilizzare per filtrazione.

Terreni per *Agrobacterium tumefaciens*

YEB: Impiegato per la crescita ed il mantenimento. Composizione per litro: estratto di carne 5 g, estratto di lievito 1g, peptone 5 g, saccarosio 5 g, 2 mM MgSO₄, H₂Odd. Per il

terreno solido sono stati aggiunti 15 g/l di agar.

MMA: Impiegato per l'induzione dei geni *vir* di *A. tumefaciens* prima dell'agro-infiltrazione, con l'aggiunta di acetosiringone 20 μ M. Composizione per litro: 4.33 g di sali Murashige & Skoog, acido 2-(*N*-morpholino) etansulfonico (MES) 10 mM pH 5.6, saccarosio 20 g, H₂Odd.

SOB: Impiegato per la preparazione del SOC MEDIUM. Composizione per litro: triptone 20 g, estratto di lievito 5 g, NaCl 0.5 g, H₂Odd.

SOC: Impiegato per risospendere le cellule batteriche dopo l'elettroporazione. Composizione per 100 ml: glucosio 20% (w/v) filtrato 2 ml, portare a volume con SOB. Da preparare immediatamente prima dell'uso.

Terreni per cellule di mammifero

DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium") con L-Glutamina, senza sodio piruvato. Terreno provvisto di sali minerali e vitamine, impiegato per la crescita ed il mantenimento della linea cellulare di mammifero HEK-293. Siero fetale bovino (FBS) 10% e gentamicina 500 μ g/ml sono aggiunti prima dell'uso.

Terreni per *Chlamydomonas reinhardtii*

TAP HUTNER: Impiegato per la crescita ed il mantenimento. Composizione per litro: Tris-base 2.42 g, Beijerincks 2x 50 ml, tampone fosfato 1 M pH 7 1 ml, Soluzione trace 1 ml, acido acetico glaciale 1 ml. Per il terreno solido sono stati aggiunti 10 g/l di agar (agar plant cell culture tested, SIGMA).

BEIJERINKS 2X (per la preparazione del terreno TAP Hutner). Composizione per litro: NH₄Cl 8 g, CaCl₂ x 2H₂O 1 g, MgSO₄ x 7H₂O 2g, H₂Odd.

TAMPONE FOSFATO 1 M pH 7.0 (per la preparazione del terreno TAP Hutner). Composizione per litro: K₂HPO₄ 1 M 60 ml, KH₂PO₄ 1 M 40 ml, H₂Odd.

SOLUZIONE TRACE (per la preparazione del terreno TAP Hutner). Composizione per litro: EDTA 50 g, ZnSO₄ x 7H₂O 22 g, H₃BO₃ 11.4 g, MnCl₂ x 4H₂O 5.06 g, FeSO₄ x 7H₂O 4.99 g, CoCl₂ x 6H₂O 1.61 g, CuSO₄ x 5H₂O 1.57 g, (NH₄)₆Mo₇O₂ x 4H₂O 1.10 g, H₂Odd. Prima dell'utilizzo, questa soluzione deve essere mantenuta al buio per 7 giorni.

TAP ENEA2: Impiegato per l'induzione del promotore inducibile *cyc*₆ nei trasformanti nucleari ottenuti con il costrutto pSL18-*cyc*₆-His₆-E7GGG.

Questo terreno ha la composizione del TAP Hutner ma con le seguenti differenze:

-la SOLUZIONE TRACE contiene anche 0.3 μ M Cu

-sono aggiunti 850 μ l di NaCl 200 mM per 1 litro di terreno.

3.3 CEPPI E LINEE CELLULARI

Ceppi di *Escherichia coli*

Per la trasformazione con i costrutti a DNA è stato utilizzato il ceppo *XL1 blue*: (*K12Δ lac-pro*) *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *gyrA46*, *thi-1*, *relA1*, *lac⁻ F'* [*proAB⁺*, *lacIq*, *lac ZΔM15*, *Tn10 (tetR)*]. Tale ceppo manca dei geni per le endonucleasi di restrizione (*End A⁻*) ed è difettivo nella ricombinazione (*Rec A⁻*) pertanto risulta poco probabile che il costrutto plasmide-inserto, una volta introdotto nella cellula ospite, sia degradato o subisca alterazioni causate da eventi di ricombinazione omologa; inoltre consente l'effettuazione della selezione cromatica bianco/blu (descritta nel paragrafo 3.4.1)

Ceppi di *Agrobacterium tumefaciens*

I ceppi di laboratorio di *A. tumefaciens* possiedono un plasmide T helper modificato in cui la regione del T-DNA contenente i geni che causano la proliferazione del tessuto vegetale infettato (tumore del colletto) è stata deleta. Sono invece conservati i geni della virulenza *vir* necessari al trasferimento del T-DNA nella cellula vegetale, per cui trasformando questi ceppi di *A. tumefaciens* con un opportuno vettore binario contenente il T-DNA, i geni *vir* del plasmide T helper agiscono *in-trans* rimuovendo il T-DNA dal vettore binario e trasferendolo alla cellula vegetale.

Per tale lavoro sperimentale sono stati utilizzati i seguenti ceppi:

GV3101: (pMP90RK, Gm^R Kan^R Rif^R) è provvisto di plasmide “helper” di tipo MP90 (a nopalina).

C58C1: (pAtC58, pTiC58, Kan^R Rif^R) è provvisto di due plasmidi, pAtC58 per il metabolismo e la difesa ed il pTiC58, per la virulenza (a nopalina e agrocinopine).

Linea cellulare HEK 293 (“Human Embryo Kidney”)

Linea permanente di cellule umane aderenti al substrato descritte per la prima volta nel 1977, generata mediante trasformazione con Adenovirus 5 di una popolazione di cellule di derivazione neuronale rinvenuta in colture cellulari embrionali di rene. Tale linea è utilizzata per la produzione di adenovirus, vettori virali e proteine umane ricombinanti glicosilate (Graham *et al.*, 1977). Le condizioni di mantenimento richieste sono le seguenti: temperatura 37°C, CO₂ 5%, umidità relativa 95%. Per la propagazione del monostrato ancorato alla fiasca di coltura è richiesta la tripsinizzazione (Trypsin lyophilised, Gibco).

Ceppi di *Chlamydomonas reinhardtii*

CW15: ceppo privo o con piccoli residui di parete con “background” genetico selvatico
UVM4, UVM11: ceppi ottenuti dal gruppo di Ralph Bock (Max-Planck-Institute,

Potsdam-Golm, Germania) mediante mutagenesi indotta da raggi UV del ceppo Elow47 (Neupert *et al.*, 2009). Il ceppo Elow47 è stato ottenuto dopo co-transformazione del ceppo cw15 difettivo per l'arginina (arg-) con i plasmidi pCRY1-1 e pCB412 recanti rispettivamente il gene per la resistenza all'emetina e il gene ARG7.

3.4 PLASMIDI

3.4.1 pBlueScript SK+

Il vettore di clonaggio pBlueScript SK(+) (pBS, Stratagene) (**figura 29**), è un fagemide di 2958 paia di basi (pb), derivato da pUC19. Contiene l'origine di replicazione sia di *E. coli* sia del fago filamentoso f1 e il gene di resistenza all'ampicillina. Il secondo marcatore selezionabile consiste in una porzione del gene lacZ (*lacZ* α) che, introdotto in cellule ospiti contenenti la porzione mancante di tale gene (come ad esempio il ceppo *XL1 blue* di *E. coli*), dà luogo alla formazione di una β -galattosidasi funzionale. L'aggiunta di isopropil- β -D-tiogalattoside (IPTG), induce l'espressione dell'enzima e quindi l'idrolisi del substrato incolore 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galattoside (X-Gal) aggiunto al mezzo di coltura, convertendolo in un composto blu insolubile. Il sito di clonaggio multiplo (MCS) del vettore pBS è parte integrante del gene *lacZ* α , quindi l'inserimento in esso di un gene estraneo determina l'interruzione del gene e la conseguente produzione di una β -galattosidasi incapace di idrolizzare il cromogeno X-Gal. I cloni trasformati con il plasmide ricombinante e quelli contenenti il vettore 'scarico' saranno, pertanto, distinguibili risultando incolore i primi e blu i secondi (sistema di selezione mediante alfa-complementazione). L'MCS è fiancheggiato dai promotori T3 e T7, per la trascrizione *in vitro* del gene clonato ed il suo sequenziamento.

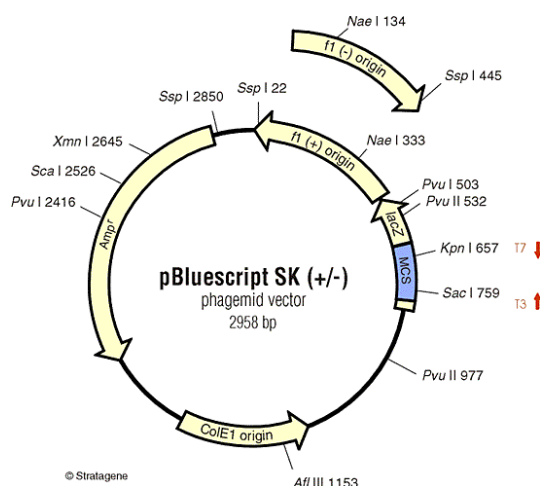


Figura 29. Mappa del vettore di clonaggio pBlueScript SK(+).

Col E1: origine di replicazione batterica; **f1 origin:** origine di replicazione del fago f1 **Amp^r:** gene per la resistenza all'ampicillina; **PT5:** promotore del fago T5; **Lac Z:** gene codificante per la β -galattosidasi; **MCS:** "multiple cloning site", sito multiplo di clonaggio.

3.4.2 pQE-30

Il pQE-30 è un vettore d'espressione di 3400 pb, utilizzato per la produzione di proteine ricombinanti, fuse all'N-terminale ad un "tag" di sei istidine (His₆-tag), in cellule di *E. coli*. La presenza di questo "tag" permette l'identificazione, mediante l'utilizzo di anticorpi anti-His₆ commerciali e il recupero, mediante interazioni con una matrice di Ni-NTA (descritta nel paragrafo 3.9.8), delle proteine d'interesse. Il sito di clonaggio multiplo (MCS) è sotto il controllo della regione promotore/operatore costituita dal promotore del fago T5 e da due sequenze operatore derivanti dall'operone del lattosio (lacO). Il vettore contiene l'origine di replicazione batterica (Col E1) e un gene che codifica per il carattere di resistenza all'ampicillina. E' presente inoltre un sito specifico legante il ribosoma (RBS) subito a valle del sito operatore (**figura 30**).

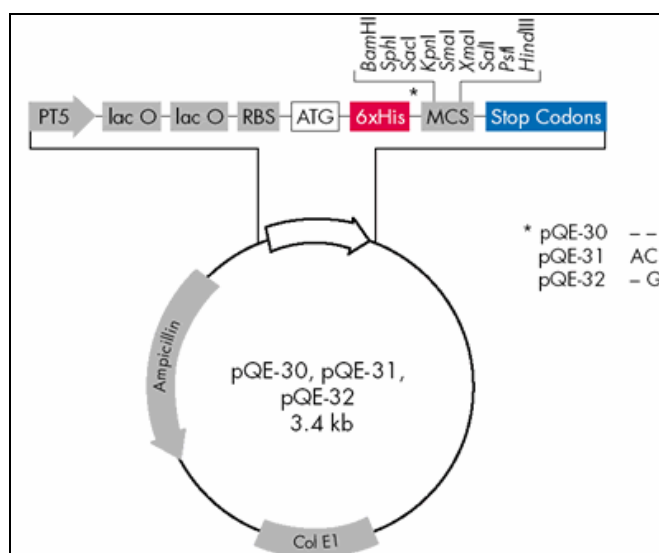


Figura 30. Mappa del vettore d'espressione pQE-30.

Col E1: origine di replicazione batterica; **Ampicillin:** gene per la resistenza all'ampicillina; **PT5:** promotore del fago T5; **Lac O:** operatore lac; **RBS:** "ribosome binding site", sito di legame al ribosoma; **6xHis:** coda di sei istidine, **MCS:** "multiple cloning site", sito multiplo di clonaggio.

3.4.3 pVAX1

Il vettore pVAX1 (**figura 31**) è stato disegnato specificamente per l'utilizzo nello sviluppo di vaccini a DNA. E' un plasmide di 3000 pb specifico per l'espressione ad alti livelli di proteine ricombinanti in cellule di mammifero. Tale vettore contiene, infatti, una sequenza promotrice derivante dal citomegalovirus (CMV), che favorisce alti livelli d'espressione delle proteine d'interesse in molte linee cellulari di mammifero, il segnale di poliadenilazione dell'ormone bovino della crescita (BGH), per un'efficiente trascrizione, terminazione e poliadenilazione dell'mRNA. E' inoltre presente l'origine di replicazione di *E. coli* (pUC ori). Il gene di resistenza alla kanamicina consente la selezione ed il mantenimento dei cloni trasformati di *E. coli* e delle linee cellulari di

mammifero stabilmente trasformate. E' presente un sito multiplo di clonaggio per l'inserzione delle sequenze di interesse.

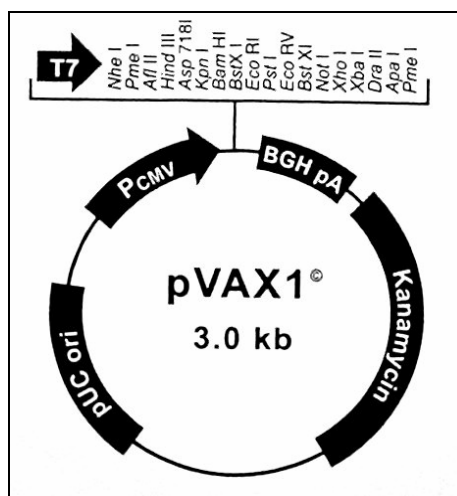


Figura 31. Mappa del vettore d'espressione eucariotico pVAX1 (Invitrogen).

pUC ori: origine di replicazione di *E. coli* per un alto numero di copie plasmidiche; **PCMV:** promotore del citomegalovirus umano; **BGH pA:** segnale di poliadenilazione dell'ormone di crescita bovino.

3.4.4 pPVX201

Il plasmide pPVX201 (**figura 32**) è un vettore d'espressione virale di 9880 pb contenente il cDNA, derivante dal genoma a RNA, del virus X della patata (Potato Virus X, PVX) (descritto nel sottoparagrafo 1.1.2.2.2.1), posto sotto il controllo del promotore costitutivo 35S del Virus del Mosaico del Cavolfiore ("Cauliflower Mosaic Virus", CaMV) e seguito della sequenza di terminazione del gene per la nopalina sintasi dell'*Agrobacterium tumefaciens* (NOS ter). Nel plasmide pPVX201, il cDNA è stato ottenuto dall'intero genoma del PVX; esso contiene quindi il gene codificante per la replicasi virale (RdRp), i geni del triplo blocco (M1, M2 e M3) codificanti per le proteine di movimento virali ed il gene per la proteina di rivestimento (CP). Questo vettore è costruito in modo da permettere l'inserimento del gene d'interesse, grazie alla presenza dei siti di restrizione *ClaI* e *SallI*, sotto il controllo trascrizionale del promotore subgenomico (CPP), duplicazione di quello che controlla la trascrizione della CP virale.

Il vettore pPVX201 è stato ideato per l'espressione transiente di proteine ricombinanti in piante suscettibili ad infezione da parte del virus PVX. Nel plasmide è presente anche l'origine di replicazione di *E. coli* e il gene per la resistenza all'ampicillina posto sotto il controllo di un promotore procariotico, per la propagazione e la selezione dei trasformanti (non mostrati in figura).

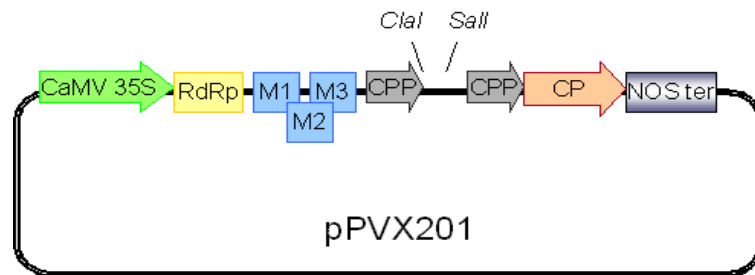


Figura 32. Mappa del vettore pPVX 201.

CaMV 35S: promotore derivante dal virus del mosaico del cavolfiore (CaMV); **NOS ter:** terminatore della trascrizione derivante dal gene della nopalina sintasi dell'*Agrobacterium tumefaciens*; **RdRp:** gene della replicasi virale; **M1-3:** geni che codificano per proteine responsabili del movimento del virus da una cellula all'altra; **CP:** gene per la proteina virale di rivestimento ("Coat Protein"); **CPP:** promotore del gene CP.

3.4.5 pBI-121

Il pBI-121 (Clontech Inc.) è un vettore binario di 12800 pb (**figura 33**). Esso contiene un inserto di T-DNA (caratteristico del plasmide T dei ceppi naturali di *A. tumefaciens*) disarmato, ovvero la regione infettiva del T-DNA che induce tumore nella pianta, è stata sostituita da una regione di interesse. Quest'ultima è compresa tra il "left border" (LB) ed il "right border" (RB) del gene NOS e contiene il gene della neomicina fosfotransferasi (*NPTII*) per la resistenza alla kanamicina, sotto il controllo del promotore e del terminatore della NOS e il gene reporter della β -glucuronidasi (*GUS*) di *E. coli* controllato dal promotore costitutivo del CaMV35S e dal terminatore NOS. Il gene *GUS* può essere rimpiazzato dal gene che si vuole esprimere in pianta mediante la presenza di siti unici di clonaggio *XbaI*, *BamHI* e *SalI*.

La regione esterna al T-DNA contiene le origini di replicazione di *E. coli* e *A. tumefaciens* ed il gene per la resistenza alla kanamicina sotto il controllo di promotore e terminatore procariotici (non mostrati in figura).

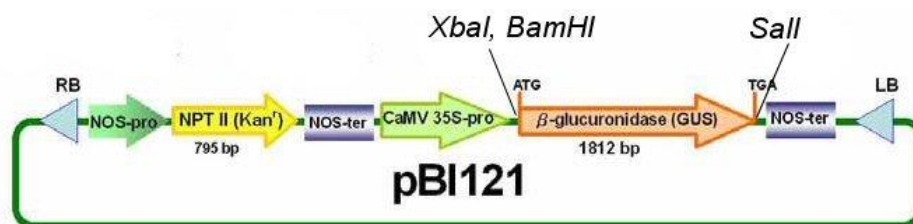


Figura 33. Mappa del vettore pBI121

CaMV 35S-pro: promotore derivante dal virus del mosaico del cavolfiore (CaMV); **NOS ter:** terminatore della trascrizione derivante dal gene della nopalina sintasi; **NPTII:** gene per la resistenza alla kanamicina, **RB:** right border; **LB:** left border.

A livello pratico, i clonaggi dei geni di interesse sono stati eseguiti a partire dal pBI-B9 che deriva dalla sostituzione del gene *GUS* del pBI121 con il gene codificante l'anticorpo ricombinante single chain B9 diretto contro i tospovirus fuso alla sequenza segnale della

proteina inibitrice delle poligalatturonasi di fagiolo PGIP (Franconi *et al.*, 1999).

3.4.6 pSL18-psaD-cRLuc

Il plasmide pSL18-psaD (S. Lemaire & J.D Rochaix, dati non pubblicati) è un vettore che permette l'integrazione di geni di interesse nel genoma nucleare di *C. reinhardtii* e la loro espressione sotto il controllo del promotore costitutivo forte del gene psaD che codifica per la proteina D del fotosistema I. Esso contiene la cassetta di espressione, costituita dal promotore + 5'UTR e dal terminatore + 3'UTR del gene psaD (psaD prom + 5'UTR e psaD ter + 3'UTR, rispettivamente), fiancheggiati un sito multiplo di clonaggio (MCS) e la cassetta di resistenza contenente il gene *AphVIII*, che conferisce resistenza alla paramomicina, per la selezione dei trasformanti.

Il clonaggio del gene di interesse è stato eseguito a partire dal vettore pSL18-psaD-cRLuc (7058 pb) (Ferrante *et al.*, 2008), che deriva dal vettore pSL18-psaD e presenta tra il promotore ed il terminatore, il gene sintetico codificante per la luciferasi di *Renilla reniformis* (cRLuc) e a monte di esso, diversi siti di restrizione (**figura 34**).

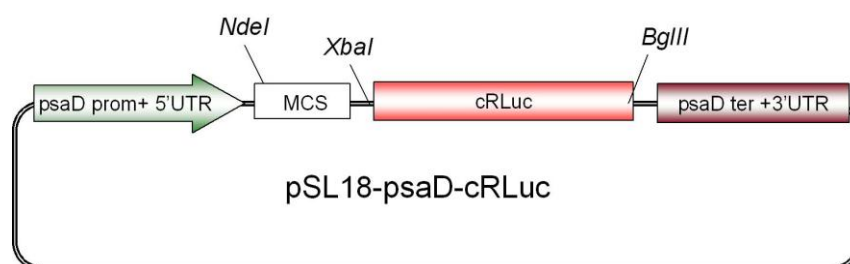


Figura 34. Mappa del vettore pSL18-psaD-cRLuc.

psaD prom + 5'UTR: promotore e 5' UTR del gene psaD; **MCS:** sito multiplo di clonaggio; **cRLuc:** gene sintetico codificante per la luciferasi di *Renilla reniformis*; **psaD ter + 3'UTR:** terminatore e 3'UTR del gene psaD.

Le restanti regioni del vettore contengono la cassetta di resistenza per la paramomicina, per la selezione dei trasformanti di *Chlamydomonas*, gli elementi per la replicazione in *E. coli* e il gene per la resistenza all'ampicillina, per la selezione dei trasformanti di *E. coli*

3.4.7 pSL18-cyc₆

Il plasmide pSL18-cyc₆ (**figura 35**) è un vettore di 6266 pb che permette l'integrazione di geni di interesse nel genoma nucleare di *C. reinhardtii* e la loro espressione sotto il controllo del promotore inducibile da nichel del gene cyc₆ che codifica per la proteina del citocromo 6.

Tale vettore deriva da pSL18-psaD, mediante sostituzione del promotore costitutivo psaD e della sua 5' UTR, con il promotore inducibile cyc₆ + 5'UTR e mediante inserzione di un polylinker per il clonaggio dei geni di interesse tra il promotore ed il terminatore (Ferrante *et al.*, 2008).

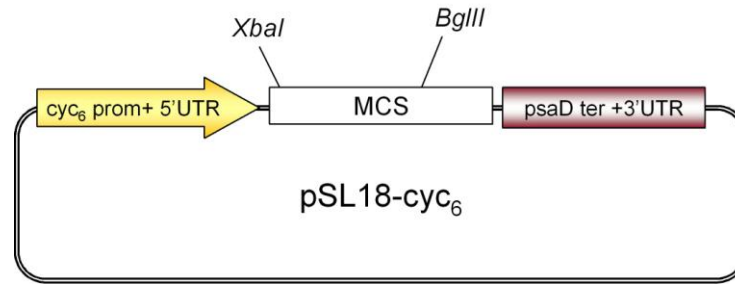


Figura 35. Mappa del vettore pSL18-cyc₆.

cyc₆ prom + 5'UTR: promotore e 5' UTR del gene cyc₆; **MCS:** sito multiplo di clonaggio; **psaD ter + 3'UTR:** terminatore e 3'UTR del gene psaD.

I vettori pSL18-psaD-cRLuc e pSL18-cyc₆ sono stati forniti dal Prof. Giovanni Giuliano dell'ENEA Casaccia di Roma.

3.4.8 pCG1

Il pCG1 è un plasmide di 8158 pb (**figura 36**) che ci è stato fornito dal Prof. Jean David Rochaix dell'Università di Ginevra.

Esso si compone di elementi per la propagazione in *E. coli* (origine di replicazione, gene per la resistenza all'ampicillina, non mostrati in **figura 36**) e di elementi per l'espressione nel cloroplasto di *Chlamydomonas*. Questi ultimi comprendono le due regioni omologhe al genoma plastidiale di *C. reinhardtii*, che guidano la ricombinazione omologa (evidenziate con una riga rossa). Una di esse è l'introne del gene che codifica per l'apoproteina A1 del fotosistema I (psaA intron), mentre l'altra è costituita dai primi 300 nucleotidi della ORF 1995 che codifica per una proteina ipotetica non ancora identificata e dal gene che codifica per la subunità beta dell'ATP sintasi (atpB) con il relativo promotore (atpB prom).

E' inoltre presente il gene per la resistenza alla spectinomicina (aadA), per la selezione dei trasformanti plastidiali, controllato dal promotore del gene che codifica per la subunità alfa dell'ATP sintasi (atpA prom). Infine è presente un sito multiplo di clonaggio (MCS) dove può essere inserita una cassetta di espressione genica.

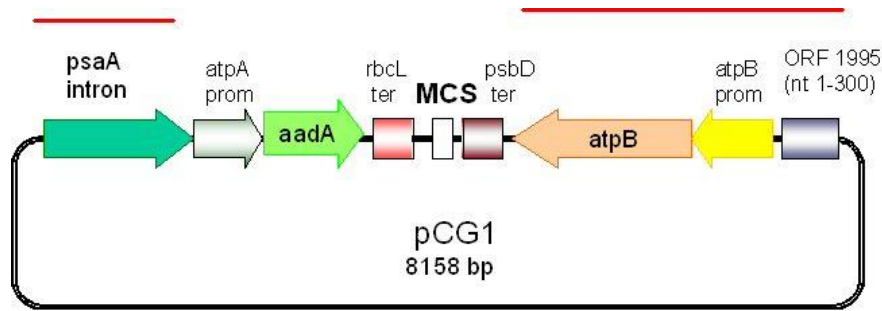
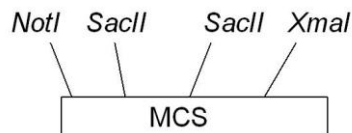


Figura 36. Mappa del vettore pCG1

psaA intron: introne del gene che codifica per l'apoproteina A1 del fotosistema I; **atpA prom:** promotore+ 5'UTR del gene che codifica per la subunità alfa dell'ATP sintasi; **aadA:** gene per la resistenza alla spectinomicina (aadA) di *Acinetobacter baylyi*; **rbcL ter:** terminatore del gene che codifica per la subunità maggiore della Rubisco; **MCS:** sito multiplo di clonaggio; **psbD ter:** terminatore + 3'UTR del gene che codifica per la proteina D1 del fotosistema II; **atpB:** gene che codifica per la subunità beta dell'ATP sintasi; **atpB prom:** promotore+ 5'UTR del gene atpB; **ORF 1995 (nt 1-300):** primi 300 nt della ORF 1995

Dettaglio del MCS di pCG1 con indicati i siti usati per il clonaggio della cassetta di espressione:



3.5 ANTIBIOTICI

Ampicillina: usata per la selezione e la crescita delle cellule di *E. coli* trasformate con i costrutti basati sui plasmidi pPVX201, pBS, pSL18-PsaD-cLuc, pSL18-cyc₆ e pCG1, alla concentrazione di 100 µg/ml in terreno liquido e solido

Kanamicina: usata per la selezione e la crescita delle cellule di *E. coli* e di *A. tumefaciens* trasformate con i costrutti basati sul plasmide pBI121, alla concentrazione di 25 µg/ml in terreno liquido e solido

Tetraciclina: usata per la preparazione delle cellule *XL1-blue* di *E. coli* competenti, alla concentrazione di 12.5 µg/ml in terreno liquido

Rifampicina: usata per la preparazione delle cellule di *A. tumefaciens* competenti, alla concentrazione di 50 µg/ml in terreno liquido

Gentamicina: usata per la crescita delle cellule di mammifero in coltura alla concentrazione di 500 µg/ml

Paramomicina: usata per la selezione e la crescita delle cellule di *C. reinhardtii* trasformate con i costrutti basati sul plasmide pSL18-PsaD-cLuc e pSL18-cyc₆ polylinker, alla concentrazione di 10 µg/ml in terreno solido

Spectinomicina: usata per la selezione e la crescita delle cellule di *C. reinhardtii* trasformate con i costrutti basati sul plasmide pCG1, alla concentrazione di 20 µg/ml in terreno liquido e 100 µg/ml in terreno solido

3.6 OLIGONUCLEOTIDI

Gli oligonucleotidi universali *T3* e *T7* sono stati utilizzati per sequenziare o verificare la presenza degli inserti genici nel vettore pBlueScript SK(+).

T3: 5' ATTAACCCCTCACTAAAG 3'

T7: 3' GATATCACTCAGCATAA 5'

Gli oligonucleotidi *pQE-30 Dir* e *pQE-30 Rev* sono stati impiegati per sequenziare o verificare la presenza degli inserti genici nel vettore d'espressione pQE-30.

pQE-30 Dir: 5' GTT CTG AGG TCA TTA CTG G 3'

pQE-30 Rev: 5' CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG 3'

Gli oligonucleotidi *PVX-back* e *PVX-for* sono stati utilizzati per sequenziare o verificare la presenza degli inserti genici nel vettore d'espressione pPVX201.

PVX-back: 5' CTG GGG AAT CAA TCA CAG TGT TG 3'

PVX-for: 5' CCT GCA GTT TTT GTG GTA GTT GA 3'

Per gli oligonucleotidi utilizzati per le amplificazioni delle sequenze oggetto di questo lavoro si rimanda ai paragrafi in cui queste sono descritte.

3.7 ANTICORPI

Anticorpi primari

Gli anticorpi policlonali contro le proteine N, M ed E7 sono stati forniti dalla Dott.ssa Paola Di Bonito, Dipartimento di Malattie infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Anticorpi policlonali contro la proteina N:

pAb α -N rabbit: derivante da conigli immunizzati con la proteina di fusione His₆-N purificata dopo espressione in *E. coli*, usato alla diluizione 1:3000.

pAb α -N mouse: derivante da topi BALB/c immunizzati con la proteina di fusione His₆-N purificata dopo espressione in *E. coli*; usato alla diluizione 1:1000.

Anticorpi policlonali contro la proteina M:

pAb α -M1/2 rabbit: derivante da conigli immunizzati con una forma deleta (residui amminoacidici 138-222) della proteina M fusa con l'His₆-tag (His₆-M1/2) purificata dopo espressione in *E. coli*; usato alla diluizione 1:1500.

pAb α -M1/2 mouse: derivante da topi BALB/c immunizzati con la proteina di fusione His₆-M1/2 purificata dopo espressione in *E. coli*; usato alla diluizione 1:1000.

Anticorpo policlonale contro la proteina E7 di HPV16

pAb α -E7: derivante da topi BALB/c immunizzati con la proteina di fusione His₆-E7 purificata dopo espressione in *E. coli*. Diluizione d'uso: 1:1000.

Anticorpo policlonale contro la saporina

pAb α -SAP: derivante da conigli immunizzati con la saporina purificata dopo espressione in *E. coli*. Diluizione d'uso: 1:1000. Gentilmente fornito dalla Prof.ssa Laura Spanò, Università degli Studi dell'Aquila.

Anticorpi secondari

pAb α -mouse biotinilato (1021, GE Healthcare) ottenuto da pecore immunizzate con frazioni purificate di immunoglobuline di topo. Usato alla diluizione 1:5000.

pAb α -rabbit biotinilato (Sigma) ottenuto da pecore immunizzate con frazioni purificate di IgG di coniglio. Usato alla diluizione 1:5000.

pAb α -mouse HRP (anti-mouse coniugato con perossidasi di rafano) (Invitrogen) ottenuto da pecore immunizzate con frazioni purificate di IgG di topo. Usato alla diluizione 1:2000-1:4000.

pAb α -rabbit HRP (Invitrogen) ottenuto da pecore immunizzate con frazioni purificate di IgG di coniglio. Usato alla diluizione 1:3000-1:4000.

pAb α -human HRP (Sigma) ottenuto da conigli immunizzati con frazioni purificate di IgG umane. Usato alla diluizione 1:5000.

Streptavidina HRP (GE Healthcare). Usata alla diluizione 1:2000.

Metodi

A) LE PIANTE PER LA PRODUZIONE DEGLI ANTIGENI N e M DEL SARS-CoV

3.8 PREPARAZIONE DEI COSTRUTTI PER L'ESPRESSIONE IN Pianta

I geni che codificano per le proteine N (GenBank: AAP33707.1) e M (GenBank: AAP33701.1) del ceppo Frankfurt I del SARS-CoV (GenBank: AY291315.1) sono stati gentilmente concessi dalle Dott.sse Paola Di Bonito e Alessandra Carattoli (Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma), clonati nel vettore d'espressione procariotico pQE-30 (Carattoli *et al.*, 2005). Tali geni sono stati ottenuti mediante RT-PCR dal sovrinatante, irradiato con raggi γ e calore, di una coltura di cellule Vero E6 infettate con il ceppo Frankfurt I del SARS-CoV. Tale ceppo virale è stato isolato dal sangue periferico di un paziente di Francoforte affetto da SARS.

Nel nostro laboratorio, per la preparazione della tesi di laurea della sottoscritta, i due geni, tramite amplificazione con opportuni inneschi, sono stati clonati nel vettore pBS, ottenendo i costrutti pBS-His₆-N e pBS-M-His₆, e nel vettore pPVX201 per l'espressione transiente delle proteine in pianta, ottenendo i costrutti pPVX-His₆-N e pPVX-M-His₆.

3.8.1 Clonaggio del gene M-His₆ nel vettore binario pBI-B9

Il gene M-His₆ è stato clonato nel vettore pBI-B9 a partire dal costrutto pBS-M-His₆, sfruttando i siti di restrizione *XbaI/SalI*, presenti rispettivamente a monte e a valle del gene M-His₆ e nel vettore pBI/B9, ottenendo il costrutto pBI-M-His₆. Le digestioni sono state effettuate attenendosi alle indicazioni fornite della casa produttrice dell'enzima (1 unità per 1-2 μ g di DNA, nell'appropriato buffer di reazione, per 1 ora a 37 °C). Il DNA digerito è stato analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% in tampone TAE 1x con aggiunta di bromuro di etidio (Sigma, concentrazione finale 0.5 μ g/ml). Le bande corrispondenti ai frammenti genici di interesse sono state estratte ed il DNA è stato purificato al fine di effettuare i clonaggi, utilizzando il "GFX purification kit" (GE Healthcare), secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. Successivamente, la reazione di ligazione, catalizzata dalla DNA ligasi T4 ricombinante, prodotta in *E. coli*, è stata condotta mediante incubazione O.N. a 16 °C della miscela di reazione così composta:

- 1 μ l di tampone di reazione 10x (Roche) [660 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7.5]

- vettore plasmidico digerito, 100 ng
- inserto (in quantità conformi a un rapporto molare 1:1, o 1:5 con il vettore)
- 1 unità di DNA ligasi T4 [1U/μl] (Roche)
- H₂O deionizzata sterile, fino al volume di 10 μl.

3.8.2 Preparazione e trasformazione delle cellule elettrocompetenti di *E. coli*

Per la preparazione delle cellule elettrocompetenti, è stato seguito il seguente protocollo:

- inoculo da singola colonia di *XL-1 blue* in terreno LB + tetraciclina, O.N. a 37 °C a 250 rpm;
- diluizione 1:100 del pre-inoculo in 1 l di terreno e crescita nelle stesse condizioni fino al raggiungimento della fase esponenziale di crescita ($OD_{600\text{ nm}} = 0.4 \div 0.6$);
- incubazione in ghiaccio per 15';
- centrifugazione a 5000 x g per 10' a 4°C;
- pellet recuperato e lavato con 50 ml di H₂Odd sterile fredda e nuovamente sottoposto a centrifugazione;
- lavaggio con 30 ml di H₂Odd sterile e fredda e centrifugazione;
- 3 lavaggi con 30 ml di glicerolo 10% e centrifugazione;
- pellet risospeso in 1 ml di glicerolo 10%, aliquotato in provette eppendorf e conservato a in azoto liquido.

Le cellule competenti così ottenute sono state trasformate mediante elettroporazione (2.2 kV, 400-800 Ohm e 25 μF) dopo l'aggiunta di 2 μl di prodotto di ligazione. Le cellule sono state risospese immediatamente in 1 ml di terreno LB + glucosio 0.2% e poste a crescere a 37°C per circa un'ora a 250 rpm di agitazione. Infine diverse quantità di coltura (50, 100 e 200 μl) sono state piastrate su piastre LB + Kanamicina per la selezione dei trasformanti.

3.8.3 Caratterizzazione dei ricombinanti batterici mediante PCR su colonia

I cloni di *Escherichia coli*, trasformati con il plasmide ricombinante pBI-M-His₆ sono stati analizzati mediante PCR su colonia, utilizzando gli oligonucleotidi *Pro Dir* (5'-CATCGTTGAAGATGCCTCTG -3') *Nos Rev* (5'-CGATCTAGTAACATAGATGAC -3') che appaiano rispettivamente nel promotore 35S del CaMV e nel terminatore della nopalina sintasi del vettore pBI-121 (vedi **figura 32**). L'amplificazione del DNA è stata ottenuta impiegando l'enzima *Taq* DNA polimerasi (GE Healthcare) in miscele di PCR così preparate:

- Tampone di reazione 1x (GE Healthcare)

- 250 μ M di dNTP mix (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP]
- 10 pmoli di ciascun oligonucleotide
- 1 unità di *Taq* DNA polimerasi [5U/ μ l]
- H₂O deionizzata sterile a volume
- 1 colonia stemperata nella miscela di reazione.

La miscela è stata incubata in termociclatore nelle seguenti condizioni:

- 5' a 94°C (denaturazione)
 - 30'' a 94°C (denaturazione)
 - 30'' a 55°C (appaiamento)
 - 45'' a 72°C (elongazione)
- } 30 cicli
- 5' a 72°C (elongazione).

Metà del volume di reazione di PCR è stato poi sottoposto ad elettroforesi su gel d'agarosio 1% per la verifica della presenza dell'amplificato.

Da alcuni cloni risultati positivi in PCR, sono state effettuate delle minipreparazioni di DNA plasmidico con il kit Miniprep, GE Healthcare, e il DNA è stato sottoposto a sequenziamento con gli oligonucleotidi *Pro Dir* e *Nos Rev* impiegando un sequenziatore a capillari (ABI PRISM 310). L'analisi delle sequenze è stata effettuata con i programmi Chromas Lite e DNA MAN.

3.8.4 Preparazione e trasformazione dei ceppi di *A. tumefaciens* elettrocompetenti

Per la preparazione dei ceppi elettrocompetenti di *A. tumefaciens* GV3101 e C58C1 è stato seguito il protocollo descritto già per *E. coli* (paragrafo 3.8.2) con alcune differenze:

- il pre-inoculo è stato fatto in terreno YEB+ rifampicina
- la diluizione del pre-inoculo è di 1:500 in YEB+ rifampicina e le cellule devono essere fatte crescere per 16 ore a 28 °C, fino al raggiungimento della fase esponenziale di crescita ($OD_{600\text{ nm}} = 0.5-0.9$).

La trasformazione dei ceppi di agrobatterio è stata condotta nelle stesse condizioni descritte per *E. coli* ma dopo trasformazione le cellule sono state risospese in 1 ml di terreno SOC, poste a crescere a 28 °C per tre ore e piastrate su YEB + Kan per la selezione dei trasformanti.

3.9 ESPRESSIONE DEGLI ANTIGENI N e M IN PIANTE DI *Nicotiana benthamiana*

3.9.1 Infezione delle piante con il costrutto pPVX-His₆-N

Piantine di *N. benthamiana* di circa quattro settimane, allo stadio di circa quattro foglie,

sono state infettate con il plasmide ricombinante pPVX-His₆-N e come controllo, con il plasmide “scarico” pPVX201 (infezione primaria).

Due foglie di ogni pianta sono state cosparse con polvere di carborundum (Sigma) e inoculate con 10 µg per foglia di plasmide diluito in 80 µl di H₂O deionizzata sterile. La superficie delle foglie è stata delicatamente abrasa per favorire l'ingresso dei vettori virali nelle cellule del mesofillo fogliare.

Le piante sono state fatte crescere in una serra a contenimento (livello di biosicurezza 2), a 24 °C con 16 ore di luce e 8 ore di buio ed osservate quotidianamente per la comparsa dei sintomi. In seguito alla manifestazione dei sintomi (dopo circa 7-10 giorni), le foglie inoculate e quelle sistemiche sintomatiche sono state raccolte, immediatamente congelate in azoto liquido e conservate a -80°C.

Le foglie inoculate sono state impiegate anche per re-infettare nuove piante (infezione secondaria e terziaria). Le foglie sono state ridotte in polvere in azoto liquido, risospese in 3 volumi (w/v) di PBS 1X e omogenate mediante ultraturrax. L'infezione delle piantine è stata condotta come descritto all'inizio del paragrafo, impiegando in questo caso circa 80 µl/foglia di estratto, senza l'impiego di polvere di carborundum.

3.9.2 Agroinfiltrazione delle piante con i ceppi di *A. tumefaciens* recanti il costrutto pBI-M-His₆

Per l'agroinfiltrazione è stato seguito e modificato parzialmente il protocollo descritto in Kapila *et al.*, 1996. Tale protocollo si articola nei seguenti punti:

1. Una singola colonia fresca di *A. tumefaciens* GV3101 e/o C58C1 trasformata con il plasmide pBI121 recante il gene di interesse viene inoculata in YEB + Kan per tutta la notte a 28 °C.
2. Si procede con una diluizione 1:500 in 500 ml di YEB aggiungendo anche:
 - Kanamicina;
 - 10 mM MES (pH 5.6);
 - 2 mM MgSO₄;
 - 20 µM Acetosiringone (in dimetilformamide 50%).
3. La coltura viene incubata per tutta la notte a 28 °C in agitazione (150-200 rpm) fino ad un valore di OD_{600 nm} di circa 1.7. Si centrifuga successivamente la sospensione a 3000 g per 15 minuti.
4. Il pellet viene risospeso in MMA fino ad un valore di OD_{600 nm} di 2.4.
5. Si aggiunge Acetosiringone 200 µM.
6. La sospensione di agrobatterio viene mantenuta a temperatura ambiente per circa 1-3

ore, prima di procedere con l'infezione.

7. La pagina inferiore delle foglie (3 foglie/pianta all'atto delle analisi preliminari, possibilmente tutte le foglie all'atto dell'infiltrazione effettuata al fine di accumulare biomassa vegetale infettata) viene infiltrata manualmente mediante l'uso di una siringa priva di ago con circa 1 ml di sospensione batterica.

Le piante sono fatte crescere in una serra a contenimento come già descritto.

Per conoscere il giorno in cui si ottiene il valore massimo di accumulo della proteina di interesse, al fine di procedere nell'esperimento successivo al campionamento massivo solo in quel giorno, sono stati effettuati dei campionamenti giornalieri, tramite prelevamento di dischetti fogliari. Il campionamento è stato eseguito al giorno III, IV, V, VI, VII e X post-infiltrazione (p.i.) per ogni ceppo.

3.9.3 Preparazione degli estratti fogliari e quantificazione delle proteine

L'estrazione di proteine dalle foglie di *N. benthamiana*, è stata effettuata seguendo diversi protocolli di estrazione in base alle differenti caratteristiche delle proteine esaminate e ai saggi da eseguire. Prima di procedere con l'estrazione delle proteine, le foglie sono state ridotte in polvere in azoto liquido mediante l'uso di mortaio e pestello.

-Per le analisi di espressione e quantificazione della proteina N (paragrafi 4.1.2 e 4.1.3), il materiale vegetale polverizzato è stato risospeso in tampone PBS 1X (1 ml di PBS per 0.3 g di foglia fresca), contenente una miscela di inibitori di proteasi ("Complete-EDTA free", Roche Diagnostics). I tessuti, omogenati mediante ultraturrax, sono stati centrifugati a 10000 g per 10 minuti ed il supernatante è stato recuperato.

-Per le analisi di immunogenicità della proteina N contenuta negli estratti (paragrafo 4.1.5), i tessuti vegetali sono stati invece risospesi in tampone TN (25 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, pH 7.2; 1 ml di tampone TN per 1 g di tessuto vegetale) con inibitori di proteasi e poi processati come sopra descritto. Un'aliquota dell'estratto è stata conservata per la quantificazione della proteina N, mentre il resto è stato sottoposto a precipitazione con acido tricloracetico (TCA) 25% per 30' in ghiaccio e poi centrifugato a 8000 g per 40'. Il precipitato è stato lavato con acetone freddo e centrifugato a 8000 g per 40' per due volte. Infine il pellet è stato fatto asciugare completamente ed è stato risospeso in "gel loading buffer" e bollito per 5'.

-Per la verifica della presenza della proteina M negli esperimenti di "time course" (paragrafo 4.2.2), i dischi fogliari polverizzati in eppendorf con un pestellino sono stati risospesi direttamente in "gel loading buffer" e bolliti per 10'.

-Per le analisi della proteina M successive agli esperimenti di "time course" (paragrafo

4.2.2) il materiale vegetale polverizzato è stato risospeso in tampone GB (100 mM Tris-HCl pH 8.1, 10% glicerolo, 400 mM saccarosio, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 10 mM 2-mercaptoetanolo; 1 ml di tampone GB per 1 g di tessuto vegetale) con inibitori di proteasi e Triton X-100 1% e processato come al solito. Il sovratanante recuperato costituisce la frazione solubile, mentre il pellet è stato risospeso in tampone TEPT (per 1 ml: urea 8 M 400 μ l, SDS 10% 200 μ l, Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 125 μ l, 2-mercaptoetanolo 50 μ l) e costituisce la frazione insolubile. Ad entrambe le frazioni è stato aggiunto tampone di caricamento e invece di essere bolliti, i campioni sono stati scaldati a 40°C per 10' per prevenire la formazione di aggregati.

Un'aliquota degli estratti (ad eccezione del campione in tampone TEPT) è stata utilizzata per la quantificazione delle proteine solubili, mediante il metodo Bradford (BioRad). Come riferimento è stata titolata la proteina sieralbumina bovina (BSA). La concentrazione dei campioni è stata determinata con il metodo dei minimi quadrati facendo riferimento alla retta di titolazione della BSA.

3.9.4 Elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide-SDS (SDS-PAGE)

La verifica della produzione delle proteine N ed M è stata fatta utilizzando il sistema SDS-PAGE secondo Laemmli seguito da colorazione con nitrato di argento o immunoblotting. Il gel di separazione è stato preparato ad una concentrazione finale di poliacrilammide (acrilammide/bisacrilammide 29:1) del 12% in presenza di SDS 0.1%. La corsa elettroforetica è stata effettuata in tampone "running buffer" 1X su apparato MiniProtean III (BioRad) a 150 Volts.

3.9.5 Colorazione delle proteine con il nitrato d'argento

Per la colorazione delle proteine separate mediante elettroforesi su SDS-PAGE, il gel è stato sottoposto ai seguenti trattamenti in agitazione (tutte le soluzioni sono state preparate con H_2O):

- fissaggio con la soluzione di fissaggio (50% metanolo, 12% acido acetico glaciale, 0.5 ml/l $HCOH$ al 37%) per 30'
- lavaggi con etanolo al 50% (3 lavaggi della durata di 10' ciascuno)
- pretrattamento in tiosolfato di sodio ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) 200 mg/l per 1'
- lavaggi con H_2O (3 lavaggi della durata di 20' ciascuno)
- trattamento con soluzione di nitrato d'argento (2g/l $AgNO_3$, 0.75 ml/l $HCOH$ al 37%) per 10'

- lavaggi con H₂Odd (2 lavaggi della durata di 20' ciascuno)
- sviluppo della reazione con soluzione di sviluppo (60 g/l Na₂CO₃, 0.5 ml/l HCOH al 37%, 4 mg/l Na₂S₂O₃ * 5H₂O) fino alla comparsa delle bande proteiche
- lavaggi con H₂Odd (2 lavaggi della durata di 20' ciascuno)
- blocco della reazione con soluzione di stop (50% metanolo, 12% acido acetico glaciale)

3.9.6 Immunoblotting

Le proteine separate su SDS-PAGE sono state trasferite mediante trasferimento elettrico un'ora a 4 °C a voltaggio costante di 100 Volts dal gel su una membrana di "polyvinylidene fluoride" (PVDF: "Immobilon-P", Millipore) attivata in metanolo assoluto (10''). Il trasferimento è stato effettuato in tampone "transfer buffer" 1X. Dopo il "blotting" la membrana è stata posta in agitazione in una soluzione bloccante di MPBS 5% per 16 ore ("blocking"). Dopo 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno (il primo e l'ultimo con PBST, il secondo con PBST-NaCl), la membrana è stata incubata in MPBS al 2% contenente l'anticorpo primario (pAb α -N rabbit per la proteina N, pAb α -M1/2 mouse o pAb α -M1/2 rabbit per la proteina M) per 2 ore a temperatura ambiente, lavata e incubata in MPBS al 2% contenente l'anticorpo secondario (pAb α -rabbit HRP o pAb α -mouse HRP) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo una nuova serie di lavaggi, la membrana è stata incubata con 1 ml di soluzione per la rivelazione delle proteine mediante chemiluminescenza (ECL Plus, GE Healthcare). Tale sistema consiste nell'emissione di luce a seguito dell'ossidazione del luminolo, in presenza di perossido di idrogeno e di attivatori chimici, da parte della perossidasi di rafano. Il segnale è stato rivelato in seguito ad esposizione della membrana su una lastra fotografica (Hyperfilm ECL, GE Healthcare).

3.9.7 Quantificazione della proteina N presente nei tessuti vegetali

Per quantificare la proteina N prodotta dai tessuti vegetali infettati è stato effettuato un "Triple Antibody Sandwich-Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay" (TAS-ELISA) su foglie sistemiche di piante infettate con il plasmide pPVX-His₆-N (infezioni primarie), su foglie sistemiche di piante infettate con le foglie inoculate delle infezioni primarie (infezioni secondarie) e su un "pool" di foglie sistemiche delle due infezioni. Come controllo negativo sono state impiegate foglie sistemiche di piante infettate con il costruito pPVX201 (plasmide "scarico"). Come valori di riferimento sono state impiegate diverse concentrazioni della proteina N purificata da *E. coli* (0.5, 2, 5, 20, 50, 200, 500 ng) diluita in estratto di pPVX201.

Il “coating” delle piastre ELISA (Maxisorp, NUNC) è stato effettuato per 3 ore a 37°C e poi per 3 ore a temperatura ambiente con 100 µl/pozzetto di anticorpo pAb α-N rabbit (diluito in PBS 1X). Dopo 3 lavaggi con PBST e 1 con PBS, i pozzetti sono stati incubati tutta la notte a 4 °C con 100 µl di estratto vegetale normalizzato per le TSP (circa 250 µg TSP/pozzetto), oppure con la proteina N purificata da *E. coli* diluita in estratto di pPVX201. Tra una incubazione e la successiva sono sempre stati effettuati 3 lavaggi con PBST e 1 con PBS.

Il “blocking” dei pozzetti è stato effettuato per 2 ore a 37°C con 150 µl/pozzetto di MPBS 5%.

Successivamente i pozzetti sono stati incubati per 2 ore a 37°C con 100 µl/pozzetto di anticorpo pAb α-N mouse HRP (diluito in MPBS 2%). La reazione colorimetrica è stata indotta aggiungendo 100 µl/pozzetto di soluzione di sviluppo H₂O₂/ABTS [2', 2'-azino bis-(3-etilbenzotiazolin) sulphuric acid] (KPL Inc., Gaithersburg, MD - USA). Lo sviluppo è stato effettuato al buio a temperatura ambiente. Le letture sono state effettuate al lettore di piastre ELISA (filtro a 405 nm) dopo 5, 15, 30 e 60 minuti.

Tutte le analisi sono state effettuate in doppio nello stesso esperimento e ripetute per tre volte.

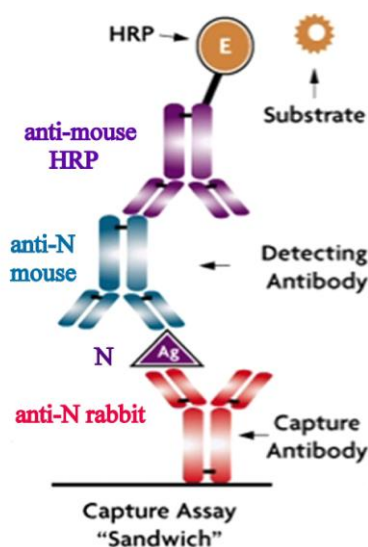


Figura 37. Rappresentazione schematica del TAS-ELISA condotto per la quantificazione della proteina N

3.9.8 Purificazione della proteina N dagli estratti vegetali mediante Cromatografia di Affinità con Ioni Metallo immobilizzati (IMAC)

La purificazione della proteina N è stata effettuata a partire da 2 g di tessuto liofilizzato (derivante da 18 g di tessuto fresco) di foglie sistemiche di piante infettate con il costrutto pPVX-His₆-N impiegando un complesso costituito da ioni nichel (Ni²⁺) covalentemente legati all'acido nitrilotriacetico (NTA) (resina Ni-NTA Agarose, Qiagen). Tale complesso

lega le proteine con un “tag” di istidine tramite le due posizioni libere della sfera di coordinazione degli ioni Ni^{2+} .

Si è proceduto come da protocollo per batteri The QIAexpressionist, Qiagen, apportando alcune modifiche per adattarlo alla pianta. Tutti i passaggi sono stati effettuati a temperatura ambiente. Dopo l’aggiunta di 60 ml di tampone B i tessuti sono stati omogenati mediante ultraturrax e incubati su ruota per 1 ora. In seguito a tre sonicazioni della durata di un minuto a frequenza 10 Hz i campioni sono centrifugati a 10000 g per 30 minuti a RT ed il sovrantante è stato filtrato con filtri 0.45 μm . Gli estratti sono poi stati incubati per 2 ore con la resina e in seguito trasferiti in colonna di polipropilene (Poly-Prep Column, BioRad).

I lavaggi sono stati effettuati con 20 ml di tampone B seguiti da 20 ml di tampone C, mentre l’eluizione della proteina è stata ottenuta mediante l’aggiunta di 3 ml di tampone D (raccogliendo 3 frazioni da 1 ml, chiamate D1, D2 e D3) e di 4 ml di tampone E (raccogliendo 6 frazioni da 0.5 ml, chiamate E1, E2, E3, E4, E5, E6, e 1 da 1 ml, chiamata E7)

Un’aliquota di ogni frazione (20 μl) è stata preparata per la corsa su gel SDS-PAGE mediante aggiunta di “gel loading buffer” per proteine e bollitura per 5’. Il restante volume è stato conservato a 4 °C per le successive analisi.

Le frazioni di eluizione sono state poi riunite a costituire tre frazioni:

A (contenente D1, D2 e D3)

B (contenente E1, E2 ed E3)

C (contenente E4, E5, E6 ed E7).

Tampone B: 8 M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.001 M Tris pH 8.0

Tampone C: 8 M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.001 M Tris pH 6.3

Tampone D: 8 M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.001 M Tris pH 5.9

Tampone E: 8 M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.001 M Tris pH 4.5

Queste soluzioni sono state preparate al momento in quanto contengono urea, la quale tende a decomporsi portando ad un innalzamento del pH dei tamponi.

3.10 SAGGIO DI ANTIGENICITÀ DELLA PROTEINA N PRODOTTA IN PIANTA

L’estratto grezzo vegetale contenente la proteina N o la stessa quantità di proteina purificata dal materiale vegetale sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel SDS-

PAGE 12%, seguita da blotting delle proteine su membrana PVDF e taglio di quest'ultima in strisce in modo da avere una quantità di circa 250 ng di proteina N per striscia. Come controllo negativo è stato impiegato l'estratto ottenuto da foglie sistemiche infettate con il plasmide pPVX201 wt, mentre come controllo positivo è stata utilizzata la proteina N purificata da *E. coli*, che aveva già dimostrato di essere reattiva con i sieri SARS (Di Bonito *et al.*, dati non pubblicati). Le strisce sono state incubate con sieri di 25 pazienti SARS convalescenti (raggruppati in 5 "pool") della prima epidemia di Hong Kong (forniti dal Prof. Paul Chan, Università di Hong Kong, China) o con sieri di 9 pazienti affetti da altre malattie respiratorie (raggruppati in 3 "pool"). Le incubazioni sono state eseguite tutta la notte a 4 °C con i sieri diluiti 1:200 o 1:500 in MPBS 3% seguite da incubazione per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario pAb α -human HRP diluito in MPBS 3%.

Lo sviluppo è stato effettuato con il substrato colorimetrico della perossidasi (3,3'-Diaminobenzidina Peroxidase Substrate, DAB, Sigma).

B) PIATTAFORME VEGETALI PER LA PRODUZIONE DI VACCINI TERAPEUTICI BASATI SULL'ONCOPROTEINA E7 DI HPV-16

3.11 PRODUZIONE DELLA PROTEINA E7 IN Pianta MEDIANTE AGROINFILTRAZIONE

3.11.1 Preparazione del costrutto pBI-PGIPss-E7

Per l'ottenimento del costrutto pBI-PGIPss-E7 per l'espressione transiente in pianta mediante agroinfiltrazione della proteina E7 (Genbank AAA46940.1) di HPV-16, si è partiti dal vettore pPVX-PGIPss-E7 che in precedenza ci ha consentito di esprimere in forma transiente la proteina E7 nella via secretoria di pianta utilizzando la proteina E7 fusa all'N-terminale alla sequenza segnale della proteina inibitrice della poligalatturonasi di fagiolo, PGIPss (MTQFNIPVTMSSSLSIILVILVSLRTALS), con la tecnologia del vettore virale derivato da PVX (Franconi *et al.*, 2006).

Nel presente lavoro di dottorato il gene PGIPss-E7 è stato clonato a partire dal vettore pPVX-PGIPss-E7 *XbaI/SalI* nel vettore binario pBI-B9, sfruttando i siti di restrizione *XbaI/SalI*, presenti rispettivamente a monte e a valle del gene PGIPss-E7 e nel vettore pBI/B9, ottenendo il costrutto pBI-PGIPss-E7. Tuttavia, non essendo *XbaI* un sito unico nel costrutto pPVX-PGIP-E7 (è presente in un'altra posizione nel vettore pPVX), l'inserto PGIP-E7-His₆ è stato dapprima exciso dal vettore mediante digestione con gli enzimi *ClaI* (*ClaI* si trova a monte del sito *XbaI*) e *SalI*, purificato da gel d'agarosio e poi

successivamente digerito con *XbaI*.

Tutti i passaggi successivi (dalla ligazione alla caratterizzazione dei trasformanti di *E. coli* mediante PCR su colonia) sono stati condotti come descritto precedentemente per pBI-M-His₆ (paragrafi 3.8.1-3.8.3). Anche la preparazione e la trasformazione di cellule elettrocompetenti di *A. tumefaciens* con il costrutto pBI-PGIPss-E7 è stata eseguita come già descritto nel caso di pBI-M-His₆ (paragrafo 3.8.4); in questo caso però, è stato impiegato solo il ceppo GV3101 di *A. tumefaciens*.

3.11.2 Agroinfiltrazione delle piante di *N. benthamiana* ed analisi dell'espressione della proteina PGIPss-E7

L'agroinfiltrazione delle piante di *N. benthamiana* è stata condotta come già descritto (paragrafo 3.9.2). La preparazione degli estratti nell'esperimento di "time course" è stata condotta come già descritto per M (paragrafo 3.9.3). La preparazione dell'estratto per la verifica dei livelli di espressione nel campionamento massivo è stata invece condotta risospendendo il materiale vegetale in tampone GB con inibitori di proteasi e Triton X-100 1% e recuperando il sovranatante dopo centrifugazione a 16000 g per 10'. Per la corsa su gel SDS-PAGE il sovrinatante è stato addizionato con gel loading buffer e bollito per 5'.

L'analisi della presenza della proteina PGIPss-E7 è stata condotta mediante immunoblotting impiegando l'anticorpo primario pAb α -E7 seguito dall'anticorpo secondario pAb α -mouse HRP.

3.12 PRODUZIONE DELLA PROTEINA E7 NELLA MICROALGA *Chlamydomonas reinhardtii*

3.12.1 Crescita dei ceppi di *Chlamydomonas*

Per tutti gli esperimenti condotti sono stati usati ceppi privi o con pochi residui di parete. Le cellule sono state cresciute fotomixotroficamente in terreno TAP (contenente acetato come fonte di carbonio) a 25 °C in presenza di luce bianca fluorescente ($40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) per 16 ore al giorno. Per la crescita in terreno solido, si opera esattamente come per i batteri e i lieviti in piastre petri con terreno TAP + agar. Per la crescita in terreno liquido si parte da singola colonia inoculata in 200 μl di terreno TAP piastre da 96 (Greiner bio-one) e si lascia crescere per 2 giorni a 600 rpm, dopo di che si inocula la coltura cresciuta, in piastra da 12 pozzetti contenente 2-4 ml (Qiagen) di terreno fresco e si lascia crescere per 2 giorni a 160 rpm. Le piastre sono state coperte con la membrana Breathe-Easy membrane (Diversified Biotech) al fine di prevenire l'evaporazione della coltura, senza

però limitare gli scambi gassosi.

Nei casi in cui si necessiti di un quantitativo maggiore di coltura, si procede a diluizioni in beuta con agitazione di 130 rpm. Tutte le analisi sono state condotte su cellule alla fine della fase esponenziale di crescita (circa 10^7 cellule/ml di coltura).

3.12.2 Generazione di linee transgeniche nucleari ed analisi dell'espressione della proteina E7GGG

3.12.2.1 Preparazione dei costrutti per la trasformazione nucleare

La sequenza scelta per l'espressione in *C. reinhardtii* mediante trasformazione nucleare è costituita dal gene E7GGG fuso al 5' alla sequenza codificante per l'His₆-tag (His₆-E7GGG).

L'ottimizzazione dei codoni di tale sequenza è stata effettuata dalla GenScript Corporation USA, in base alla sequenza amminoacidica da noi fornita, fiancheggiata a monte e a valle dai siti di restrizione da inserire, *XbaI* e *NdeI* a monte della sequenza del gene e *BglII* ed *EcoRI* a valle. Il primo ATG è fornito dal sito di restrizione *NdeI*.

L'ottimizzazione dei codoni è stata eseguita in modo da impiegare le triplette più abbondanti del genoma microalgale e in modo da ottenere un alto contenuto di GC (63% di GC, 90% in terza posizione) tipico di questa microalga.

Il gene sintetico ottimizzato, fiancheggiato dai siti di restrizione sopra indicati, è stato fornito nel vettore pUC57 (GeneScript).

Mediante digestione con gli enzimi *XbaI/BglII* o *NdeI/BglII* il gene His₆-E7GGG è stato exciso dal vettore pUC57 e, successivamente, ligato nei vettori pSL18-cyc₆ e pSL18-psaD-cRLuc digeriti con le stesse coppie di enzimi, rispettivamente, ottenendo i costrutti pSL18-cyc₆-His₆-E7GGG e pSL18-psaD-His₆-E7GGG.

L'inserzione del gene His₆-E7GGG nei vettori per la trasformazione nucleare è stata verificata mediante PCR da colonia con gli oligonucleotidi *PF10* (5' CGGTACCGCATTGTGCAAGG 3'; appaia sul promotore cyc₆) e *PF11* (5'CCATCCCGGCAAGTAAAGC 3'; appaia sul terminatore psaD) sul costrutto pSL18-cyc₆-His₆-E7GGG e con gli oligonucleotidi *PF21* (5'CCATATTCGGACGCAATTGTC 3'; appaia sul promotore psaD) e *PF11* sul costrutto pSL18-psaD-His₆-E7GGG e alcuni cloni positivi sono stati verificati mediante sequenziamento.

Per la trasformazione di *C. reinhardtii* sono stati usati i plasmidi linearizzati in una regione lontana dal gene sintetico, in modo da indirizzare l'eventuale degradazione del DNA a partire da quel sito. Entrambi i costrutti sono stati linearizzati mediante digestione con l'enzima *ScaI*.

3.12.2.2 Trasformazione nucleare

Sono stati impiegati 3 ceppi di *Chlamydomonas* senza parete, cw15, UVM4 e UVM11.

La trasformazione è stata eseguita con il metodo delle “glass beads” descritto da Kindle e colleghi (Kindle, 1990). Il protocollo si articola nei seguenti passaggi:

- 1) usare cellule in fase esponenziale di crescita aventi una concentrazione compresa tra 5×10^6 e 1×10^7 cellule/ml
- 2) pellettare le cellule in tubi Falcon sterili a 4000 g per 10'
- 3) risospendere le cellule in terreno TAP fresco in modo da ottenere una concentrazione di 3×10^8 cellule/ml
- 4) aliquotare 300 μ l cellule ($=10^8$ cellule) in un tubo di vetro sterile contenente 300 mg di biglie di vetro di 425-600 μ m di diametro (glass beads acid washed, Sigma) autoclavate.
- 5) aggiungere 1 μ g di DNA plasmidico linearizzato e 100 μ l 20 % PEG 6000
- 6) agitare su vortex per 20'' a 3000 rpm
- 7) aggiungere 300 μ l di TAP e piastrare su terreno selettivo: TAP+Agar 1% + paramomicina
- 8) incubare tutta la notte le piastre a 23 °C al buio perchè la paramomicina è fotolabile
- 9) incubare le piastre a 23 °C alla luce fino alla comparsa delle colonie (circa 1 settimana)

3.12.2.3 Induzione dell'espressione della proteina E7GGG nei trasformanti ottenuti con il costrutto pSL18-cyc₆-His₆-E7GGG

L'induzione del promotore cyc₆ è stata effettuata con 50 μ M CINi seguendo il protocollo descritto di seguito:

- si fanno crescere i trasformanti da singola colonia in 200 μ l di terreno TAP ENEA 2 piastre da 96 per due giorni
- si diluiscono le colture cresciute in 2 ml di terreno TAP ENEA 2 in piastre da 24
- dopo 30 ore, quando la densità cellulare è di circa 5×10^6 cells/ml, si aggiunge CINi 50 μ M
- dopo 16 ore si preleva la coltura, si pelletta a 5000 g per 10' e si procede con l'analisi dei trasformanti come descritto nel prossimo paragrafo.

3.12.2.4 Preparazione degli estratti ed analisi dell'espressione delle proteina E7GGG nei trasformanti nucleari

Per l'analisi dei trasformanti nucleari sono stati impiegati diversi protocolli di estrazione delle proteine. Le proteine solubili totali sono state estratte da pellet cellulari ottenuti da

culture di trasformanti arrivate alla fine della fase esponenziale di crescita (circa 10^7

cellule/ml). I pellet di 4 ml di coltura sono stati risospesi in 200 μ l di tampone PBS o GB in presenza di inibitori di proteasi, congelati e scongelati in azoto liquido per tre volte e centrifugati a 16000 g per 10'. Il sovranatante è stato recuperato e le TSP quantificate con il metodo Bradford.

Per la corsa su gel SDS-PAGE il sovranatante è stato addizionato di "gel loading buffer" e bollito per 5'.

L'analisi della presenza della proteina E7GGG è stata condotta mediante immunoblotting impiegando l'anticorpo primario pAb α -E7 seguito dall'anticorpo secondario pAb α -mouse HRP.

3.12.3 Generazione di linee transplastomiche ed analisi dell'espressione della proteina E7GGG

3.12.3.1 Preparazione dei costrutti per la trasformazione plastidiale

La sequenza scelta per l'espressione in *C. reinhardtii* mediante trasformazione plastidiale è costituita dal gene E7GGG fuso al 5' alla sequenza codificante per l'His₆-tag (His₆-E7GGG), intervallato dalla sequenza codificante per il sito di taglio della trombina (LVPRGS).

In questo caso l'ottimizzazione della sequenza da esprimere è stata effettuata scegliendo i codoni più frequenti dei geni plastidiali più espressi, prestando attenzione a non usare però solo il codone più frequente, in modo da non avere una deplezione dei tRNA corrispondenti e quindi un blocco o rallentamento della sintesi del messaggero.

L'ottimizzazione di questa sequenza (indicata come His₆-E7GGG) è stata ottenuta mediante il programma Optimizer: <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>.

Come tabella di riferimento per la costruzione del gene sintetico è stata impiegata la tabella dei codoni dei geni plastidiali più espressi riportata di seguito

UUU 19.7	UCU 14.5	UAU 17.8	UGU 6.7
UUC 21.5	UCC 0.4	UAC 10.0	UGC 0.4
UUA 67.1	UCA 23.0	UAA 4.4	UGA 0.01
UUG 0.4	UCG 2.2	UAG 0.01	UGG 10.8
CUU 11.9	CCU 16.7	CAU 6.3	CGU 59.0
CUC 0.01	CCC 0.4	CAC 13.0	CGC 5.2
CUA 4.8	CCA 26.7	CAA 35.6	CGA 1.9
CUG 0.7	CCG 26	CAG 2.2	CGG 0.01
AUU 61.5	ACU 24.1	AAU 16.7	AGU 10.8
AUC 6.7	ACC 0.0	AAC 18.9	AGC 2.6
AUA 0.4	ACA 38.2	AAA 73.0	AGA 7.0
AUG 27.8	ACG 1.1	AAG 1.1	AGG 0.7
GUU 35.2	GCU 41.9	GAU 30.4	GGU 80.1
GUC 0.01	GCC 1.1	GAC 11.5	GGC 3.7
GUA 39.3	GCA 24.1	GAA 47.5	GGA 3.0
GUG 3.0	GCG 1.1	GAG 0.4	GGG 1.5

La scelta dei codoni è stata fatta in modo da ottenere un valore CAI (“codon adaptation index”) di circa 0.8 (un valore CAI=1.0 significa che è stato scelto solo il codone più frequente).

Successivamente è stata disegnata una cassetta di espressione costituita dalla sequenza del gene His₆-E7GGG ottimizzato posta tra il promotore psbD e la sua 5’UTR e il terminatore psbA con la sua 3’UTR e i siti di restrizione necessari per il clonaggio nel vettore per la trasformazione plasmidiale. Inoltre, la presenza dei siti *NdeI* ed *EcoRI* tra il gene His₆-E7GGG e le sequenze regolatrici permette di sostituire questo gene con altre sequenze che si intende esprimere nel genoma plasmidiale di *C. reinhardtii*.

L’intera cassetta di espressione è stata fatta sintetizzare alla GenScript Co. ed è stata fornita dalla ditta all’interno del vettore pUC57.

Mediante digestione con gli enzimi di restrizione *XmaI* e *NotI*, la cassetta sintetica è stata clonata nel vettore pCG1 ottenendo il costrutto pCG1-cassetta sintetica-X/N (**figura 38A**).

Mediante digestione con gli enzimi di restrizione *SacI* e *SacII*, la cassetta sintetica è stata clonata nel vettore pCG1 nell’orientazione opposta, ottenendo il costrutto denominato

pCG1-cassetta sintetica-S/S (**figura 38B**)

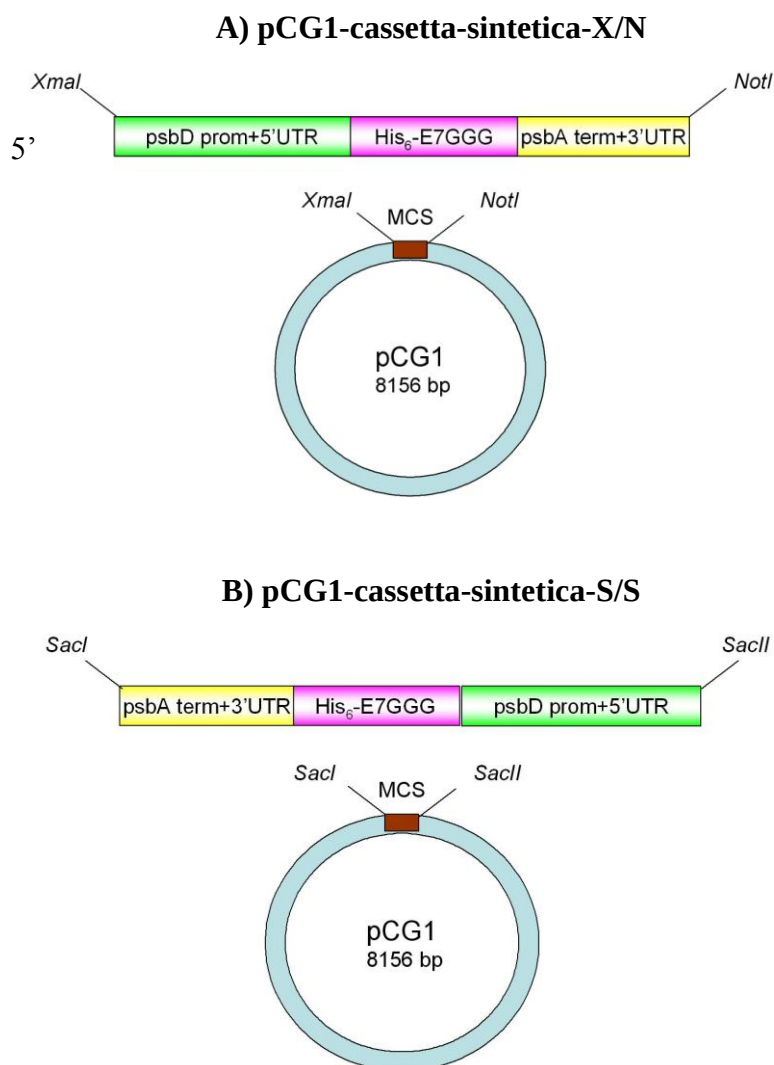


Figura 38. Schematizzazione dei costrutti per la trasformazione plastidiale di *C. reinhardtii*

L'inserzione della cassetta sintetica nel vettore pCG1 nelle due diverse orientazioni è stata verificata mediante PCR da colonia con i seguenti oligonucleotidi:

MCS 325 Dir (5' TCTTTATGTATTATATTTTA 3')

MCS 544 Rev (5' TATTAAAAAATAAAAAAACT 3')

che appaiano rispettivamente, a monte e a valle del MCS.

Alcuni cloni positivi in PCR sono stati verificati mediante sequenziamento con la stessa coppia di oligonucleotidi.

3.12.3.2 Trasformazione del cloroplasto

La trasformazione del cloroplasto è stata eseguita sul ceppo cw15, mediante il metodo delle “glass beads” modificato (Kindle *et al.*, 1991) rispetto a quello descritto per la trasformazione nucleare nel paragrafo 3.12.2.2. Le modifiche apportate sono le seguenti:

- invece di 1 µg di DNA plasmidico linearizzato sono stati usati 5 µg di DNA plasmidico superavvolto
- non è stato aggiunto PEG 6000
- le cellule sono state piastrate su terreno selettivo TAP+Agar 1% + spectinomycin e incubate a 23°C direttamente alla luce (la spectinomycin non è fotolabile)
- una volta comparse le colonie dei trasformanti, si è proceduto ad ulteriori cicli di selezione su terreno con antibiotico al fine di ottenere l'omeoplasma. Sono stati effettuati circa 10 passaggi su terreno solido (contenente spectinomycin 100 µg/ml), intervallati da qualche ciclo su terreno liquido (contenente spectinomycin 20 µg/ml).

3.12.3.3 Verifica dell'inserzione del DNA esogeno nel genoma plastidiale

Da colture di 20 ml di 13 trasformanti plastidiali alla fine della fase esponenziale di crescita, è stato estratto il DNA totale con il "Plant easy mini kit", Qiagen. 10 ng del DNA estratto è stato sottoposto ad amplificazione con una coppia di oligonucleotidi che riescono a produrre un amplificato solo nel caso in cui la regione del vettore pCG1 compresa tra le regioni omologhe al genoma plastidiale si sia integrata. Gli oligonucleotidi usati sono i seguenti:

Chloroplast 157044 Dir

5' ACAACTAAAATTGTTAGTTTCTT 3'

pCG1-6694 Rev

5' TGCCTCTAATAAAGTCATCG 3'

Le condizioni della reazione di PCR sono le seguenti:

5' a 95°C (denaturazione)	
1' a 95°C (denaturazione)	} 30 cicli
2' a 55°C (appaiamento)	
4' a 72°C (elongazione)	
5' a 72°C (elongazione).	

3.12.3.4 Preparazione degli estratti, analisi dell'espressione e quantificazione della proteina E7GGG nei trasformanti plastidiali

Le proteine solubili totali sono state estratte da pellet cellulari ottenuti da colture di trasformanti arrivate alla fine della fase esponenziale di crescita.

I pellet di 4 ml di coltura sono stati risospesi in 200 µl di tampone GB con inibitori di proteasi e Triton X-100 1% o PBS con inibitori di proteasi, agitati su vortex per 20" e

congelati e scongelati in N₂ liquido per 3 volte. Per i campioni preparati con il tampone PBS la rottura delle cellule è stata ottenuta aggiungendo alle provette 100 µl di glass beads e sottoponendole ad agitazione meccanica per 2' a frequenza di 30 Herz mediante l'impiego del "tissue lyzer" (MM300, Retsch). In seguito i campioni sono stati centrifugati a 16000 g per 10' ed il sovrnatante è stato recuperato.

Le TSP estratte con entrambi i tamponi sono state quantificate con il metodo Bradford.

Per la corsa su gel SDS-PAGE il sovrnatante è stato addizionato di gel loading buffer e bollito per 5'.

L'analisi della presenza della proteina E7GGG è stata condotta mediante immunoblotting impiegando l'anticorpo primario pAb α-E7 seguito dall'anticorpo secondario pAb α-mouse HRP.

La quantificazione della proteina E7GGG prodotta nei trasformanti plastidiali è stata condotta in immunoblotting impiegando l'anticorpo primario pAb α-E7 seguito dall'anticorpo secondario pAb α-mouse HRP, mediante comparazione del segnale ottenuto dai trasformanti con il segnale ottenuto da diverse quantità di proteina His6-E7GGG purificata da *E. coli*.

C) USO DI PROTEINE VEGETALI COME "CARRIER" PER INCREMENTARE L'IMMUNOGENICITA' DELL'ANTIGENE E7 PER LA PRODUZIONE DI VACCINI TERAPEUTICI CONTRO LE LESIONI ASSOCIATE AD HPV

3.13 REALIZZAZIONE DI MUTANTI GENICI DELLA SAPORINA APOPLASTICA FOGLIARE DI *Saponaria officinalis*

3.13.1 Mutagenesi del sito catalitico della saporina

Il gene che codifica per la saporina apoplastica fogliare (GenBank AAZ79489.1) di *Saponaria officinalis* è stato fornito dalla Prof.ssa Laura Spanò, Università dell'Aquila, nel vettore pBS (costrutto pBS-apoSAP). Tale gene è stato mutagenizzato in due punti nella regione corrispondente al sito catalitico con il Quik Change II kit (Stratagene), come schematizzato in **figura 39**, impiegando i seguenti oligonucleotidi

SAP DIR MUT KQ

5'-CTATTCAGATGACGGCTAAGGCAGCGCAGTTTAGGTACATAC-3'

SAP REV MUT KQ

5'-GTATGTACCTAAACTGCGCTGCCTIAGCCGTCATCTGAATAGC-3'

Questi oligonucleotidi inseriscono delle mutazioni puntiformi (in rosso) in 2 codoni (sottolineati) nel sito catalitico della saporina che portano alle seguenti mutazioni

amminoacidiche:

E176 > K (acido glutammico in posizione 176 sostituito con lisina)

R179 > Q (arginina in posizione 179 sostituita con in glutamina). Il gene mutagenizzato è denominato apoSAPKQ

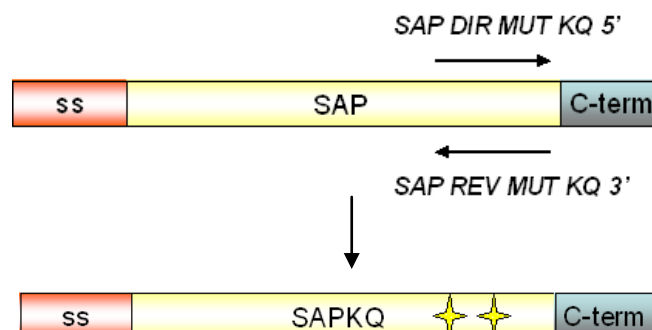


Figura 39. Schematizzazione della mutagenesi del gene della saporina apoSAP.

La procedura di base per la mutagenesi secondo il kit (schematizzata in **figura 39**), prevede l'uso del DNA stampo a doppio filamento contenente il gene di interesse isolato da un ceppo (*dam*⁺) di *E. coli* e dei due oligonucleotidi di sintesi contenenti le mutazioni desiderate. L'incorporazione degli oligonucleotidi genera filamenti circolari con un "nick" contenenti le mutazioni ma non metilati. L'endonucleasi *DpnI* (sequenza target: 5'-Gm6ATC-3'), specifica per il DNA, opera, quindi, la digestione del DNA stampo parentale e seleziona il DNA neo-sintetizzato contenente le mutazioni. Il plasmide generato (contenente i "nick" e le mutazioni desiderate) viene quindi trasformato in XL1-Blue "supercompetent cells", che riparano i tagli.

Per l'amplificazione durante la mutagenesi sito-diretta è stato impiegato l'enzima *PfuTurbo* DNA polimerasi, derivante dall'archeobatterio marino ipertermofilo *Pyrococcus furiosus*. La frequenza di errore che caratterizza l'attività di tale enzima è pari a 1.3 errori introdotti ogni 10⁶ coppie di basi (2.6% di prodotti errati/reazione) contro un tasso pari a 8 x 10⁻⁶ (12% di prodotti errati/reazione) della Taq DNA polimerasi.

Reazione di mutagenesi sul template pBS-apoSAP:

- 5 µl buffer di reazione 10×
- 50 ng di DNA pQE30-E7
- 125 ng di oligonucleotide *SAP DIR MUT KQ*
- 125 ng di oligonucleotide *SAP REV MUT KQ*
- 1 µl di dNTP mix
- ddH₂O fino a volume (50 µl)
- 1 µl di *PfuTurbo* DNA polimerasi (2.5 U/µl)

La reazione di PCR è stata condotta nelle seguenti condizioni:

30'' a 95°C (denaturazione)
30'' a 95°C (denaturazione) } 18 cicli
1' a 55°C (appaiamento)
4' a 68°C (elongazione) *

* Il tempo di elongazione scelto in base alla lunghezza del vettore + inserto da amplificare (1' per ogni kb di DNA da amplificare), nel nostro caso circa 4 kb.

Le reazioni sono state incubate a 37°C per 1 ora per la digestione del DNA parentale metilato non mutato aggiungendo direttamente alla reazione di amplificazione 10 unità di enzima di restrizione *Dpn I*.

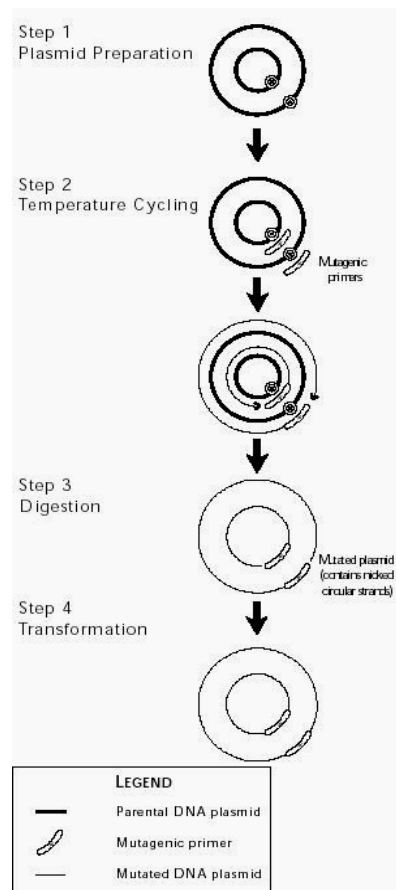


Figura 40. Procedura di mutagenesi mediante kit “Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit”

Trasformazione delle cellule *XL1-Blue* Supercompetenti:

Le cellule sono state trasformate con il metodo dello “shock” termico aggiungendo 1 µl del DNA trattato con *Dpn I*. Le cellule sono state fatte moltiplicare a 37 °C per 1 ora in terreno NZY+ e sono poi state piastrate su terreno LB + ampicillina contenente 80 µg/ml X-gal e 20 mM IPTG. Le piastre sono state incubate per 16 ore a 37°C.

L'autenticità della sequenza del gene SAP mutagenizzato (chiamato apoSAPKQ)

risultante è stata verificata mediante sequenziamento con gli oligonucleotidi commerciali T3 e T7 dopo aver estratto il DNA plasmidico dai cloni trasformati.

3.13.2 Modificazioni del gene apoSAPKQ

In natura la saporina apoplastica fogliare viene dapprima prodotta come pro-peptide, in forma enzimatica non attiva e solo successivamente processato mediante rimozione dell'estremità C-terminale, a produrre un enzima maturo; inoltre la saporina presenta all'estremità N-terminale una putativa sequenza segnale per l'indirizzamento nella via secretoria.

In questo lavoro si è proceduto alla rimozione della regione C-terminale e alla contemporanea aggiunta di siti di restrizione necessari per i successivi clonaggi.

Si è scelto di produrre 2 mutanti per delezione della saporina mutagenizzata (apoSAPKQ, **figura 41a**), uno contenente ancora la putativa sequenza segnale (ssSAPKQ, **figura 41b**) e l'altro senza sequenza segnale (SAPKQ, **figura 41c**).

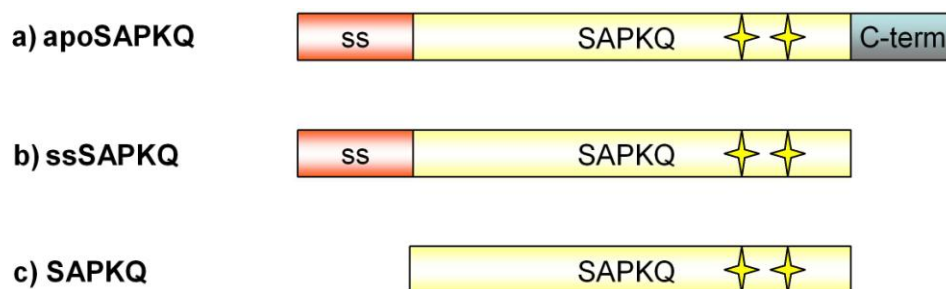


Figura 41. Rappresentazione delle diverse forme di saporina mutagenizzata

Per realizzare le due forme di saporina mancanti dell'estensione C-terminale, il gene apoSAPKQ è stato amplificato con due diverse coppie di oligonucleotidi:

COPPIA A: produce l'amplificato genico ssSAPKQ

-ssSAPKQ CPS DIR

GGCCATCGATCTGCAGGCATGCATCATGAAGATATATGTTGTAGCCAC

Cla I Pst I SphI Kozac inizio ssSAPKQ

-SAPKQ XS REV

GGCCCTCGAGGTCGACTCACTTTGGTTTGCCCAAATAC

Xho I Sal I stop fine ssSAPKQ (no C-term)

COPPIA B: produce l'amplificato genico SAPKQ

-SAPKQ CPS DIR

GGCCATCGATCTGCAGGCATGCATCATGGTCACATCAATCACATTAGATC

Cla I Pst I Sph I Kozac inizio SAPKQ (no ss)

-SAPKQ XS REV (descritto nella coppia A)

Gli amplificati ottenuti sono stati inseriti nel vettore pBS digerito *EcoRV* ottenendo i costrutti pBS-ssSAPKQ e pBS-SAPKQ.

3.14 REALIZZAZIONE DEI GENI DI FUSIONE TRA E7 E LA SAPORINA

Per la realizzazione delle fusioni tra il gene E7 e la saporina mutagenizzata è stata impiegata una forma del gene E7 mutagenizzato in tre posizioni nel sito legante pRB, denominato E7GGG, già disponibile nel nostro laboratorio clonato all'interno del vettore pPVX201 (costrutto pPVX-E7GGG).

3.14.1 Sequenze ssSAPKQ-E7GGG e SAPKQ-E7GGG

Le amplificazioni dei geni da assemblare sono state effettuate con l'enzima *Pfu Turbo* DNA polimerasi. Tale enzima, oltre a garantire un'alta fedeltà di amplificazione è, inoltre, privo di attività trasferasica terminale e genera, di conseguenza, sequenze di DNA con estremità troncate utili per il clonaggio intermedio nel vettore pBlueScriptSK(+) nel sito di restrizione *EcoRV*. Le miscele di PCR sono state così preparate:

- Tampone di reazione 1x (Stratagene)
- 250 µM di dNTP mix (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP e 10 mM dTTP)
- 10 pmoli di innesco diretto,
- 10 pmoli di innesco inverso,
- 100 ng di DNA templato,
- 1 unità di *Pfu Turbo* DNA polimerasi [2.5 U/µl] (Stratagene),
- H₂O deionizzata sterile a volume.

La miscela è stata incubata in termociclatore nelle seguenti condizioni:

5' a 94°C (denaturazione)	} 30 cicli
30'' a 94°C (denaturazione)	
30'' a 55°C (appaiamento)	
45'' a 72°C (elongazione)	
5' a 72°C (elongazione).	

-Per l'amplificazione della sequenza E7GGG sono stati impiegati il template pPVX-E7GGG e i seguenti oligonucleotidi

SAPKQ E7 DIR

TATTTGGGCAAACCAAAGCATGGAGATACACCTACATTGC
fine SAPKQ inizio E7GGG (dal 1° codone dopo ATG)

E7 XS REV

GGCCCTCGAGGTCGAC TTA TGG TTT CTG AGA ACA GAT GG
XhoI SalI stop fine E7GGG

L'oligonucleotide *SAPKQ E7 DIR* inserisce la regione finale del gene *SAPKQ* che serve per l'assemblaggio mentre l'oligonucleotide *7 XS REV* inserisce i siti di restrizione per i successivi clonaggi del costrutto di fusione (*XhoI* per il clonaggio in pVAX, *SalI* per il clonaggio in pQE-30 e pPVX201).

-Per l'amplificazione del gene ssSAPKQ sono stati impiegati il template pBS-ssSAPKQ e i seguenti oligonucleotidi

ssSAPKQ CPS DIR

GGCCATCGATCTGCAGGCATGCATCATG AAG ATA TAT GTT GTA GCC AC
Cla I Pst I SphI Kozac inizio ssSAPKQ

E7 SAPKQ REV

TGTAGGTGTATCTCCATGCTTTGGTTTGCCCAAATACATAAG
inizio E 7GGG fine SAPKQ

L'oligonucleotide *ssSAPKQ CPS DIR* inserisce i siti di restrizione per i successivi clonaggi del costrutto di fusione (*ClaI* per il clonaggio in pPVX201, *PstI* per il clonaggio in pVAX e *SphI* per il clonaggio in pQE-30) mentre l'oligonucleotide *E7 SAPKQ REV* inserisce la regione iniziale del gene E7GGG che serve per l'assemblaggio.

-Per l'amplificazione del gene *SAPKQ* sono stati impiegati il template pBS-SAPKQ e gli oligonucleotidi *E7 SAPKQ REV* (appena descritto) e

SAPKQ CPS DIR

GGCCATCGATCTGCAGGCATGCATCATGGTCACATCAATCACATTAGATC
Cla I Pst I SphI Kozac inizio SAPKQ

L'oligonucleotide *SAPKQ CPS DIR* inserisce i siti di restrizione per i successivi clonaggi del costrutto di fusione (*ClaI* per il clonaggio in pPVX201, *PstI* per il clonaggio in pVAX e *SphI* per il clonaggio in pQE-30) mentre l'oligonucleotide *E7 SAPKQ REV* inserisce la regione iniziale del gene E7GGG che serve per l'assemblaggio

Gli amplificati ottenuti sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio, purificati da gel con il kit GFX GE-Healthcare e assemblate mediante "splicing by overlap extension PCR" (SOE-PCR) (per l'ottenimento della sequenza ssSAPKQ-E7GGG sono stati impiegati gli amplificati E7GGG e ssSAPKQ, mentre per l'ottenimento della sequenza SAPKQ-E7GGG sono stati impiegati gli amplificati E7GGG e SAPKQ).

Tale tecnica prevede una serie di cicli di reazione catalizzati dalla *Pfu Turbo* DNA polimerasi.

La miscela di reazione contenente:

- Tampone di reazione 1x (Stratagene),
- 250 µM di dNTPs (GE Healthcare),
- le sequenze di DNA da assemblare in rapporto molare 1:1,
- 1 unità di *Pfu Turbo* DNA polimerasi [2.5 U/µl] (Stratagene)
- H₂O deionizzata sterile, fino a volume

è stata incubata in termociclatore nelle seguenti condizioni:

2' a 94°C (denaturazione)	} 7 cicli
1' a 94°C (denaturazione)	
4' a 63°C (appaiamento ed elongazione)	

I prodotti di fusione sono stati successivamente amplificati mediante PCR utilizzando gli oligonucleotidici specifici ssSAPKQ *CPS DIR* o *SAPKQ CPS DIR* e *E7 XS REV* in grado di amplificare solo i prodotti di fusione e non i singoli geni, nelle medesime condizioni di reazione descritte all'inizio del paragrafo).

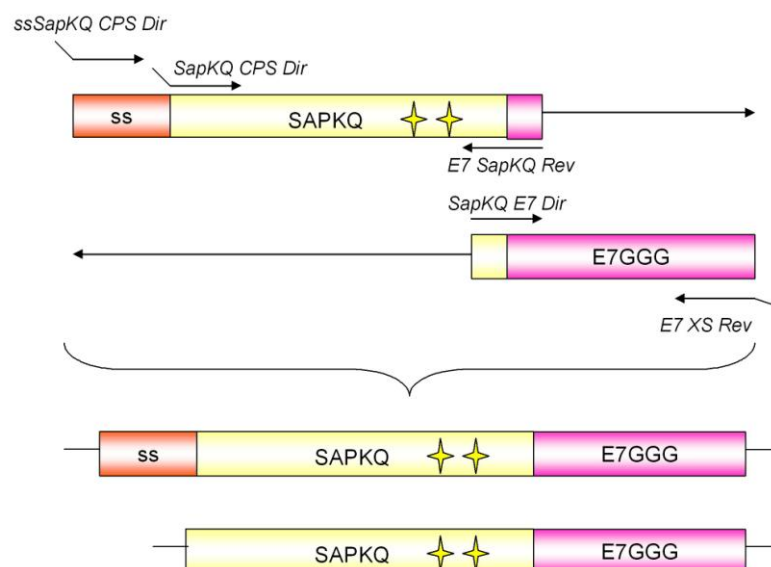


Figura 42. Schema dell'ottenimento delle sequenze di fusione ssSAPKQ-E7GGG e SAPKQ-E7GGG

3.14.2 Sequenza E7GGG-SAPKQ

Per la realizzazione del gene di fusione nel quale il gene E7GGG si trova a monte del gene della saporina, si è operato come descritto per le fusioni ssSAPKQ-E7GGG e SAPKQ-E7GGG ma con diversi oligonucleotidi nei vari punti.

-Per l'amplificazione della sequenza E7GGG sono stati impiegati il template pPVX-E7GGG e i seguenti oligonucleotidi:

E7 CPS DIR

GGCCATCGATCTGCAGGCATGCATCATGCGAGATACACCTACATT

Cla I Pst I Sph I Kozac inizio E7 N-term (compreso 1° ATG)

SAPKQ E7 REV

TAATGTGATTGATGTGACTGGTTTCTGAGAACAGATGGG

Inizio SAPKQ (escluso il 1° ATG) fine E7GGG

L'oligonucleotide *E7 CPS DIR* inserisce i siti di restrizione per i successivi clonaggi del costrutto di fusione (*ClaI* per il clonaggio in pPVX201, *PstI* per il clonaggio in pVAX e *SphI* per il clonaggio in pQE-30) mentre l'oligonucleotide *SAPKQ E7 REV* inserisce la regione iniziale del gene SAPKQ che serve per l'assemblaggio.

-Per l'amplificazione della sequenza SAPKQ sono stati impiegati il template pBS-SAPKQ e i seguenti oligonucleotidi

E7SAPKQ DIR che inserisce la regione finale del gene E7GGG
 ATCTGTTCTCAGAAACCAAGTCACATCAATCACATTAGATC
 Fine E7GGG inizio SAPKQ

SAPKQ XS REV

GGCCCTCGAGGTCGACTCACTTTGGTTTGCCCAAATAC
 Xho I Sal I stop fine ssSapoAKQ (no C-term)

L'oligonucleotide E7SAPKQ DIR inserisce la regione finale del gene E7GGG che serve per l'assemblaggio mentre SAPKQ XS REV i siti di restrizione per i successivi clonaggi del costrutto di fusione (*XhoI* per il clonaggio in pVAX, *SalI* per il clonaggio in pQE-30 e pPVX201).

Gli amplificati ottenuti sono stati assemblate mediante SOE-PCR come descritto nel paragrafo precedente e i prodotti di fusione sono stati successivamente amplificati utilizzando gli oligonucleotidici specifici *E7 CPS DIR* e *SAPKQ XS REV* in grado di amplificare solo i prodotti di fusione e non i singoli geni.

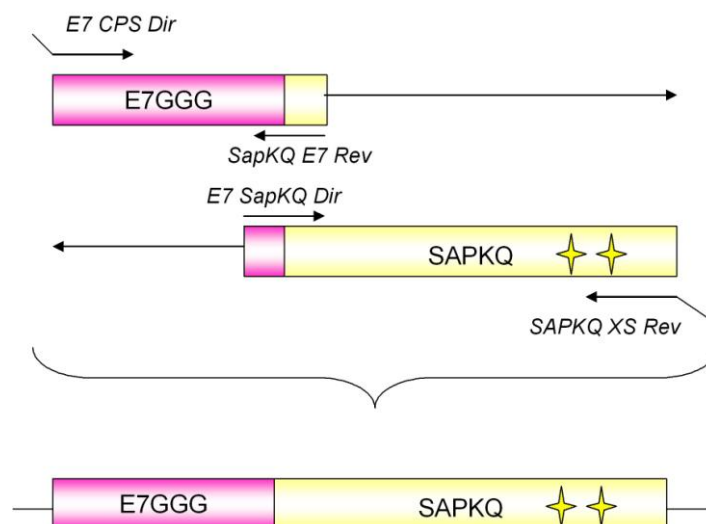


Figura 43. Schema dell'ottenimento della sequenza di fusione E7GGG-SAPKQ

3.14.3 Clonaggio delle sequenze di fusione nel vettore intermedio pBS

Le tre sequenze di fusione ottenute da assemblaggio (ssSAPKQ-E7GGG, SAPKQ-E7GGG ed E7GGG-SAPKQ) sono state sottoposte ad elettroforesi su gel d'agarosio e le

bande corrispondenti ai frammenti genici di interesse sono state estratte ed il DNA è stato purificato.

Tutte le sequenze sono state clonate nel vettore pBS digerito con l'endonucleasi di restrizione *EcoRV*, che genera estremità "piatte", per consentire l'inserimento dei frammenti genici amplificati con la *Pfu Turbo* DNA polimerasi.

I trasformanti batterici sono stati poi verificati mediante PCR su colonia con gli oligonucleotidi universali T3 e T7 e alcuni cloni positivi sono stati sequenziali per verificare l'autenticità delle sequenze. I costrutti ottenuti sono indicati come pBS-ssSAPKQ-E7GGG, pBS-SAPKQ-E7GGG e pBS-E7GGG-SAPKQ.

3.15 PRODUZIONE DELLA SAPORINA MUTAGENIZZATA E DELLE PROTEINE DI FUSIONE IN *E. coli*

3.15.1 Preparazione dei costrutti e trasformazione delle cellule batteriche

Per l'espressione in batterio delle proteine fuse ad un "tag" di istidine (His₆), i geni dei mutanti della saporina SAPKQ, ssSAPKQ e i geni di fusione ssSAPKQ-E7GGG, SAPKQ-E7GGG e E7GGG-SAPKQ, sono stati excisi dai costrutti ottenuti nel vettore pBS mediante gli enzimi di restrizione *SphI/SalI* e ligati nel vettore pQE-30 digerito con la stessa coppia di enzimi. I costrutti ottenuti, pQE30-ssSAPKQ, pQE30-SAPKQ, pQE30-ssSAPKQ-E7GGG, pQE30-SAPKQ-E7GGG e pQE30-E7GGG-SAPKQ, sono stati impiegati per trasformare cellule di *E. coli* XL1 blue competenti. I trasformanti batterici sono stati poi verificati mediante PCR su colonia con gli oligonucleotidi *pQE-30 Dir* e *pQE-30 Rev*.

3.15.2 Induzione dell'espressione delle proteine ricombinanti

Singole colonie di *E. coli* trasformate con i diversi costrutti sono state inoculate in 5 ml (piccola scala) o 50 ml (media scala) di terreno LB contenente ampicillina e fatte crescere per 16 ore a 37 °C in agitazione a 250 rpm. Ogni coltura è stata poi diluita in 100 (piccola scala) o 1000 (media scala) ml dello stesso terreno e lasciata crescere fino a una densità ottica a 600 nm (OD_{600nm}) di 0.6. Prima di procedere all'induzione è stata prelevata un'aliquota (1 ml) di coltura batterica. Il volume restante è stato quindi indotto con 1 mM di IPTG e incubato a 30°C in agitazione (250 rpm) per 3 ore. Dopo l'induzione un'altra aliquota (1 ml) è stata conservata; essa è stata corsa su gel SDS-PAGE insieme a quella prelevata precedentemente, per verificare l'avvenuta induzione.

3.15.3 Purificazione delle proteine ricombinanti mediante IMAC

La purificazione delle proteine ricombinanti fuse alla coda di istidine prodotte in *E. coli* è stata condotta in condizioni denaturanti secondo il protocollo “The QIAexpressionist”, Qiagen. La purificazione delle proteine di fusione ssSAPKQ-E7GGG, SAPKQ-E7GGG e E7GGG-SAPKQ è stata condotta su piccola scala mentre la purificazione delle proteine ssSAPKQ e SAPKQ è stata condotta su media scala.

Il pellet batterico derivante da 100 ml (piccola scala) o 1 l (media scala) di coltura indotta è stato risospeso con una quantità opportuna di tampone di lavaggio B (5 ml/g di *E. coli*). Sono stati aggiunti: NaCl 0.3 M e TRITON X-100 1%. Il pellet così trattato è stato lasciato su ruota a temperatura ambiente (RT) per circa 1 ora, in modo da far avvenire la lisi delle membrane, sonicato e centrifugato come descritto nel paragrafo 3.9.8. Il lisato è stato poi incubato con la resina per 1 ora a temperatura ambiente e in seguito trasferito in colonna di polipropilene. I lavaggi sono stati effettuati con 20 o 100 ml di tampone B seguiti da 20 o 100 ml di tampone C, mentre l’eluizione della proteina è stata ottenuta mediante l’aggiunta di 3 ml di tampone D (raccogliendo 3 frazioni da 1 ml, chiamate D1, D2 e D3) e di 4 ml di tampone E (raccogliendo 6 frazioni da 0.5 ml, chiamate E1, E2, E3, E4, E5, E6 e una da 1 ml, chiamata E7).

I tamponi utilizzati per la purificazione in condizioni denaturanti sono descritti nel paragrafo 3.9.8

3.15.4 Analisi delle proteine purificate mediante colorazione con blu di Coomassie e immunoblotting

Le frazioni di eluizione raccolte dopo aggiunta di “gel loading buffer” e bollitura sono state sottoposte a corsa elettroforetica, vicino a concentrazioni note BSA, seguita da colorazione del gel con Blu di Coomassie R 250 0.1% in 40 % metanolo, 10 % acido acetico per circa 30 minuti. Il gel è stato quindi decolorato con soluzione di "destaining" (40% metanolo, 20% acido acetico). Tutti i passaggi sono stati svolti in leggera agitazione.

Alternativamente il gel è stato trasferito su membrana di PVDF come descritto in precedenza e incubato con gli anticorpi primari pAb α -E7 e/o pAb α -SAP, e successivamente con gli anticorpi secondari pAb α -mouse HRP o pAb α -rabbit HRP, rispettivamente. Lo sviluppo è stato condotto con il substrato ECL plus già descritto.

3.16 REALIZZAZIONE DI VACCINI GENETICI BASATI SULLE SEQUENZE DI FUSIONE TRA E7 E LA SAPORINA

3.16.1 Preparazione dei costrutti per la vaccinazione genetica

Per ottenere i costrutti da impiegare nella vaccinazione genetica i geni di fusione ssSAPKQ-E7GGG, SAPKQ-E7GGG e E7GGG-SAPKQ e i geni SAPKQ e E7GGG (come controlli per gli esperimenti di vaccinazione) sono stati excisi dai costrutti ottenuti nel vettore pBS mediante gli enzimi di restrizione *PstI/XhoI* e ligati nel vettore pVAX1 digerito con la stessa coppia di enzimi.

I costrutti ottenuti, pVAX1-ssSAPKQ-E7GGG, pVAX1-SAPKQ-E7GGG, pVAX1-E7GGG-SAPKQ, pVAX1-SAPKQ e pVAX1-E7GGG sono stati impiegati per trasformare cellule di *E. coli* XL1 blue competenti. I trasformanti batterici sono stati poi verificati mediante PCR su colonia con gli oligonucleotidi *T7* (come innesco diretto) e *SAPKQ XS REV* (come innesco inverso nei costrutti SAPKQ e E7GGG-SAPKQ) o *E7 XS REV* (come innesco inverso nei costrutti ssSAPKQ-E7GGG, SAPKQ-E7GGG ed E7GGG).

3.16.2 Maxi-preparazione di DNA plasmidico in assenza di endotossine

E' stato utilizzato il "Plasmid Maxi kit LPS ('Lipopolysaccharide')-free" (Qiagen), secondo il protocollo della casa produttrice, impiegando materiali appositamente trattati per la rimozione delle endotossine batteriche in quanto la contaminazione del DNA plasmidico con endotossine o lipopolisaccaridi batterici potrebbe inficiare il processo di trasfezione.

3.16.3 Verifica dell'espressione delle proteine di fusione in cellule di mammifero

3.16.3.1 Preparazione delle cellule HEK-293

Le cellule della linea HEK-293 sono state seminate in una "flask" da 75 cm² contenente 15 ml di terreno DMEM completo alla temperatura di 37 °C. Tali cellule vivono in aderenza sul materiale plastico emettendo prolungamenti citoplasmatici. Esse sono state coltivate in incubatore a 37 °C, in presenza di CO₂ al 5% e del 94% di umidità relativa, fino al raggiungimento di una confluenza del 100%. Al momento della trasfezione esse devono avere una confluenza di circa 40%. Dopo aver allontanato il terreno di coltura il tappeto di cellule è stato sottoposto a tre lavaggi con PBS 1X sterile freddo e, subito dopo a tripsinizzazione (400 µl di tripsina 1X) per permettere il loro distacco dal fondo della fiasca; le cellule sono state poi risospese in un piccolo volume (1-2 ml) di terreno. Una volta in sospensione sono state centrifugate a 1000 g per 5 minuti, il sovranatante è stato

allontanato ed il pellet è stato risospeso in terreno completo considerando le opportune diluizioni per l'ottenimento, il giorno successivo, di una confluenza del 40%. Sono state quindi seminate in una piastra da 6 pozzetti (1 ml di sospensione per ogni pozzetto) e lasciate crescere in incubatore tutta la notte.

3.16.3.2 Trasfezione delle cellule e analisi dell'espressione delle proteine

Per la trasfezione delle cellule di mammifero con il DNA esogeno di nostro interesse, è stato utilizzato il kit "Effectene Transfection Reagent" (Qiagen) operando come da protocollo. Il metodo impiegato prevede la condensazione del DNA plasmidico, diluito in un apposito tampone, il "DNA-condensation buffer", in presenza di un "enhancer". L'"Effectene", aggiunto successivamente, forma spontaneamente delle micelle lipidiche non-lisosomiali che vanno a catturare il DNA condensato e permettono il suo ingresso nelle cellule grazie a fusione con la membrana plasmatica.

La trasfezione è stata effettuata su cellule della linea HEK-293 cresciute, in presenza del terreno DMEM completo, alla confluenza del 40% in piastre da 6 pozzetti, impiegando circa 700 ng di DNA per pozzetto. Tale quantitativo di DNA è stato previamente diluito in tampone di condensazione sino al volume di 100 µl e incubato a 15-20°C per 5 minuti, in presenza di "enhancer" (nella quantità di 3.2 µl per pozzetto), per consentire un'ulteriore condensazione dell'acido nucleico, necessaria per il successivo inglobamento nelle vescicole lipidiche formate dall'"Effectene". Quest'ultimo è stato addizionato a ciascuna miscela (nella quantità di 10 µl per pozzetto) e mantenuto a contatto con il DNA condensato a temperatura ambiente per 10 minuti, tempo necessario per la formazione dei complessi. Sono poi stati aggiunti 600 µl di terreno DMEM completo e ogni preparazione è stata dispensata goccia a goccia nel rispettivo pozzetto già contenente 1,5 ml di terreno fresco.

Per ogni costrutto (pVAX-ssSAPKQ-E7GGG, pVAX-SAPKQ-E7GGG e pVAX-E7GGG-SAPKQ) dopo 24 ore è stato aggiunto l'inibitore del proteasoma MG-132 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) alla concentrazione di 12.5 µM in dimetilsolfossido (DMSO) in modo da evitare il processo di degradazione proteasomale cellulare ubiquitina-mediato.

A 48 ore dalla trasfezione sono stati eseguiti 3 lavaggi con PBS 1X fresco; le cellule sono state poi raccolte con una spatolina e dopo aver rimosso il mezzo condizionato mediante centrifugazione a 800 rpm per 5 minuti, è stato aggiunto il tampone di caricamento per corsa su gel SDS-PAGE. I campioni sono stati bolliti per circa 10 minuti e analizzati mediante immuno-blotting.

3.17 VACCINAZIONI TERAPEUTICHE A DNA IN MODELLO PRECLINICO

3.17.1 Preparazione del DNA plasmidico per le immunizzazioni

L'estrazione del DNA plasmidico è stata effettuata mediante gradiente di cloruro di cesio con aggiunta di bromuro d'etidio.

I batteri trasformati sono stati coltivati in terreno liquido tipo "terrific broth", addizionato con ampicillina 50 µg/ml, per 24 ore a 37 °C in agitazione (250 rpm). Le colture sono state centrifugate a 2500 rpm per 30' a 4 °C ed il "pellet" batterico è stato risospeso in 100 ml di tampone T.N.E. (Tris-HCl 10mM + NaCl 100mM + EDTA 1 mM pH 8,) e ricentrifugato a 12000 rpm per 10 min a 4 °C. Il pellet è stato quindi risospeso in 20 ml di tampone di lisi (50 mM glucosio; 25 mM Tris-Cl pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8.0) + lisozima (10 mg/ml), sono stati poi aggiunti NaOH 0.2 N e SDS 1% e successivamente acetato di potassio e acido acetico glaciale freddi (5 M potassio acetato 60 ml, acido acetico glaciale 11.5 ml, H₂O 28.5ml). Si è proceduto quindi, ad una nuova centrifugazione a 12000 rpm per 20' a 4 °C. Il sovranatante è stato filtrato attraverso garze sterili, sono stati poi aggiunti 0.6 volumi di isopropanolo. Dopo un'incubazione di 15' si è effettuata una nuova centrifugazione, analoga alla precedente. Il pellet è stato lavato con etanolo al 70% e centrifugato come sopra, quindi lasciato asciugare e risospeso in 6 ml di tampone TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). E' stato poi aggiunto 1g/ml di CsCl + 0.5 ml di Bromuro di etidio 10mg/ml ed è stata effettuata una centrifugazione per 5' a 8000 x g a temperatura ambiente. Il supernatante è stato trasferito in una provetta per ultracentrifuga e si è effettuata una ultracentrifugazione a 60000 rpm per 18-20 ore. E' stata poi raccolta la banda del gradiente con una siringa ed il DNA è stato lavato più volte con butanolo e quindi dializzato contro TE per 12 ore. Il dializzato è stato poi incubato a -20°C per 12 ore in 1/10 di volume di sodio acetato 3 M e 2,5 volumi di etanolo al 100%. E' seguita centrifugazione a 12000 rpm a 4°C. Il pellet è stato lavato con etanolo al 70%, fatto asciugare e risospeso in H₂O. La concentrazione del DNA ottenuto è stata misurata spettrofotometricamente.

3.17.2 Cellule tumorali murine TC-1*

Le cellule tumorali TC-1, HPV16 positive, (donate da Robert Tindle, Sir Albert Sakzewski Virus Research Center, Royal Children's Hospital, Brisbane, Queensland, Australia) erano state ottenute mediante co-trasformazione di cellule epiteliali primarie di polmone di topi C57BL/6 con le proteine oncogene E6 e E7 dell'HPV16 e l'oncogene *ras* attivato (Lin *et al.*, 1996). Da questa linea, è stato ottenuto un clone cellulare

particolarmente aggressivo denominato TC-1* (Venuti *et al.*, 2009). Tale linea è stata coltivata in RPMI (Sigma) con l'aggiunta di L-glutamina 2 mM, sodio piruvato 1 mM, 10 U/ml di penicillina, 10 µg/ml di streptomicina, 10 % di siero bovino fetale e geneticina 400 µg/ml (GIBCO BRL).

La dose di cellule TC-1* in grado di indurre tumore sperimentale nell'animale era stata già valutata (5×10^3). Le cellule sono state staccate dalla fiasca con tripsina/EDTA che è stata poi allontanata centrifugando le cellule a 1200 rpm per 10 minuti. Le cellule sono state quindi portate ad una concentrazione di 5×10^3 in soluzione fisiologica e inoculate nei topi C57BL/6.

3.17.3 Scheda di vaccinazione terapeutica

Sono stati utilizzati topi di ceppo C57BL/6 (H-2^b; Charles River – Como, Italy), di sesso femminile, allevati all'interno del Centro Ricerche Sperimentali Regina Elena, di un'età compresa tra le 6 e le 8 settimane, con un peso variabile da 20 a 25 g, nutriti con mangimi controllati.

Per la valutazione della risposta biologica, dopo circa 8-10 giorni di permanenza nella gabbia sperimentale, i topi sono stati inoculati per via sottocutanea con una dose tumorigenica di cellule TC-1* (5×10^3 in 100 µl di soluzione fisiologica) sulla coscia. Tre giorni dopo l'inoculo tumorale sono stati iniettati i vaccini a DNA, mediante iniezione intramuscolare (100 µg di DNA plasmidico/topo in un volume di 100µl; i controlli sono stati allestiti vaccinando i topi con 100 µl di soluzione fisiologica). L'immunizzazione è stata ripetuta, con le stesse modalità, a distanza di una settimana dal primo inoculo. Gli animali sono stati esaminati due volte la settimana per l'eventuale valutazione di neoformazioni di origine neoplastica. Dopo circa 50 giorni gli animali sono stati anestetizzati per effettuare un prelievo di sangue e quindi sacrificati mediante dislocazione cervicale.

Per la valutazione delle risposte umorali e cellulo-mediate gli animali sono stati immunizzati con le stesse modalità sopra descritte, in assenza di sfida tumorale .

3.18 VALUTAZIONE DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE IN SEGUITO A VACCINAZIONE

3.18.1 Valutazione della selezione di cloni linfocitari secernenti IFN-γ

3.18.1.1 Estrazione degli splenociti

Le milze prelevate dai topi utilizzati negli esperimenti, sono state sminuzzate in RPMI mediante un setaccio e un pestello, quindi centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti. Il pellet

è stato risospeso in ACK lysing buffer (NH_4CL 0.15 M, KHCO_3 1 mM, Na_2EDTA 0.1 mM, pH 7.2), 5 ml/milza e quindi centrifugato come sopra, le cellule sono state quindi risospese in RPMI/siero fetale bovino e contate nella camera di Thoma.

3.18.1.2 “Enzyme-linked Immunospot assay” (ELISPOT)

L'induzione di linfociti T citotossici determinata dall'immunizzazione ed in particolare il numero di linfociti splenici produttori $\text{IFN-}\gamma$ in risposta all'epitopo specifico, è stata valutata una settimana dopo l'ultima somministrazione vaccinale con la tecnica dell'ELISPOT. 2×10^5 splenociti isolati da ciascun gruppo di animali vaccinati con i differenti costrutti sono stati risospesi in 100 μl di terreno RPMI + 10% di siero fetale bovino (FBS) (GIBCO BRL) in presenza di interleuchina 2 (50 unità/ml; Sigma-Aldrich, Milan, Italy) e incubati in una piastra da microtitolazione da 96 pozzetti (Millipore, Bedford, MA, USA). Tale piastra era stata precedentemente incubata per 24 ore a 4 °C con un anticorpo di ratto anti- $\text{IFN-}\gamma$ di topo (clone R4-6A2, 8 $\mu\text{g/ml}$; BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA, USA) in un volume totale di 100 μl /pozzetto di D-PBS (Dulbecco- Phosphate Buffered Saline, GIBCO BRL) a pH 7.2. I campioni sono stati incubati a 37 °C per 24-48 ore in presenza di 10 $\mu\text{g/ml}$ dell'epitopo CTL E7-specifico H-2D^b (aa 49-57, RAHYNIVTF) (Feltkamp *et al.*, 1993) contenente un epitopo di MHC di classe I per il rilevamento dei linfociti CD8^+ , per indurre il rilascio di $\text{IFN-}\gamma$ da parte delle cellule attivate in maniera specifica. Successivamente, le piastre sono state sottoposte a lavaggi in PBST ed incubate O.N. a 4 °C con un anticorpo biotinilato anti- $\text{IFN-}\gamma$ (clone XMG1.2, 2 $\mu\text{g/ml}$; BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA, USA) in 75 μl di PBST contenente 0.1 mg/ml ovalbumina.

Dopo un'altra serie di lavaggi, è stata aggiunta avidina coniugata a perossidasi di rafano (2.5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e gli “spots” sono stati sviluppati aggiungendo 3.3'-diaminobenzidine/peroxidase substrate (DAB) (Sigma Fast; Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA). Il numero degli aloni di colorazione è stato contato mediante osservazione diretta a basso ingrandimento.

3.18.2 Rivelazione degli anticorpi nei sieri degli animali immunizzati mediante ELISA

Gli anticorpi circolanti indotti nel siero degli animali dalle vaccinazioni sono stati quantificati mediante saggio ELISA. In ogni pozzetto di una piastra a 96 pozzetti sono stati distribuiti 100 μl di PBS contenenti 100 ng della proteina ricombinante His₆-E7

prodotta in *E. coli* ed incubati per 24 ore a 4 °C per permettere l'adsorbimento. Dopo 3 lavaggi con PBST ed 1 con PBS, i pozzetti sono stati saturati con 150 µl/pozzetto di MPBS 5% per 2 a 37 °C. Dopo ulteriori lavaggi, sono state aggiunte diluizioni 1:100 del siero degli animali in MPBS 2%. Dopo un'incubazione di 2 ore a 37°C e una nuova serie di lavaggi, si è proceduto con la rivelazione con l'anticorpo secondario pAb α -mouse HRP e lo sviluppo della reazione è stata condotta come già descritto.

3.19 PRODUZIONE DELLE PROTEINE DI FUSIONE TRA E7 E LA SAPORINA IN Pianta

3.19.1 Preparazione dei costrutti per l'espressione in pianta

Per ottenere i costrutti basati sul vettore pPVX201 da impiegare per l'espressione transiente delle proteine ricombinanti in pianta, i geni di fusione ssSAPKQ-E7GGG, SAPKQ-E7GGG e E7GGG-SAPKQ, sono stati excisi dai costrutti ottenuti nel vettore pBS mediante gli enzimi di restrizione *Clal/Sall* e ligati nel vettore pPVX201 digerito con la stessa coppia di enzimi.

I costrutti ottenuti pPVX-ssSAPKQ-E7GGG, pPVX-SAPKQ-E7GGG e pPVX-E7GGG-SAPKQ sono stati impiegati per trasformare cellule di *E. coli* XL1 blue competenti. I trasformanti batterici sono stati poi verificati mediante PCR su colonia con gli oligonucleotidi *PVX-back* e *PVX-for*.

3.19.2 Infezione delle piante di *N. benthamiana* ed analisi dell'espressione delle proteine di fusione

L'infezione delle piante di *N. benthamiana* con i costrutti pPVX-ssSAPKQ-E7GGG, pPVX-SAPKQ-E7GGG e pPVX-E7GGG-SAPKQ è stata condotta come già descritto per il costrutto pPVX-His₆-N (paragrafo 3.9.1). La preparazione degli estratti totali è stata condotta in tampone PBS (come descritto per l'analisi della proteina N, paragrafo 3.9.3) e in tampone GB (come descritto per M negli esperimenti successivi al "time course", paragrafo 3.9.3, con la differenza che i campioni sono stati sottoposti a bollitura per 5' in seguito ad aggiunta di "gel loading buffer"). Inoltre è stata effettuata un'estrazione delle proteine insolubili, mediante il tampone TEPT (come descritto per M negli esperimenti successivi al "time course", paragrafo 3.9.3). La presenza delle proteine di fusione è stata analizzata mediante "immunoblotting" impiegando l'anticorpo primario pAb α -E7 seguito dall'anticorpo secondario pAb α -mouse HRP come già descritto.

3.19.2.1 Estrazione dei fluidi intercellulari

I fluidi intercellulari (IF) sono stati estratti dalle foglie sistemiche di piante di *N. benthamiana* con i sintomi dell'infezione virale infettate con il costrutto pPVX-ssSAPKQ-E7GGG, pPVX-SAPKQ-E7GGG o pPVX201 ed analizzati mediante immunoblotting. Le foglie apicali recise, lavate in acqua ed infiltrate sotto vuoto con PBS 1x freddo contenente inibitori di proteasi. Le foglie infiltrate sono state rapidamente asciugate su Kleenex, poste in una siringa e centrifugate per 10 minuti a 1000 x g per l'estrazione dei IF. Tale metodica di solito produce una frazione con una contaminazione da proteine citoplasmatiche minima come verificato con saggio di attività della glucosio-6-fosfato deidrogenasi (De Wilde *et al.*, 1996). I fluidi intercellulari sono stati poi separati mediante SDS/PAGE ed analizzati mediante "immunoblotting" impiegando l'anticorpo primario pAb α -E7 seguito dall'anticorpo secondario pAb α -mouse HRP come già descritto.

4. RISULTATI

A) LE PIANTE PER LA PRODUZIONE DEGLI ANTIGENI N e M DEL SARS-CoV

4.1 PRODUZIONE IN PIANTA E ANALISI DELL'ANTIGENICITA' DELLA PROTEINA N

Precedentemente al presente lavoro di dottorato, nel nostro laboratorio era stata dimostrata la possibilità di esprimere la proteina N del SARS-CoV (la cui sequenza amminoacidica è riportata in **figura 44**) in pianta, in cellule di mammifero in coltura e in batterio (Demurtas *et al.*, manoscritto in preparazione).

HHHHHHSAMSDNGPQSNQRSAPRITFGGPTDSTDNNQNGGRNGARPKQRRPQGLPNNIASWFTALTQHG
KEELRFPRGQGVPIINTNSGPDDQIGYYRRATRVRGGDGKMKELSPRWYFYILGTGPEASLPYGANKEGI
VWVATEGALNTPKDHIGTRNPNNNAATVLQLPQGTTLPGFYAEGSRGGSQASSRSSSRSGNSRNSTPG
SSRGNSPARMASGGGETALALLLLDRLNQLSKVSGKGQQQQGQTVTKKSAAEASKKPRQKRTATKQYNV
TQAFGRRGPEQTQGNFGDQDLIRQGT DYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYHGAIKLD
DKDPQFKDNVILLNKHIDAYKTFPPTPEPKDKKKKTDEAQPLPQRQKKQPTVTLLPAADMDDFSRQLQNS
MSGASADSTQA

Figura 44. Sequenza amminoacidica della proteina N (431 aa).

In **viola** è riportato il “tag” di istidine aggiunto per la purificazione della proteina; in **arancio** sono indicati gli amminoacidi interposti (a funzione di braccio spaziatore) tra il “tag” e la sequenza della proteina N.

In questo lavoro si è cercato principalmente di dimostrare che la proteina prodotta in pianta mantiene le proprietà antigeniche della proteina originale e che potrebbe quindi essere impiegata per lo sviluppo di un test diagnostico della SARS a basso costo. A tal fine è stato necessario accumulare biomassa vegetale contenente la proteina N, quantificare le rese di proteina, purificare la proteina e allestire un test con sieri di pazienti affetti da SARS.

4.1.1 Infezione delle piante con il costrutto pPVX-His₆-N

Al fine di collezionare materiale vegetale esprimente la proteina N, piantine di *N. benthamiana* di circa quattro settimane sono state infettate con il DNA purificato del costrutto pPVX-His₆-N (infezione I) (**figura 45**) o con gli estratti contenenti particelle di virus ricombinante derivanti da foglie infettate (re-infezioni).

I primi sintomi sulle foglie inoculate si sono manifestati dopo circa 4 giorni (comparsa di punti o chiazze clorotiche). Dopo circa 7-10 giorni i sintomi si sono manifestati anche a livello sistemico, con le foglie apicali arricciate e le chiazze clorotiche presenti su tutta la superficie fogliare (**figura 46A**). Le foglie sistemiche sintomatiche e quelle inoculate delle diverse piante infettate sono state campionate separatamente e conservate a -80 °C.



Figura 45. Infezione primaria di una pianta di *N. benthamiana*.

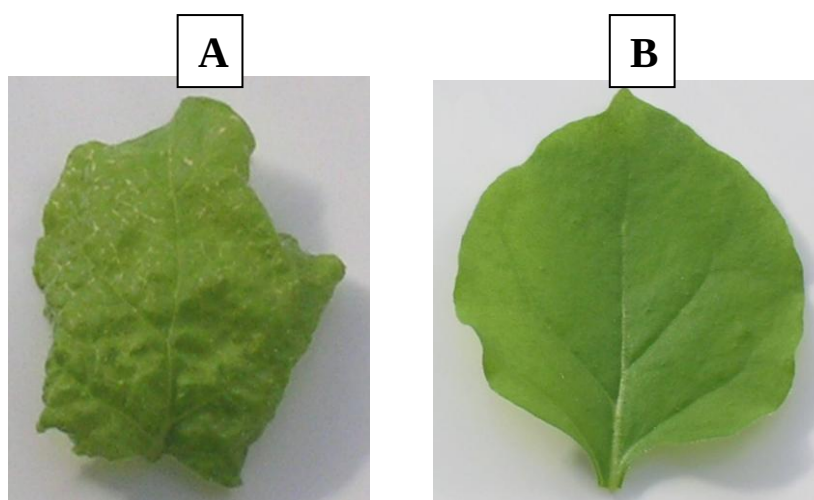


Figura 46. Foglie di *N. benthamiana*.

- A) Foglia sistemica con sintomi di infezione da PVX
- B) Foglia di pianta non infettata

4.1.2 Verifica della stabilità del costrutto pPVX-His₆-N

Per verificare la stabilità del costrutto pPVX-His₆-N nei diversi passaggi di infezione (dall'infezione I alla III) è stata analizzata la presenza della proteina N negli estratti provenienti dai diversi campionamenti.

La proteina viene prodotta in seguito ad infezione I così come II e III (in **figura 47** è mostrata la proteina N presente nelle foglie dell'infezione III), dimostrando che il costrutto pPVX-His₆-N è stabile e non ricombina, come spesso può avvenire con geni di grandi dimensioni come N.

Inoltre, la proteina prodotta in questo sistema risulta essere stabile e, a differenza della proteina prodotta in *E. coli* (figura 47 pozzetto 1), non si osservano prodotti di degradazione. La proteina risulta stabile anche dopo congelamento e scongelamento

dell'estratto e dopo conservazione per circa 3 anni sotto forma di materiale vegetale liofilizzato conservato a -20 °C (non mostrato).

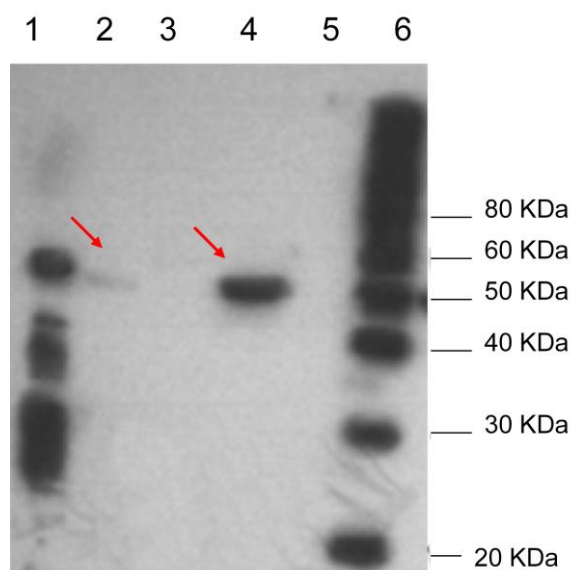


Figura 47. Espressione della proteina N in pianta (infezione III) (immunoblotting con pAb α -N rabbit).

1: Proteina His₆-N purificata da *E. coli* (100 ng); **2:** Estratto derivante da un “pool” di foglie **inoculate** della infezione III, ottenute a partire dal costrutto pPVX-His₆-N; **3:** Controllo negativo= Estratto derivante da un “pool” di foglie inoculate della infezione III, a partire dal plasmide pPVX201 “scarico”; **4:** Estratto derivante da un “pool” di foglie **sistemiche** della infezione III, ottenute a partire dal costrutto pPVX-His₆-N; **5:** Controllo negativo= Estratto derivante da “pool” di foglie sistemiche della infezione III, a partire dal plasmide pPVX201 “scarico”; **6:** Marcatore di peso molecolare (Magic Mark Invitrogen).

Peso molecolare della proteina His₆-N: 47 KDa

4.1.3 Quantificazione delle rese di proteina N nei tessuti vegetali

I livelli di espressione della proteina N nel materiale vegetale sono stati quantificati mediante TAS-ELISA, comparando i valori di assorbanza a 405 nm ottenuti per l'estratto vegetale con dei valori di riferimento costituiti dalla proteina N prodotta in *E. coli*, purificata e quantificata.

Dal grafico in **figura 48** si osserva che il valore della proteina N prodotta in pianta (colonna 2) è comparabile con 100 ng di proteina N prodotta in *E. coli* (colonna 8). Considerando che tale valore è ottenuto da 100 μ l di estratto derivante da 33 mg di tessuto fresco e contenente all'incirca 250 μ g di TSP, si può affermare che le rese di proteina N in pianta sono di circa 3.3 μ g/g tessuto fresco, corrispondente allo 0.04 % TSP. Questo valore è stato ottenuto dalla media dei valori di 17 piante ed è riproducibile ogni qual volta si analizzano dei “pool” di materiale proveniente da diverse piante. Piante analizzate singolarmente mostrano invece una variabilità nei livelli di produzione della proteina ricombinante (spesso tipica della tecnologia basata sui vettori virali di prima generazione come il pPVX).

Bisogna comunque considerare che la quantificazione mostrata probabilmente sottostima il reale livello di espressione della proteina N, in quanto si basa sul confronto del segnale ottenuto con anticorpi policlonali (pAb α -N rabbit e mouse) sull'estratto vegetale contenente la proteina N e quello ottenuto sulla proteina N prodotta e purificata da *E. coli*. Infatti, entrambi gli anticorpi impiegati sono stati ottenuti da conigli o topi immunizzati con la proteina prodotta in *E. coli* e potrebbero essere quindi più reattivi verso di essa rispetto alla proteina prodotta in un sistema diverso (la pianta).

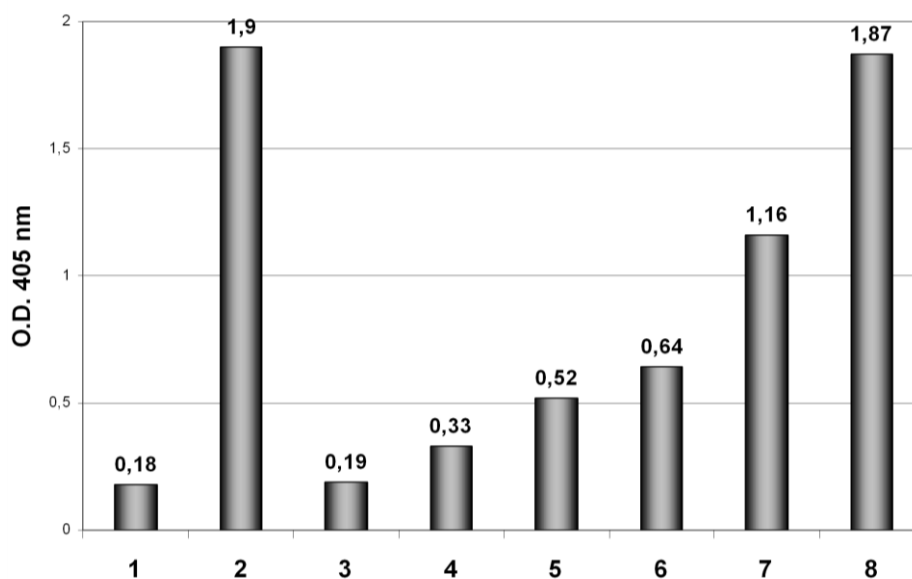


Figura 48. Quantificazione della proteina N prodotta in pianta.

Sono rappresentati i valori di densità ottica a 405 nm ottenuti in TAS-ELISA dopo 1 ora dallo sviluppo.

1: Controllo negativo= estratto derivante da piante infettate con il plasmide pPVX201 “scarico”; **2:** estratto derivante da piante infettate con il costrutto pPVX-His₆-N e re-infettate; **3-8:** proteina N prodotta in *E. coli* (0,5, 2, 5, 20, 50, 100 ng rispettivamente).

4.1.4 Purificazione della proteina N

Grazie al “tag” di istidine, è stato possibile purificare la proteina N dal materiale vegetale mediante cromatografia d’affinità. La purificazione della proteina è stata effettuata a partire da materiale vegetale liofilizzato, cercando di adattare il protocollo impiegato per la purificazione della stessa proteina da *E. coli*. Nonostante si sia riusciti ad ottenere un quantitativo di proteina sufficiente per condurre gli esperimenti descritti nel paragrafo successivo, in futuro questo protocollo dovrà essere ottimizzato, in quanto una grande quantità di proteina non è riuscita a legarsi alla resina e molta è andata persa nei lavaggi; inoltre non si è osservato il classico picco di eluizione che si ottiene in una o due frazioni ad un determinato valore di pH, ma una eluizione continua della proteina nelle varie frazioni raccolte. Le frazioni eluite sono state riunite in tre frazioni, denominate A, B e C, come descritto nel paragrafo 3.9.8 (**figura 49**).

Per gli esperimenti descritti nel paragrafo successivo è stata presa in considerazione solo

la frazione B, la più concentrata (circa 20 ng/μl). Le frazioni di eluizione sono state verificate anche mediante immunoblotting (non mostrato) e il riconoscimento da parte dell'anticorpo pAb α-N rabbit conferma l'avvenuta purificazione della proteina N.

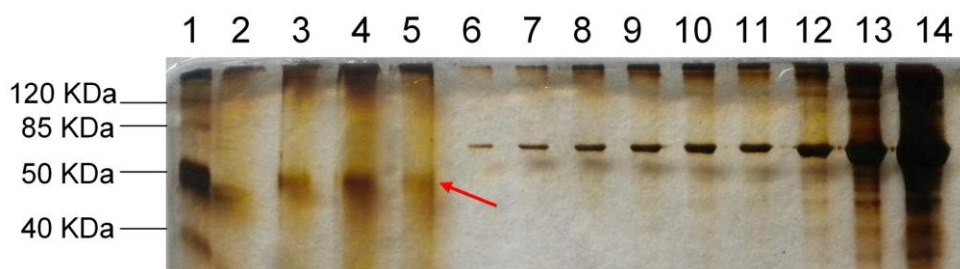


Figura 49. Colorazione con nitrato d'argento delle frazioni di purificazione della proteina N da pianta
1: Marcatore di peso molecolare (Pre-stained, GE Healthcare); **2:** proteina N purificata da *E. coli* (50 ng); **3:** frazione A di purificazione della proteina N da pianta (20 μl), costituita dalle frazioni D1-D3; **4:** frazione B di purificazione della proteina N da pianta (20 μl), costituita dalle frazioni E1-E3; **5:** frazione C di purificazione della proteina N da pianta (20 μl), costituita dalle frazioni E4-E7; **6-14:** BSA 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 5 e 10 μg, rispettivamente.

4.1.5 Saggio di antigenicità della proteina N prodotta in pianta con sieri di pazienti umani SARS-positivi

Al fine di verificare le proprietà antigeniche della proteina N ricombinante prodotta in pianta, è stato eseguito un saggio di immunoblotting con sieri di pazienti convalescenti, in precedenza affetti da SARS. Gli estratti fogliari grezzi infettati con il plasmide pPVX201 “scarico” (controllo negativo), quelli contenenti la proteina N, la proteina N purificata da pianta o da *E. coli* (controllo positivo) sono stati sottoposti a separazione mediante SDS-PAGE ed immunoblotting con sieri di pazienti affetti da SARS o da altre malattie respiratorie non correlate alla SARS. La realizzazione di questi esperimenti è stata possibile grazie alla disponibilità di sieri di pazienti cinesi affetti da SARS durante l'epidemia del 2002-2003.

In entrambe le forme, purificata o presente nell'estratto fogliare grezzo, la proteina N prodotta in pianta è riconosciuta dai sieri di pazienti affetti da SARS ma non dai sieri di pazienti affetti da altre malattie respiratorie. In **figura 50** sono riportati i risultati ottenuti con “pool” di sieri SARS provenienti da 5 pazienti cinesi convalescenti SARS. Gli stessi risultati sono stati ottenuti analizzando la reattività della proteina con i sieri di un numero maggiore di pazienti, presi in considerazione singolarmente e non in un “pool” (non mostrato).

Nel primo esperimento, condotto con l'estratto grezzo (**figura 50A**), i sieri sono stati usati ad una diluizione 1:500, mentre nell'esperimento successivo, condotto con la proteina N purificata (**figura 50B**), la diluizione dei sieri è stata di 1:200.

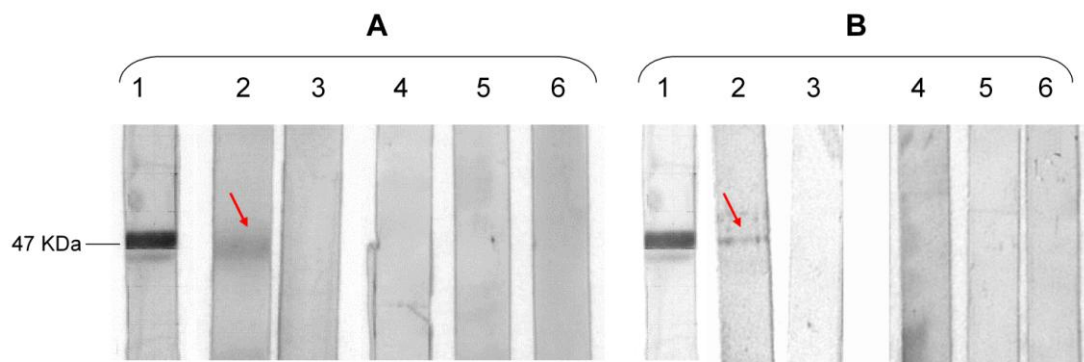


Figura 50. Saggio di antigenicità della proteina N prodotta in pianta con sieri di pazienti affetti da SARS

A) Saggio di antigenicità dell'estratto grezzo fogliare contenente la proteina N

1,4: Controllo positivo=Proteina N purificata da *E. coli* (500 ng)

2,5: Estratto derivante da un "pool" di foglie sistemiche di *N. benthamiana* derivanti dalla infezione I con il plasmide pPVX-His₆-N e dalle re-infezioni, contenente 250 ng di proteina N

3,6: Controllo negativo= Estratto derivante da un "pool" di foglie sistemiche di *N. benthamiana* infettate con il plasmide pPVX201 "scarico".

B) Saggio di antigenicità della proteina N purificata da pianta

1,4: Controllo positivo=Proteina N purificata da *E. coli* (500 ng)

2,5: Proteina N purificata da "pool" di foglie sistemiche di *N. benthamiana* collezionate in seguito a infezioni I, II e III.

3,6: Controllo negativo= Estratto derivante da un "pool" di foglie sistemiche di *N. benthamiana* infettate con il plasmide pPVX201 "scarico".

Le strisce 1, 2, 3 di entrambi gli esperimenti (A e B) sono state incubate con un "pool" di sieri convalescenti di 5 pazienti cinesi affetti da SARS. La proteina N prodotta sia in *E. coli* che in pianta viene riconosciuta dagli anticorpi presenti nel siero (strisce 1, 2 altezza della freccia).

Le strisce 4, 5, 6 di entrambi gli esperimenti (A e B) sono state incubate con un "pool" di sieri di 3 pazienti affetti da altre malattie respiratorie non-SARS. La proteina N prodotta sia in *E. coli* che in pianta (strisce 4, 5) non viene riconosciuta perchè non sono presenti anticorpi specifici nel siero.

4.2 PRODUZIONE IN PIANTA DELLA PROTEINA M

Precedentemente al presente lavoro di dottorato, nel nostro laboratorio era stata dimostrata la possibilità di esprimere la proteina M del SARS-CoV in *E. coli*, soltanto nella forma mutata denominata M_{RLV} contenente tre mutazioni (K₁₃ > R, F₃₆ > L e I₁₆₀ > V) e in cellule di mammifero in coltura con la sequenza originaria. Inoltre si era cercato di esprimere la proteina con la sequenza originaria in pianta mediante il vettore pPVX201. Tuttavia, con questo sistema di espressione, nella maggior parte delle piante analizzate non si riusciva ad osservare la presenza della proteina e nelle poche piante esprimenti, il livello di espressione era molto basso, al limite della visualizzazione in immunoblotting (Demurtas, tesi di laurea, dati non pubblicati).

Per cercare di risolvere questo problema, si è scelto di produrre la proteina con la sequenza originaria mediante la tecnica dell'agroinfiltrazione.

La sequenza amminoacidica della proteina M è riportata in **figura 51**. Come per gli altri sistemi di espressione utilizzati, la sequenza è costituita dalla proteina M fusa

all'estremità C-terminale al "tag" di sei istidine (M-His₆). La scelta della posizione del "tag" è dovuta al fatto che all'estremità N-terminale è presente una putativa sequenza segnale per l'indirizzamento in membrana (evidenziata in rosso).

MADNGTITVEELK^QLL^EQ^WNLVIG^FLFLAWIMLLQ^FAYSNNRNF^LYIIKLVFLWLLWPVTLACFVLAV
VYRINWVTGGIAIAMACIVGLMWLSYFVASFRLEFARTRSMWSFNPETNILLNVPLRG^TIVTRPLMESE
LVIGAVIIRGHLRMAGHSLGRCD^IKDLPKEITVATSR^TLSYYKL^GASQ^RVGTDSGFAAYNRYRIGNYK
LNTDHAGSNDNIALLVQ^ELA^HHHHHH

Figura 51. Sequenza amminoacidica originaria della proteina M-His₆ (230 aa).

In **rosso** è riportata la sequenza segnale per l'indirizzamento in membrana; In **viola** è riportato il "tag" di istidine; in **arancio** sono indicati gli amminoacidi interposti (a funzione di braccio spaziatore) tra la sequenza della proteina M e il "tag", in **giallo** sono indicati gli amminoacidi mutati nella forma proteica espressa in *E. coli*.

4.2.1 Preparazione del costrutto pBI-M-His₆ e agroinfiltrazione delle piante

A partire dal costrutto pBS-M-His₆ precedentemente sviluppato nel nostro laboratorio, il gene M-His₆ (693 nt) è stato clonato nel vettore pBI-B9, sostituendo il gene scFv-B9 ed ottenendo il costrutto pBI-M-His₆ (come schematizzato in **figura 52**), verificato per PCR su colonie trasformanti di *E. coli* e per sequenziamento. La sequenza si è rivelata corretta ed il DNA plasmidico è stato impiegato per la trasformazione dei ceppi competenti di *A. tumefaciens* GV3101 e C58C1.

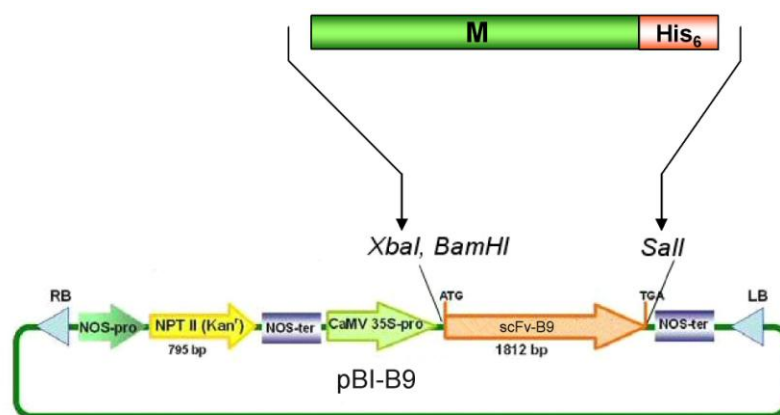


Figura 52. Schema del costrutto pBI-M-His₆ per l'agroinfiltrazione

Un clone positivo per ciascun ceppo di *A. tumefaciens* contenente il costrutto pBI-M-His₆ è stato impiegato per l'agroinfiltrazione di piante di *N. benthamiana*.

Piantine di circa 4 settimane sono state infiltrate manualmente con le sospensioni batteriche ricombinanti come illustrato in **figura 53**. Prima di procedere all'infezione massiva delle piante è stato effettuato un esperimento di "time-course" su 3 piante per ogni ceppo di agrobatterio, campionando dischetti fogliari nei giorni III, IV, V, VI, VII e X successivi all'infezione (p.i.), in modo da chiarire il giorno di massimo accumulo della proteina.



Figura 53. Procedura di agroinfiltrazione manuale, condotta inoculando la sospensione batterica esercitando una leggera pressione sulla pagina inferiore delle foglie di *N. benthamiana*.

4.2.2 Analisi dell'espressione della proteina M

L'esperimento di "time-course" è stato verificato mediante immunoblotting degli estratti ottenuti dai dischetti fogliari campionati nei diversi giorni.

In **figura 54** è riportato l'esperimento di "time-course" ottenuto con il ceppo C58C1. Dall'immagine mostrata si osserva la produzione della proteina M nei giorni IV e V p.i., ma in realtà nella lastra originale si riesce ad osservare una debole banda anche negli altri giorni. Anche con il ceppo GV3101 si ottengono bande flebili, non apprezzabili mediante foto della lastra originale. Questi risultati sono in gran parte imputabili alla cattiva estrazione della proteina M in questo esperimento (dischetti fogliari pestellati, direttamente risospesi in tampone di caricamento "gel loading buffer" e bolliti).

Questo esperimento ci ha comunque indirizzati a scegliere, nel successivo esperimento, di effettuare un unico campionamento massivo di materiale agroinfiltrato al V giorno p.i., per entrambi i ceppi.

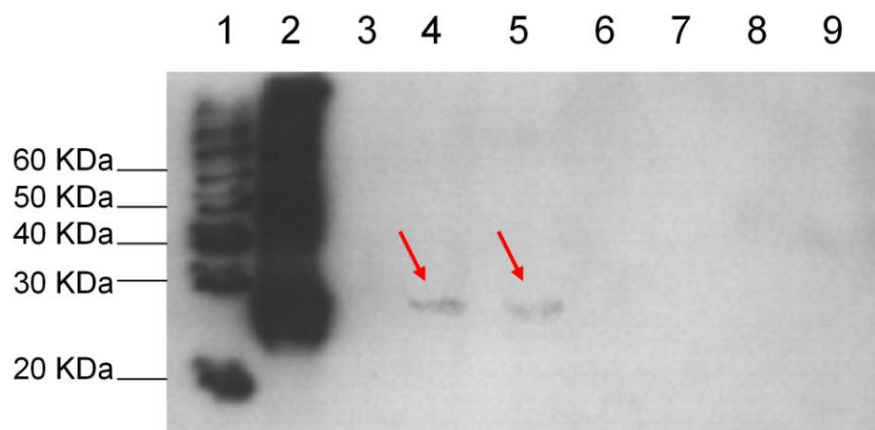


Figura 54. “Time-course” dell’espressione della proteina M con il ceppo C58C1 (immunoblotting con pAb α -M1/2 mouse).

1: Marcatore di peso molecolare (Magic Mark Invitrogen); **2:** proteina M_{RLV} prodotta in *E. coli*; **3:** pBI-M-His₆ giorno III p.i.; **4:** pBI-M-His₆ giorno IV p.i.; **5:** pBI-M-His₆ giorno V p.i.; **6:** pBI-M-His₆ giorno VI p.i.; **7:** pBI-M-His₆ giorno VII p.i.; **8:** pBI-M-His₆ giorno X p.i.; **9:** controllo negativo= pBI-B9 giorno V p.i.

Peso molecolare della proteina M-His₆: 26 KDa

Una volta collezionato il materiale vegetale al V giorno p.i., si è cercato di trovare le condizioni ideali per l’estrazione della proteina M.

Risospendendo il materiale vegetale in tampone GB e scaldando i campioni a 40°C per 10’ una volta aggiunto il tampone di caricamento “gel loading buffer” (la bollitura dei campioni non consente di visualizzare la proteina in immunoblotting, forse a causa della formazione di aggregati idrofobici ad alto peso molecolare), si ottiene la migliore estrazione della proteina ricombinante.

L’agroinfiltrazione ha permesso di ottenere livelli di proteina più elevati e riproducibili di quelli ottenuti in precedenza con il vettore pPVX201, soprattutto impiegando il ceppo C58C1 (più virulento del ceppo GV3101), come si vede in **figura 55**.

Questo rappresenta quindi il primo esempio di produzione della proteina M in un sistema vegetale.

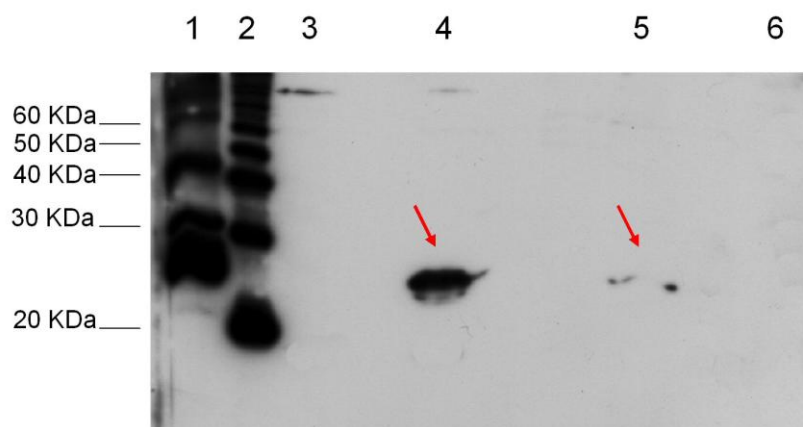


Figura 55. Comparazione della produzione proteina M ottenuta mediante infezione con pPVX e mediante agro infiltrazione (immunoblotting con pAb α -M1/2 rabbit).

1: Proteina M_{RLV} prodotta in *E. coli*; 2: Marcatore di peso molecolare (Magic Mark Invitrogen); 3: estratto di *N. benthamiana* infettata con il costrutto pPVX-M-His₆; 4: estratto di *N. benthamiana* agroinfiltrata con il ceppo C58C1/pBI-M-His₆; 5: estratto di *N. benthamiana* agroinfiltrata con il ceppo GV3101/pBI-M-His₆; 6: controllo negativo=estratto di *N. benthamiana* agroinfiltrata con il ceppo C58C1/pBI-B9.

Nei pozzetti 3, 4 e 5 sono stati caricati 20 μ l di estratto preparato a partire dalla stessa quantità di materiale vegetale.

Comparando la proteina M prodotta in *E. coli* (sequenza mutata M_{RLV}) e in pianta (sequenza originaria), si osserva che quella da pianta presenta un peso molecolare leggermente superiore, dovuto forse ad eventi di modificazioni post-traduzionali (ad esempio glicosilazione) della proteina o alla differenza nella composizione amminoacidica delle due proteine (**figura 56**). Questo aspetto dovrà essere investigato ulteriormente.

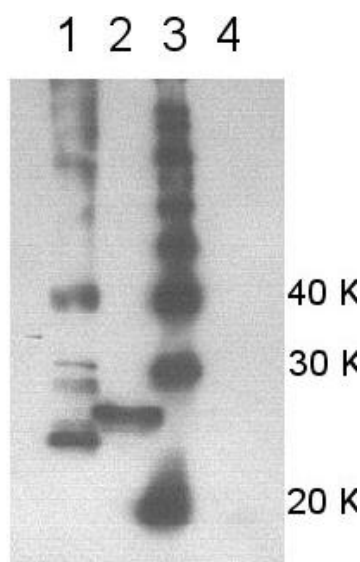


Figura 56. Comparazione della proteina M prodotta in sistema procariotico (M_{RLV}) e vegetale (immunoblotting con pAb α -M1/2 rabbit).

1: Proteina M_{RLV} purificata da *E. coli*; 2: estratto di *N. benthamiana* infiltrata con il ceppo C58C1/pBI-M-His₆; 3: marcatore di peso molecolare (Magic Mark, Invitrogen); 4: controllo negativo=estratto di *N. benthamiana* agroinfiltrata con il ceppo C58C1/pBI-B9.

B) PIATTAFORME VEGETALI PER LA PRODUZIONE DI VACCINI TERAPEUTICI BASATI SULL'ONCOPROTEINA E7 DI HPV-16

4.3 PRODUZIONE DELLA PROTEINA E7 IN PIANTA MEDIANTE AGROINFILTRAZIONE

Precedentemente al presente lavoro di dottorato nel nostro laboratorio era stata prodotta in pianta, mediante il vettore virale pPVX201, la proteina E7 di HPV-16 nella forma His₆-E7, con rese di circa 3 µg/g di tessuto fresco e utilizzando la sequenza segnale della proteina inibitrice della poligalatturonasi di fagiolo che riesce ad indirizzare la proteina E7 nella via secretoria (PGIPss-E7), con rese 5 volte superiori. Successivamente, la proteina E7 nella forma mutagenizzata E7GGG, fusa ad una proteina batterica ingegnerizzata (lichenasi, LicKM, di *C. thermocellum*), è stata prodotta mediante agroinfiltrazione con un vettore virale di seconda generazione con rese di 1 mg/g tessuto fresco, che hanno permesso di purificare la proteina di fusione.

In questa parte del lavoro di dottorato si è cercato di incrementare i livelli di espressione della proteina E7 prodotta in pianta non fusa a “carrier”, principalmente per poter ottenere una proteina purificata da impiegare in studi biochimici.

Con il fine di migliorare i livelli di espressione in pianta della proteina E7 nella forma PGIPss-E7 (in **figura 57** è riportata la sequenza amminoacidica), si è scelto di esprimerla mediante la tecnica dell'agroinfiltrazione descritta per l'ottenimento della proteina M del SARS-CoV.

MTQFNIPVTMSSSLSIILVILVSLRTALSMHGDTPTLHEYML
DLQPETTDLYCYEQQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIV
TFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP

Figura 57. Sequenza amminoacidica della proteina PGIPss-E7 (127 aa).

In **rosso** è riportata la sequenza segnale della PGIP; in **blu** sono indicati i residui amminoacidici che sono mutati in tre **G** nella proteina E7GGG (descritta in seguito).

4.3.1 Preparazione del costrutto pBI-PGIPss-E7 e agroinfiltrazione delle piante

A partire dal costrutto pPVX-PGIPss-E7 precedentemente sviluppato nel nostro laboratorio, il gene PGIPss-E7 (384 pb) è stato clonato nel vettore pBI-B9, ottenendo il costrutto pBI-PGIPss-E7, verificato per PCR su colonie trasformanti di *E. coli* e per sequenziamento. La sequenza si è rivelata corretta ed il DNA plasmidico è stato impiegato per la trasformazione del ceppo competente di *A. tumefaciens* GV3101.

L'infezione delle piante di *N. benthamiana* è stata effettuata come già mostrato per la proteina M ed anche in questo caso, prima di procedere all'infezione massiva delle piante,

è stato effettuato un esperimento di “time-course” su 3 piante campionando dischetti fogliari nei giorni III, IV, V, VI, VII, X p.i.

4.3.2 Analisi dell'espressione della proteina PGIPss-E7

L'esperimento di “time-course” è stato verificato mediante immunoblotting degli estratti ottenuti dai dischetti fogliari campionati nei diversi giorni (**figura 58**).

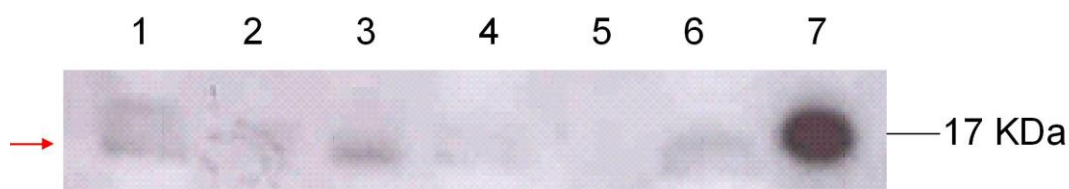


Figura 58. Analisi della proteina PGIPss-E7 prodotta in pianta a seguito dell'infezione con il ceppo di *A. tumefaciens* GV3101 (immunoblotting con pAb α -E7).

1: pBI-PGIPss-E7 giorno III p.i.; 2: pBI-PGIPss-E7 giorno IV p.i.; 3: pBI-PGIPss-E7 giorno V p.i.; 4: pBI-PGIPss-E7 giorno VI p.i.; 5: pBI-PGIPss-E7 giorno VII p.i.; 6: pBI-PGIPss-E7 giorno X p.i.; 7: controllo positivo=proteina His₆-E7 prodotta in *E. coli*.

Peso molecolare apparente della proteina E7: 17 KDa

Sebbene il segnale ottenuto in immunoblotting sia debole, si osserva un aumento al V giorno p.i (figura 58, pozzetto 3). Nella successiva infezione condotta al fine di collezionare materiale vegetale il campionamento è stato quindi effettuato al V giorno p.i. Al fine di verificare il livello di espressione della proteina E7 in questo sistema, è stato allestito un immunoblotting degli estratti vegetali ottenuti dalle foglie agroinfiltrate o infettate con il PVX.

In **figura 59** si osserva che, rispetto alla tecnologia basata sul PVX, non c'è stato miglioramento dei livelli di espressione della proteina E7 con l'agroinfiltrazione (anzi le rese sono diminuite), come invece osservato per la proteina M del SARS-CoV. Di conseguenza abbiamo esplorato la possibilità di espressione in microalghe (vedi sezione successiva).

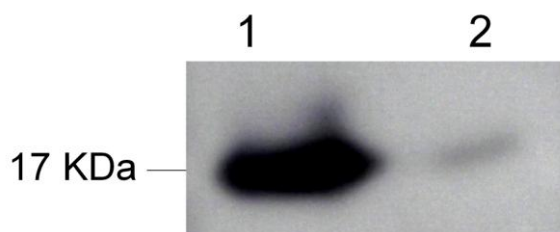


Figura 59. Comparazione dell'espressione della proteina PGIPss-E7 in pianta mediante le due tecnologie (infezione con vettore virale derivante dal PVX e agroinfiltrazione) (immunoblotting con pAb α -E7).

1: Estratto di *N. benthamiana* infettato con il costrutto pPVX-PGIPss-E7; 2: estratto di *N. benthamiana* agroinfiltrata con il ceppo GV3101/ pBI-PGIPss-E7. In entrambi i pozzetti sono stati caricati 20 μ l di estratto preparato a partire dalla stessa quantità di materiale vegetale.

4.4 PRODUZIONE DELLA PROTEINA E7 NELLA MICROALGA *Chlamydomonas reinhardtii*.

4.4.1 Produzione della proteina E7GGG mediante trasformazione nucleare

Come studio di produzione proteica in un sistema vegetale a noi nuovo quale *C. reinhardtii* si è scelto in primo luogo di esprimere il gene E7 mediante trasformazione nucleare in maniera costitutiva o inducibile, in quanto la tecnologia ed i vettori erano già disponibili. Si è scelto di esprimere la proteina E7 nella forma mutagenizzata E7GGG (già impiegata nel nostro laboratorio in formulazioni vaccinali terapeutiche contro HPV, Massa *et al.*, 2007, 2008), che presenta tre mutazioni amminoacidiche nel sito di legame alla proteina RB (**figura 60**), che aboliscono il suo potere trasformante, risultando quindi più sicura per un'eventuale futura applicazione clinica.

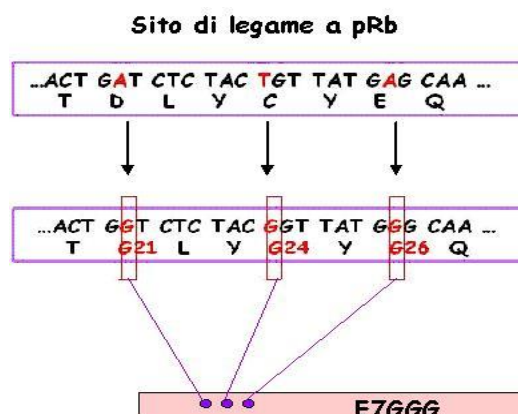


Figura 60. Mutazioni presenti nella forma mutagenizzata del gene E7 di HPV-16 (E7GGG).

Si è scelto di inserire all'estremità N-terminale della proteina il "tag" di istidine, sia ai fini dell'eventuale purificazione, sia per la protezione dell'estremità di E7 che in cellule di mammifero viene velocemente ubiquitinata e quindi degradata dal complesso proteasomale (Reinstein *et al.*, 2000). La sequenza amminoacidica della proteina His₆-E7GGG è riportata in **figura 61**.

**HHHHHHGSMHGDTPTLHEYMLDLQPETTGLYGYGQLNDSSEEDEIDGPAGQA
EPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRLTLEDLLMGTGIVCPICSQKP**

Figura 61. Sequenza amminoacidica della proteina His₆-E7GGG (431 aa).

In **viola** è riportato il "tag" di istidine; in **arancio** sono indicati gli amminoacidi interposti (a funzione di braccio spaziatore) tra il "tag" e la sequenza della proteina E7GGG. Sono **evidenziati** i tre amminoacidi mutati rispetto alla forma originaria.

4.4.1.1 Preparazione dei costrutti per la trasformazione nucleare

Come accennato in introduzione, *C. reinhardtii* è spesso recalcitrante all'espressione di sequenze esogene che non siano state adattate, nel contenuto di GC e nella scelta dei

codoni, alle caratteristiche del suo genoma (per l'espressione nel genoma nucleare: 63% di GC, 90% in terza posizione e solo i codoni dei geni nucleari più espressi).

L'ottimizzazione della sequenza del gene His₆-E7GGG è stata condotta dalla GenScript Corporation, a partire dalla sequenza amminoacidica da noi fornita, fiancheggiata dai i siti di restrizione necessari per il clonaggio del gene nei vettori per la trasformazione nucleare.

La sequenza nucleotidica ottenuta del gene His₆-E7GGG ottimizzato (324 pb) è la seguente:

```

1      ATGCACCACC ACCACCACCA CGGCAGCATG CACGGCGACA CCCCCACCCT GCACGAGTAC
61     ATGCTGGACC TGCAGCCCGA GACCACCGGC CTGTACGGCT ACGGCCAGCT GAACGACAGC
121    AGCGAGGAGG AGGACGAGAT CGACGCCCCC GCGGGCCAGG CCGAGCCCGA CCGCGCCAC
181    TACAACATCG TGACCTTCTG CTGCAAGTGC GACAGCACCC TGCGCCTGTG CGTGCAGAGC
241    ACCCACGTGG ACATCCGCAC CCTGGAGGAC CTGCTGATGG GCACCTGGG CATCGTGTGC
301    CCCATCTGCA GCCAGAAGCC CTAA

```

Composition 70 A; 126 C; 91 G; 37 T; 0 OTHER

Percentage: 21.6% A; 38.9% C; 28.1% G; 11.4% T; 0.0% OTHER

Tale gene sintetico (fornito nel vettore pUC57) è stato clonato nel vettore pSL18-psaD-cRLuc, ottenendo il costrutto pSL18-psaD-His₆-E7GGG (**figura 62**), che dovrebbe consentire l'espressione costitutiva di E7GGG nel nucleo di *C. reinhardtii*.

In parallelo, il gene sintetico è stato clonato nel vettore pSL18-cyc₆ ottenendo il costrutto pSL18-cyc₆-His₆-E7GGG (**figura 63**), che dovrebbe invece consentire l'espressione inducibile da nichel di E7GGG. I costrutti sono stati verificati per PCR su colonie trasformanti di *E. coli* e per sequenziamento. La sequenza si è rivelata corretta ed il DNA plasmidico è stato linearizzato ed impiegato per la trasformazione di *C. reinhardtii*.

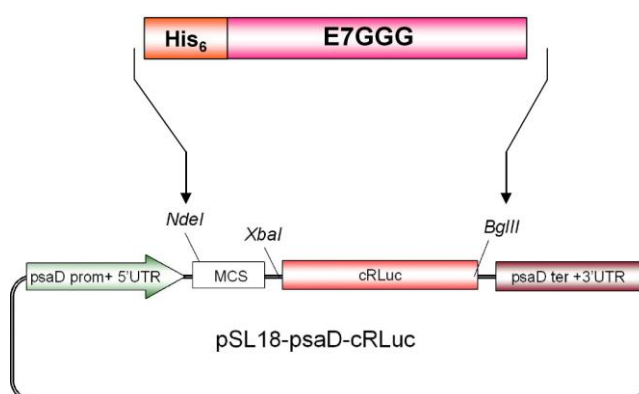


Figura 62. Schema dell'ottenimento del costrutto pSL18-psaD-His₆-E7GGG per l'espressione costitutiva di E7GGG nel nucleo di *C. reinhardtii*.

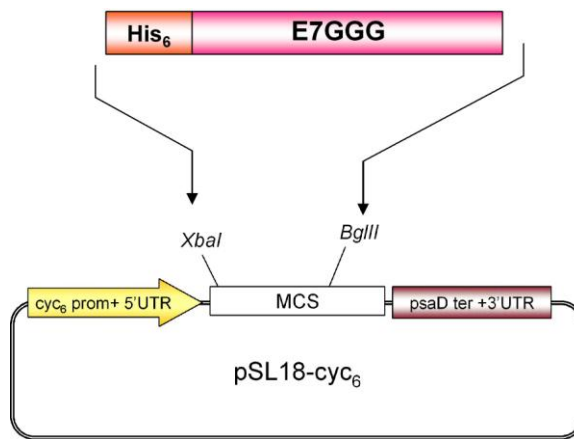


Figura 63. Schema dell'ottenimento del costrutto pSL18-cyc₆-His₆-E7GGG per l'espressione inducibile di E7GGG nel nucleo di *C. reinhardtii*.

4.4.1.2 Generazione di linee transgeniche nucleari e analisi dei trasformanti

La trasformazione nucleare di *C. reinhardtii* è stata condotta sul ceppo privo di parete cw15 con il metodo delle “glass beads”, ottenendo un numero variabile di trasformanti stabili, nei casi migliori circa 50-100 per evento di trasformazione, con entrambi i costrutti. In **figura 64** sono riportati alcuni dei trasformanti stabili ottenuti.

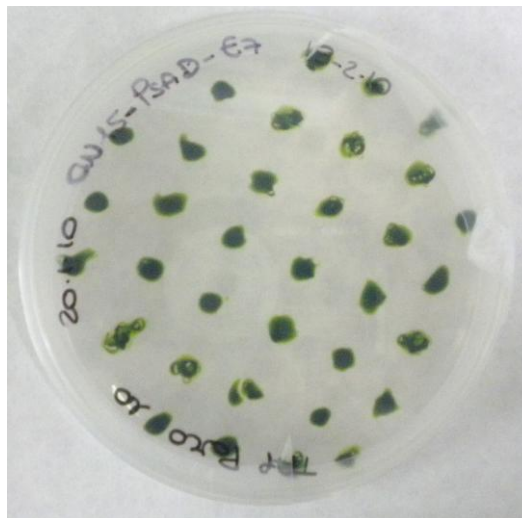


Figura 64. Alcuni trasformanti stabili ottenuti con il costrutto pSL18-psaD-His₆-E7GGG

L'analisi dell'espressione della proteina E7GGG è stata condotta mediante ELISA ed immunoblotting sugli estratti ottenuti dai trasformanti cresciuti in coltura liquida. Nel caso dei trasformanti inducibili, l'espressione della proteina è stata analizzata 16 ore dopo l'induzione della sua espressione come descritto nel sottoparagrafo 3.12.2.3.

Dapprima sono stati saggiati mediante ELISA gli estratti ottenuti in tampone PBS di 24 trasformanti per ogni costrutto, utilizzando l'anticorpo policlonale pAb α -E7, senza ottenere segnali significativi (non mostrato). Successivamente i 24 trasformanti per ciascun costrutto sono stati analizzati in 6 gruppi (4 trasformanti/gruppo) mediante immunoblotting. Tuttavia, come si nota in **figura 65**, per il costrutto costitutivo non si

osservano bande all'altezza di E7GGG, ma solo una banda di cross-reattività presente anche nel controllo negativo, di circa 30 KDa, mentre per il costrutto inducibile (**figura 66**), si osservano diverse bande, anche all'altezza di E7GGG ma sono presenti anche nel controllo negativo.

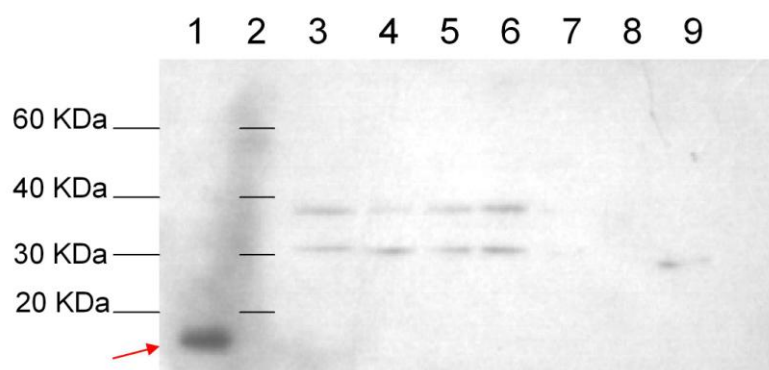


Figura 65. Analisi dei trasformanti nucleari ottenuti con il costrutto costitutivo pSL18-psaD-His₆-E7GGG (immunoblotting con pAb α -E7).

1: Proteina His₆-E7GGG purificata da *E. coli* (50 ng); **2:** marcatore di peso molecolare visibile solo su gel SDS-PAGE; **3-8:** trasformanti nucleari costitutivi ottenuti con il costrutto pSL18-psaD-His₆-E7GGG (in ogni pozzetto è stato caricato un "pool" di 4 trasformanti); **9:** controllo negativo= trasformatore nucleare costitutivo ottenuto con il costrutto pSL18-psaD-cRLuc.

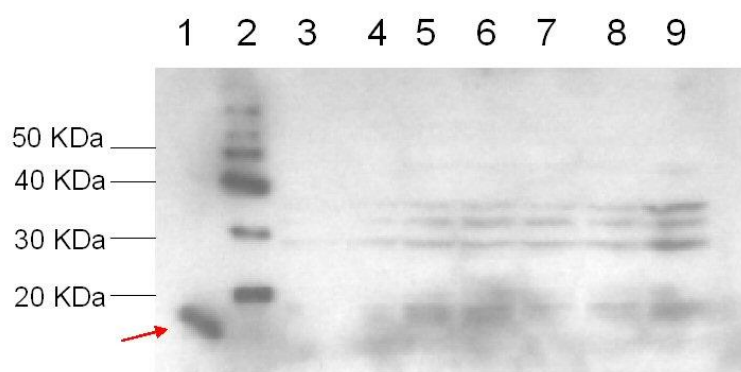


Figura 66. Analisi dei trasformanti nucleari ottenuti con il costrutto inducibile pSL18-cyc₆-His₆-E7GGG (immunoblotting con pAb α -E7).

1: Proteina His₆-E7GGG purificata da *E. coli* (50 ng); **2:** marcatore di peso molecolare (Magic Mark, Invitrogen); **3-8:** trasformanti nucleari inducibili ottenuti con il costrutto pSL18-cyc₆-His₆-E7GGG (in ogni pozzetto è stato caricato un "pool" di 4 trasformanti); **9:** controllo negativo= trasformatore nucleare inducibile ottenuto con il plasmide pSL18-cyc₆ "scarico".

Si è quindi deciso di ripetere la trasformazione solo con il costrutto costitutivo (il promotore è più forte rispetto a quello presente nel costrutto inducibile) ed analizzare un numero maggiore di trasformanti.

Estratti preparati in PBS di 91 nuovi trasformanti sono stati analizzati mediante saggio ELISA. Sebbene sia stato osservato un piccolo segnale su alcuni trasformanti (non mostrato), l'analisi successiva degli stessi mediante immunoblotting non ha confermato il risultato. Questi risultati potrebbero essere dovuti alla diversa sensibilità dei due metodi e comunque sembrano indicare in entrambi i casi che la concentrazione della proteina

espressa con questo sistema è molto bassa, al limite della rilevazione con l'anticorpo pAb α -E7. Come passaggio successivo, si è tentato di esprimere la proteina E7GGG nei ceppi di *C. reinhardtii* UVM4 e UVM11 isolati dal gruppo di Ralph Bock del Max-Planck-Institute di Potsdam-Golm, Germania (Neupert *et al.*, 2009). Questo gruppo di ricerca ha riportato una percentuale maggiore di trasformanti positivi e livelli di espressione più alti per la proteina GFP con questi ceppi, rispetto al ceppo wt cw15. Nel nostro laboratorio entrambi i ceppi sono stati trasformati con il costrutto costitutivo pSL18-psaD-His₆-E7GGG ottenendo diverse colonie trasformanti. Per ciascun ceppo sono stati analizzati 24 trasformanti mediante immunoblotting degli estratti ottenuti secondo diversi protocolli, incluso il tampone GB e la precipitazione delle proteine con l'acido tricloroacetico (TCA). Tuttavia, anche in questo caso nessuna banda del peso molecolare atteso è stata osservata.

Nonostante sia necessario condurre analisi più approfondite e su un numero maggiore di trasformanti per trarre delle conclusioni definitive, si è deciso di mettere momentaneamente da parte questa via di espressione e di puntare sulla trasformazione del cloroplasto, ad oggi l'unica strategia impiegata per la produzione di biofarmaceutici in microalghe da diversi gruppi di ricerca.

4.4.2 Produzione della proteina E7GGG mediante trasformazione plastidiale

Si è scelto di produrre la proteina E7GGG nella stessa versione scelta per la trasformazione nucleare, con l'unica differenza che tra la sequenza del "tag" di istidine e quella di E7GGG sono stati interposti sei residui amminioacidici (LVPRGS) che rappresentano il sito di taglio della trombina, al fine di ottenere se desiderato, una proteina E7GGG priva di "tag" dopo purificazione.

4.4.2.1 Preparazione dei costrutti per la trasformazione plastidiale

A differenza dell'ottimizzazione dei codoni del gene per l'espressione nucleare che era stata effettuata dalla GenScript Co., l'ottimizzazione della sequenza per l'espressione nel plastidio è stata effettuata personalmente, in quanto richiede maggiori accortezze.

Come per l'espressione nel nucleo, anche per i geni da esprimere nel cloroplasto devono essere scelti i codoni dei geni endogeni più espressi. Tuttavia, se si sceglie solo il codone più rappresentato si rischia di non avere una quantità sufficiente di tRNA corrispondente disponibile (nel plastidio i tRNA non sono abbondanti come nel nucleo) e quindi si ha un rallentamento, se non addirittura un blocco della traduzione.

Per tale motivo è necessario scegliere anche dei codoni meno frequenti. Usando il

programma Optimizer descritto nel sottoparagrafo 3.12.3.1, il parametro da tenere in considerazione è il valore CAI (“codon adaptation index”) che deve essere di circa 0.8 (un valore CAI=1.0 significa che è stato scelto solo il codone più frequente). In termini più semplici, l’ottimizzazione dei codoni non deve essere del 100% ma all’incirca dell’80%.

Di seguito è riportata la sequenza nucleotidica ottimizzata del gene His₆-E7GGG ottenuta a partire dalla sequenza amminoacidica, con la tabella dei codoni presenti:

Type	Sequences	CAI	ENC	%GC	%AT
Query	MHHHHHLLVPRGSMHGDTPTLHEYMLDLQPETTGLYGYGQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPP DRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRLTLEDLLMGTGLIVCPICISQKP	-	-	-	-
Optimized	ATGCACCATCACCACCACCACTTAGTTCCAAGAGGTTCAATGCACGGTGATACGCCTACA TTACACGAATATATGTTAGACTTACAACCAGAACTACTGGTTTATACGGTTATGGTCAA TTAAACGATAGTTTCAGAAGAAGAAGATGAAATTGATGGTCCAGCTGGTCAAGCAGAACCA GATCGTGCACACTATAATATTGTAACGTTCTGTTGTAATGTGATTTCGACATTACGTTTA TGTGTTCAATCAACACACGTAGACATTCTGACACTTGAAGATTATTAAATGGGTACTTTA GGTATCGTATGTCTATTGTTTCACAAAAACCT	0.801	31	37.8	62.2

Query: sequenza amminoacidica della proteina His₆-E7GGG usata per l’ottimizzazione; **Optimized:** sequenza nucleotidica del gene His₆-E7GGG ottimizzato; **CAI:** “codon adaptation index”; **ENC:** numero di codoni effettivi

CODON USAGE

Codons	Usage	Codons	Usage	Codons	Usage	Codons	Usage
GCA (A)	2	GCC (A)	0	GCG (A)	0	GCT (A)	1
TGC (C)	0	TGT (C)	6	GAC (D)	2	GAT (D)	7
GAA (E)	8	GAG (E)	0	TTC (F)	1	TTT (F)	0
GGA (G)	0	GGC (G)	0	GGG (G)	0	GGT (G)	9
CAC (H)	9	CAT (H)	1	ATA (I)	0	ATC (I)	1
ATT (I)	4	AAA (K)	2	AAG (K)	0	TTA (L)	11
TTG (L)	0	CTA (L)	0	CTC (L)	0	CTG (L)	0
CTT (L)	1	ATG (M)	4	AAC (N)	1	AAT (N)	1
CCA (P)	4	CCC (P)	0	CCG (P)	0	CCT (P)	3
CAA (Q)	5	CAG (Q)	0	AGA (R)	1	AGG (R)	0
CGA (R)	0	CGC (R)	0	CGG (R)	0	CGT (R)	3
AGC (S)	0	AGT (S)	1	TCA (S)	4	TCC (S)	0
TCG (S)	1	TCT (S)	0	ACA (T)	4	ACC (T)	0
ACG (T)	2	ACT (T)	3	GTA (V)	3	GTC (V)	0
GTG (V)	0	GTT (V)	2	TGG (W)	0	TAC (Y)	1
TAT (Y)	3	TAA (.)	0	TGA (.)	0	TAG (.)	0

Successivamente è stata disegnata una cassetta di espressione costituita dalla sequenza del gene His₆-E7GGG ottimizzato posta tra il promotore psbD e la sua 5’UTR e il terminatore psbA con la sua 3’UTR e i siti di restrizione necessari per il clonaggio nel vettore per la trasformazione plasmidiale.

La sequenza dell’intera cassetta di espressione con i siti di restrizione utili per il clonaggio nel vettore per l’espressione plasmidiale è riportata di seguito (**figura 67**) ed è stata fatta sintetizzare alla GenScript Co.

5'CCGCGGCCCGGGTATGGAGTATATGAAATTAAATGGATATTTGGTACATTTAATTCACAAAAATGTCCAATACTTAA
AATACAAAAATTAAAAGTATTAGTTGTAAACTTGACTAACATTTTAAATTTTAAATTTTTTCCTAATTATATATTTTACTTG
CAAAATTTATAAAAAATTTTATGCATTTTATATCATAATAATAAACCTTTATTCATGGTTATAATATAATAATTTGTGAT
GACTATGCACAAAGCAGTTCTAGTCCCATATATATAACTATATATAACCCGTTTAAAGATTTATTTAAAAAATATGTGTGT
AAAAATGCTTATTTTAAATTTATTTTATATAAGTTATAATATTAATAACACAATGATTAATAATAATAATAATAAAT
TTAACGTAACGATGAGTTGTTTTTTTATTTTGGAGATACACGCATATGACCATCACCACCACCCTTAGTTCCAAGAGG
TTCAATGCACGGTGATACGCCCTACATTACACGAATATATGTTAGACTTACAACCAGAACTACTGGTTTATACGGTTATC
GTCAATTAAACGATAGTTTCAAGAAGAAGATGAAATTGATGGTCCAGCTGGTCAAGCAGAACAGATCGTGCACACT
ATAATATTGTAACGTTCTGTTGTAAATGTGATTGACATTACGTTTATGTGTTCAATCAACACACGTAGACATTCGTACA
CTTGAAGATTTATTAATGGGTACTTTAGGTATCGTATGTCCTATTTGTTTCACAAAAACCTTAA GAATTC TTTTTTTTAA
CTAAAAATAATCTGGTTAACCATACCTGGTTTATTTTAGTTTATACACACTTTTCATATATATATACTTAATAGCTACCAT
AGGCAGTTGGCAGGACGTCCCCTTACGGGACAAATGTATTATTGTTGCTGCCAAGTGCCTAATATAAATATTAGTGG
ACGTCCCCTTCCCCTTACGGGCAAGTAACTTAGGGATTTTAATGCTCCGTTAGGAGGCAAATAAATTTTAGTGGCAGTT
GCCTCGCCTATCGGCTAACAAGTTCCTTCGGAGTATATAAATATCCTGCCAAGTCCCGATATTTATATACTAGGCAGTGG
CGGTACCACTCGACTAATGCGGCCGCGAGCTC 3'

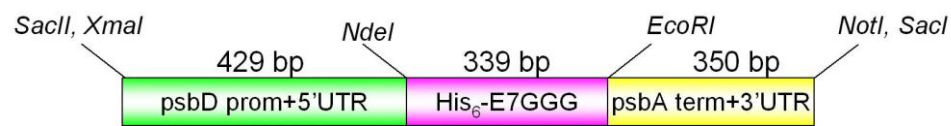


Figura 67. Sequenza e schema della cassetta di espressione costituita dal promotore e 5' UTR del gene psbD (in verde), dalla sequenza del gene ottimizzato His6-E7GGG (in rosa) e dal terminatore e 3' UTR del gene psbA (in giallo)

La cassetta sintetica è stata poi clonata nel vettore pCG1 in due orientamenti sfruttando la presenza di diversi siti di restrizione, come descritto in materiali e metodi e schematizzato in figura 37, ottenendo i costrutti pCG1-cassetta-sintetica-X/N e pCG1-cassetta-sintetica-S/S. Dopo trasformazione delle cellule competenti di *E. coli* è stata effettuata una PCR di controllo su alcune colonie trasformate e sono state effettuate minipreparazioni di DNA plasmidico per verificare la correttezza degli inserti clonati mediante sequenziamento, scegliendo poi un clone positivo per ogni costrutto.

La scelta di effettuare la trasformazione del cloroplasto con la cassetta di espressione in due orientamenti si basa su due considerazioni:

- 1) è noto che negli organismi procariotici esistono orientamenti favoriti per la trascrizione dei geni, in base all'orientamento del promotore che li controlla. In quest'ottica, l'impiego del costrutto pCG-cassetta-sintetica-X/N porta all'integrazione della cassetta di espressione con il promotore psbD della cassetta nello stesso orientamento del promotore endogeno, suggerendo che questo possa essere l'orientamento favorito. Tuttavia, non conoscendo il comportamento di *C. reinhardtii*, abbiamo realizzato anche l'orientamento opposto, ottenuto con il costrutto pCG-cassetta-sintetica-S/S;
- 2) in seguito alla trasformazione del genoma plastidiale di *C. reinhardtii* con entrambi i costrutti, si avranno le regioni del promotore e del terminatore duplicati (in quanto una copia è rappresentata dalle sequenze endogene e l'altra copia dalle sequenze presenti nella

cassetta di espressione di pCG1). In base ai diversi orientamenti ottenuti con i due costrutti, si avranno distanze tra le regioni omologhe maggiori in un caso e minori nell'altro. Essendo la frequenza di ricombinazione tra i siti omologhi proporzionale alla loro distanza, uno dei due orientamenti sarà più favorito rispetto all'altro, con minore probabilità di ricombinare.

4.4.2.2 Generazione di linee transplastomiche e analisi dei trasformanti

La trasformazione plastidiale di *C. reinhardtii* è stata condotta sul ceppo privo di parete cw15 con il metodo delle “glass beads”. Un numero variabile di trasformanti plastidiali, nel caso migliore 10 per evento di trasformazione, sono stati ottenuti con il costrutto pCG-cassetta-sintetica-X/N, in seguito a selezione su paromomicina. Con il costrutto pCG-cassetta-sintetica-S/S il numero dei trasformanti è stato inferiore, ottenendo all'incirca 3 trasformanti per evento di trasformazione, con un massimo di 5. Seppur il numero dei trasformanti che si ottiene con il metodo delle “glass beads” è inferiore a quello ottenuto con il metodo biolistico (quello usato da tutti i gruppi di ricerca che lavorano sulla trasformazione del cloroplasto di *Chlamydomonas*), il metodo delle “glass beads” è in realtà più vantaggioso in termini economici e di tempo, in quanto sia il cannone biolistico sia i componenti necessari (come le particelle d'oro o tungsteno) sono molto costosi e il processo di trasformazione richiede diverse ore. Il metodo delle “glass beads” richiede invece solo microbiglie di vetro e vortex e non richiede una lunga preparazione.

Prima di essere analizzate, le colonie ottenute da diversi eventi di trasformazione sono state sottoposte a diversi cicli di selezione su spectinomomicina al fine di incrementare il numero di copie del transgene. Per l'ottenimento di linee omoplasmiche sono stati effettuati circa 10 cicli di selezione.

Prima di procedere con l'analisi della presenza della proteina E7GGG, è stata verificata il corretto inserimento del plasmide nel genoma del cloroplasto. Il DNA totale di 13 trasformanti cresciuti in terreno liquido fino a una densità di 10^7 cellule/ml è stato estratto e sottoposto a PCR con diverse coppie di oligonucleotidi che appaiano in diverse regioni del plasmide e del genoma. In **figura 68** è riportata la strategia e i risultati ottenuti con una coppia di oligonucleotidi sui 13 trasformanti scelti. Questi oligonucleotidi producono un amplificato di circa 1000 pb solo nel caso in cui ci sia stata integrazione. Tale analisi è stata condotta su linee non ancora omoplasmiche per cui non è stata effettuata l'amplificazione con coppie di oligonucleotidi che verificassero l'ottenimento di tale stato. Dalla figura 68 si nota che l'integrazione sito-specifica nel genoma plastidiale si riscontra in 11 su 13 trasformanti.

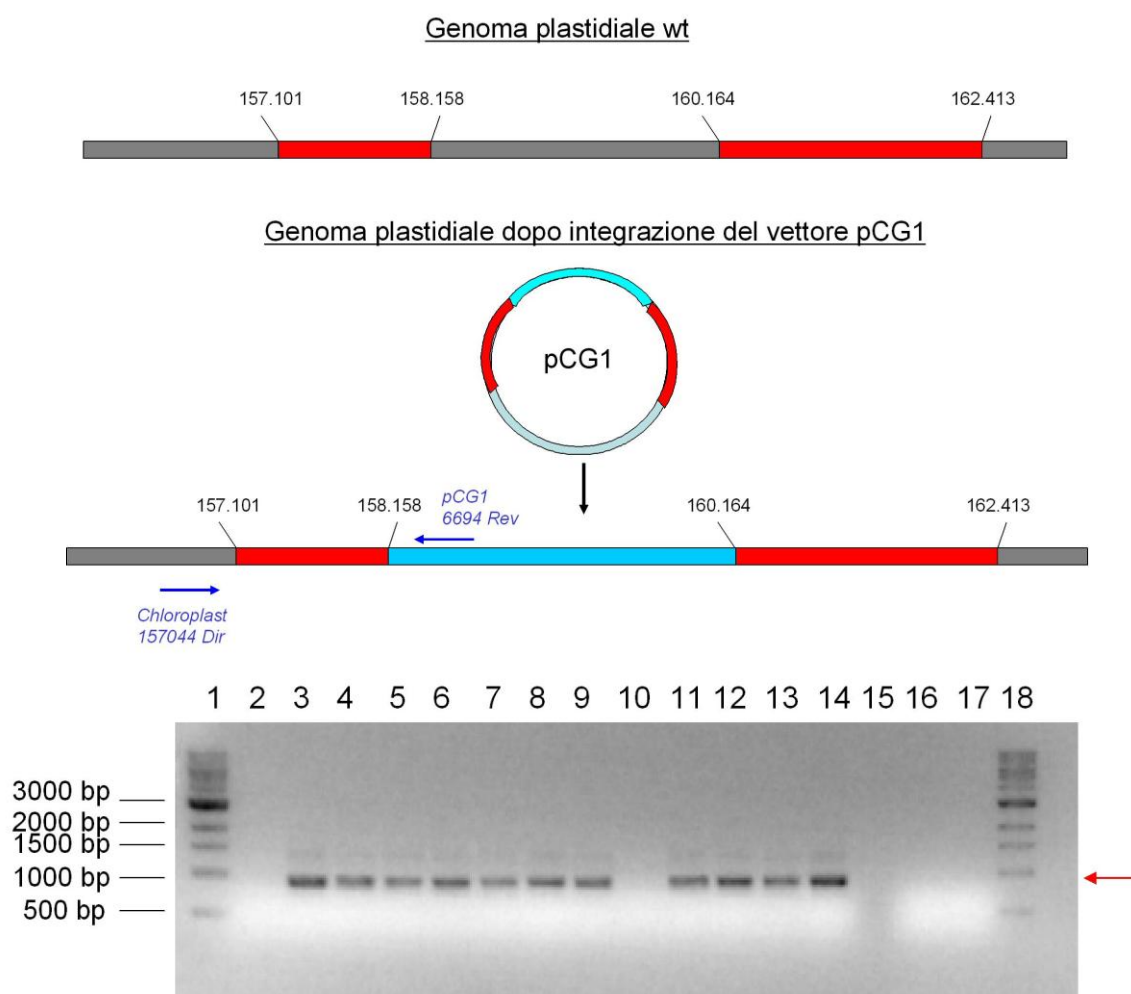


Figura 68. Schema degli oligonucleotidi impiegati per la verifica dell'integrazione nel genoma plastidiale del costrutto all'interno plasmide pCG1 e risultati ottenuti su 13 trasformanti dopo amplificazione in PCR.

1, 18: Marcatore di peso molecolare (1 kb, NEB); **2-14:** reazione di PCR sul DNA totale di 13 trasformanti plastidiali; **15:** pozzetto vuoto; **16, 17:** controllo negativo= reazione di PCR sul DNA totale del ceppo cw15 wt.

In seguito all'analisi della presenza del costrutto nel genoma plastidiale dei 13 trasformanti si è proceduto a verificare la produzione della proteina E7GGG. In aggiunta sono stati analizzati altri trasformanti la cui integrazione non è stata verificata. In totale sono stati analizzati 17 trasformanti ottenuti con il costrutto pCG1-cassetta-sintetica-X/N e 4 trasformanti ottenuti con il costrutto pCG1-cassetta-sintetica-S/S.

La proteina E7GGG è prodotta da 14/17 trasformanti nel caso del costrutto pCG1-cassetta-sintetica-X/N e da 2/4 trasformanti ottenuti con il costrutto pCG1-cassetta-sintetica-S/S. Questi dati mostrano che la trasformazione del genoma plastidiale di *C. reinhardtii* consente di esprimere la proteina E7GGG di HPV-16, a differenza di quanto osservato con la trasformazione nucleare. Questo è il primo caso ad oggi riportato di produzione di un antigene di HPV in microalga.

In **figura 69** è riportata la produzione della proteina E7GGG su 9 trasformanti ottenuti

con il costrutto pCG1-cassetta-sintetica-X/N, non ancora allo stato omoplasmico.



Figura 69. Analisi dei trasformanti plastidiali ottenuti con il costrutto pCG1-cassetta-sintetica-X/N (immunoblotting con pAb α -E7).

1-9: estratti derivanti dai trasformanti plastidiali; **9:** controllo negativo= estratto derivante dal trasformatore plastidiale ottenuto con il vettore pCG1 scarico (wt); **10-14:** proteina E7GGG purificata da *E. coli* (0.3, 1, 3 e 10 ng, rispettivamente).

In seguito si è focalizzata l'attenzione sui trasformanti migliori, chiamati cloni 2 e 8, ottenuti con il costrutto pCG1-cassetta-sintetica-X/N, al fine di quantificare le rese di proteina E7GGG.

Da una prima quantificazione approssimativa, ottenuta comparando in immunoblotting il segnale ottenuto da due trasformanti con la proteina E7GGG purificata da *E. coli*, si osserva che la proteina prodotta in *Chlamydomonas* è espressa allo 0.01% delle TSP quando estratta con il tampone GB (**figura 70**).

Tuttavia, nell'ottica di esperimenti di vaccinazione in modelli murini con estratti di *Chlamydomonas* contenenti la proteina E7GGG, il tampone GB non può essere usato in quanto i reagenti che lo compongono sono tossici per gli animali, per cui sono state condotte quantificazioni sull'estratto ottenuto con il tampone PBS (compatibile con le immunizzazioni). In queste condizioni si riesce ad estrarre un quantitativo di proteina ricombinante di circa la metà rispetto a quello ottenuto con il tampone GB, ottenendo quindi rese di circa 0.005%).

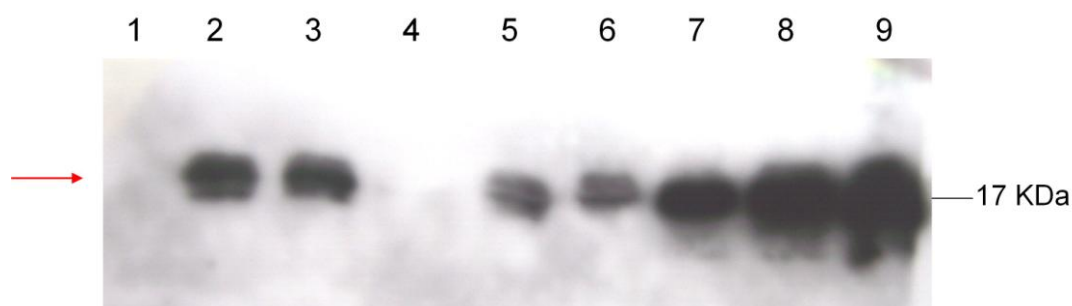


Figura 70. Quantificazione dei livelli di espressione della proteina E7GGG in due trasformanti plastidiali (cloni 2 e 8) (immunoblotting con pAb α -E7).

1: Controllo negativo= estratto derivante dal trasformatore plastidiale ottenuto con il vettore pCG1 scarico (wt) ottenuto con il tampone GB; **2:** estratto derivante dal trasformatore plastidiale (clone 2) ottenuto con il tampone GB; **3:** estratto derivante dal trasformatore plastidiale (clone 8) ottenuto con il tampone GB; **4:** controllo negativo= estratto derivante dal trasformatore plastidiale ottenuto con il vettore pCG1 scarico (wt), ottenuto con il tampone PBS; **5:** estratto derivante dal trasformatore plastidiale (clone 2) ottenuto con il tampone PBS; **6:** estratto derivante dal trasformatore plastidiale (clone 8) ottenuto con il tampone PBS; **7-9:** proteina E7GGG purificata da *E. coli* (5, 10 e 25 ng, rispettivamente).

C) USO DI PROTEINE VEGETALI COME “CARRIER” PER INCREMENTARE L’IMMUNOGENICITA’ DELL’ANTIGENE E7 PER LA PRODUZIONE DI VACCINI TERAPEUTICI CONTRO LE LESIONI ASSOCIATE AD HPV

Nel tentativo di individuare nuove molecole a valore immunomodulatorio in grado di migliorare la ‘visibilità’ della proteina E7 di HPV-16, ai fini della realizzazione di vaccini terapeutici anti-tumorali, sono state esplorate le proprietà immunologiche della saporina, una proteina vegetale già sfruttata in medicina per la realizzazione di tossine chimeriche (Stirpe, 2004; Hartley & Lord 2004; Ng *et al.* 2010). Precedentemente al presente lavoro di dottorato, era stato dimostrato che la fusione della proteina di rivestimento (CP) del virus fitopatogeno PVX con il mutante privo di potere oncogeno, E7GGG, derivato dall’oncoproteina E7 di HPV-16, quando fornita nell’ambito di una vaccinazione genetica, determina un significativo incremento della risposta immune antigene-specifica in grado di proteggere i topi dallo sviluppo del tumore (Massa *et al.*, 2008). Inoltre, era stato osservato che la fusione di E7GGG con una proteina stabile di origine batterica (LicKM) prodotta e purificata da pianta è in grado di proteggere gli animali dallo sviluppo del tumore (Massa *et al.*, 2007, Venuti *et al.*, 2009). In modo simile, in questo lavoro si è scelto di saggiare una nuova molecola proveniente dal regno vegetale, da impiegare come “carrier” immunogenico per la produzione di vaccini a subunità contro HPV, basati sull’antigene E7. La scelta è ricaduta sulla saporina apoplastica fogliare di *Saponaria officinalis*. Questa proteina, appartenente alla famiglia delle RIP, è un enzima la cui funzione principale è la capacità di depurinare gli rRNA, con conseguente arresto della sintesi proteica. Non essendo interessati a questa funzione della saporina (che viene invece sfruttata nelle classiche immunoterapie per la realizzazione di tossine chimeriche, ma alle altre proprietà (immunogenicità, capacità di indurre reazioni infiammatorie e apoptosi), si è proceduto a mutagenizzare il gene della saporina nel sito catalitico, in modo da ottenere un prodotto proteico non più attivo sui ribosomi e quindi non più tossico. Inoltre, l’estensione al C-terminale della saporina, presente in natura solo nella forma enzimatica immatura, è stata rimossa.

4.5 REALIZZAZIONE DI MUTANTI GENICI DELLA SAPORINA APOPLASTICA FOGLIARE DI *Saponaria officinalis*

4.5.1 Mutagenesi del sito catalitico della saporina

La mutagenesi del gene codificante per la saporina apoplastica fogliare (apoSAP) di *S. officinalis* è stata effettuata in 2 posizioni all’interno del sito catalitico. In questo modo la

proteina corrispondente (chiamata apoSAPKQ) non è più in grado di inattivare il ribosoma risultando sicura dal punto di vista dell'eventuale impiego come vaccino.

La mutagenesi è stata effettuata a partire dal costrutto pBS-apoSAP ottenendo il costrutto pBS-apoSAPKQ. La sequenza del gene apoSAPKQ è stata verificata per sequenziamento su DNA plasmidico di cloni trasformanti di *E. coli*, rivelandosi corretta (**figura 71**).

```

1 atgaagatat atgttgtagc cacaatagca tggatcctgc ttcaattttc agcttggaca
61 acaactgatg cggtcacatc aatcacatta gatctagtaa atccgaccgc gggtaataac
121 tcatctttttg tggataaaat ccgaacaac gtaaaggatc caaacctgaa atacggtggt
181 accgacatag ccgtgatagg cccaccttct aaagaaaaat tccttagaat taatttccaa
241 agttcccgag gaacggtctc acttggccta aaacgcgata acttgatgtg ggtcgcgtat
301 cttgcaatgg ataacacgaa tgtaatcgg gcatattact tcagatcaga aattacttcc
361 gccgagttaa ccgccctttt cccagaggcc acaactgcaa atcagaaagc tttagaatac
421 acagaagatt atcagtcgat tgaaaagaat gccagataa cacaaggaga tcaaagtaga
481 aaagaactcg ggttggggat tgacttactt tcaacgtcca tggaagcagt gaacaagaag
541 gcacgtgtgg ttaaagacga agctagattc cttcttatcg ctattcagat gacggctaag
601 gcagcgcagt ttaggtacat acaaaacttg gtaatcaaga actttcccaa caagttcaac
661 tcggaaaaca aagtgattca gtttgagggt aactggaaaa aaatttctac ggcaatatac
721 ggggatgcca aaaacggcgt gtttaataaa gattatgatt tcggggttgg aaaagtgagg
781 caggtgaagg acttgcaaat gggactcctt atgtatttgg gcaaaccaaa gtcgtcaaac
841 gaggcgaatt ctactgctta cgccactacg gtcctctga

```

Figura 71. Sequenza nucleotidica della saporina mutagenizzata (apoSAPKQ, 879 pb).

In **rosso** sono evidenziati i nucleotidi sostituiti rispetto alla sequenza originaria. I codoni coinvolti nella mutagenesi sono sottolineati.

4.5.2 Modificazioni del gene apoSAPKQ

Come già detto, in natura la saporina viene espressa dapprima come pro-peptide di 292 aa e nel momento di bisogno (ad es. un attacco da parte di un patogeno) viene processata (rimuovendo la zona C-terminale) e resa quindi attiva.

Di seguito viene riportata la sequenza amminoacidica mutagenizzata della saporina con la sequenza segnale per la via secretoria e il peptide C-terminale che viene rimosso nella forma proteica matura (**figura 72**).

MKIYVVATIAWILLQFSAWTTTDAVTSITLIDLVNPTAGQYSSFVDKIRNNVKDPNLKYGGTDI
AVIGPPSKEKFLRINFQSSRGTVSLGLKRDNLVYVAYLAMDNNTNVNRAYYFRSEITS AELTAL
FPEATANQKALEYTEDYQSIEKNAQITQGDQSRKELGLGIDLLSTSM EAVNKKARVVKDEAR
FLLIAIQMTAKAAQFRYIQNLVIKNFPNKFNS ENKVIQFEVNWKKISTAIYGDAKNGVFNKDY
DFGFGKVRQVKDLQMGLLMYLGPKPKSSNEANSTAYATTVL

Figura 72. Sequenza amminoacidica della proteina saporina mutagenizzata apoSAPKQ (292 aa).

In **rosso** è riportata la sequenza segnale; in **blu** l'estensione C-terminale che viene rimossa nella forma matura; **K**: sostituisce la E presente nella forma proteica non mutagenizzata; **Q**: sostituisce la R presente nella forma proteica non mutagenizzata; il sito catalitico è sottolineato.

La forma proteica che abbiamo usato come “carrier” manca dell'estemità C-terminale e prevede la presenza o l'assenza della sequenza segnale in modo da esplorare due compartimenti di produzione, citoplasmatico e secretorio.

Per realizzare le due forme di saporina mancanti dell'estensione C-terminale, il gene apoSAPKQ (879 pb), a partire dal template pBS-apoSAPKQ, è stato sottoposto a

reazione di PCR con coppie di oligonucleotidi specifiche (descritte nel paragrafo 13.13.2) ottenendo gli amplificati ssSAPKQ (sequenza codificante di 834 pb), che conserva la sequenza segnale e SAPKQ, privo della sequenza segnale (sequenza codificante di 765 pb). Le sequenze sono state verificate per sequenziamento su DNA plasmidico di cloni trasformanti di *E. coli*, rivelandosi corrette.

4.6 REALIZZAZIONE DEI GENI DI FUSIONE TRA E7 E LA SAPORINA

Per questa parte del lavoro si è operato con la proteina E7 nella forma mutagenizzata E7GGG. Al fine di cercare di incrementare l'immunogenicità dell'antigene E7GGG da impiegare in formulazioni vaccinali terapeutiche contro HPV, la sua sequenza nucleotidica è stata fusa al gene codificante per la saporina mutagenizzata.

Si è scelto di generare tre tipologie di geni di fusione costituiti dal gene E7 e la saporina mutagenizzati, in modo da aumentare le probabilità di ottenere una proteina stabile ed immunogenica:

- 1) ssSAPKQ-E7GGG (1125 pb, 374 aa)
- 2) SAPKQ-E7GGG (1056 pb, 351 aa)
- 3) E7GGG-SAPKQ (1056 pb, 351 aa)

Per la realizzazione dei geni di fusione, i singoli geni ssSAPKQ, SAPKQ ed E7GGG, sono stati dapprima amplificati con le coppie di inneschi specifiche che inseriscono la regione di omologia necessaria all'assemblaggio (**figura 73**).

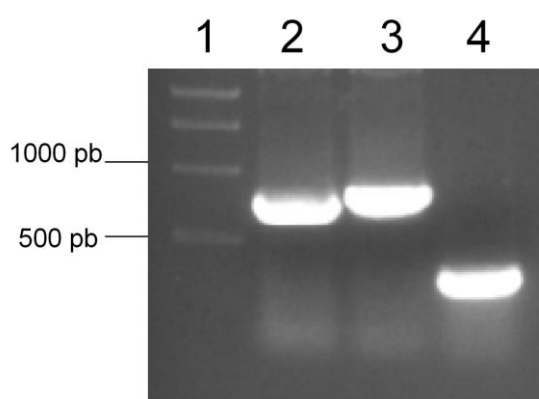


Figura 73. Amplificazione dei geni ssSAPKQ, SAPKQ ed E7GGG per l'assemblaggio

1: Marcatore di peso molecolare (1 kb, Invitrogen); 2: amplificato ottenuto sul gene SAPKQ (circa 790 pb); 3: amplificato ottenuto sul gene ssSAPKQ (circa 860 pb); 4: amplificato ottenuto sul gene E7 (circa 320 pb).

I diversi amplificati sono stati poi assemblati mediante SOE-PCR e sottoposti a PCR con le coppie di oligonucleotidi esterne, in grado di amplificare solo i prodotti assemblati

(figura 74). Tali oligonucleotidi inseriscono inoltre, a monte e a valle della sequenza genica, i siti di restrizione per il clonaggio dei geni di fusione nei vettori per l'espressione in batterio, cellule di mammifero e pianta.

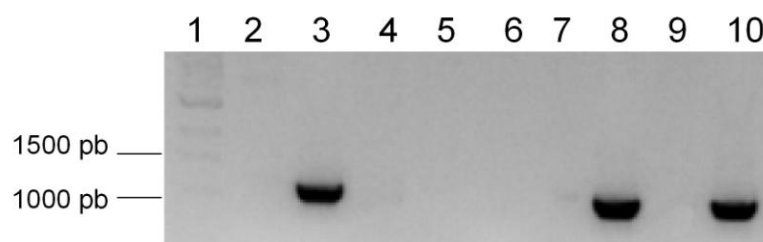


Figura 74. Amplificazione dei geni di fusione

1: Marcatore di peso molecolare (1 kb, Invitrogen); **2, 4, 5, 6, 7, 9:** pozzetti vuoti; **3:** amplificato ssSAPKQ-E7GGG (circa 1160 pb); **8:** amplificato SAPKQ-E7GGG (circa 1080 pb); **10:** amplificato E7GGG-SAPKQ (circa 1080 pb).

I tre amplificati genici ottenuti sono stati clonati nel vettore pBS ottenendo i costrutti pBS-ssSAPKQ-E7GGG, pBS-SAPKQ-E7GGG e pBS-E7GGG-SAPKQ, verificati per sequenziamento su DNA plasmidico di cloni trasformanti di *E. coli*.

4.7 PRODUZIONE DELLA SAPORINA MUTAGENIZZATA E DELLE PROTEINE DI FUSIONE IN *E. coli*

La scelta di esprimere le proteine ssSAPKQ, SAPKQ, ssSAPKQ-E7GGG, SAPKQ-E7GGG ed E7GGG-SAPKQ in batterio deriva in primo luogo dalla possibilità di verificare rapidamente la stabilità e la non tossicità di queste proteine ricombinanti in un sistema eterologo e in secondo luogo dalla possibilità di ottenere quantitativi elevati di proteina di fusione purificata per valutarne l'immunogenicità in modello murino. Inoltre queste proteine sono utili come riferimento per la verifica dell'espressione delle stesse negli altri sistemi (cellule di mammifero e pianta).

Per l'espressione in batterio delle proteine fuse ad un "tag" di istidine (His₆), i geni ssSAPKQ, ssSAPKQ e i geni di fusione sono stati clonati nel vettore pQE-30 ottenendo i costrutti schematizzati in **figura 75**, utilizzati per la trasformazione delle cellule di *E. coli*.

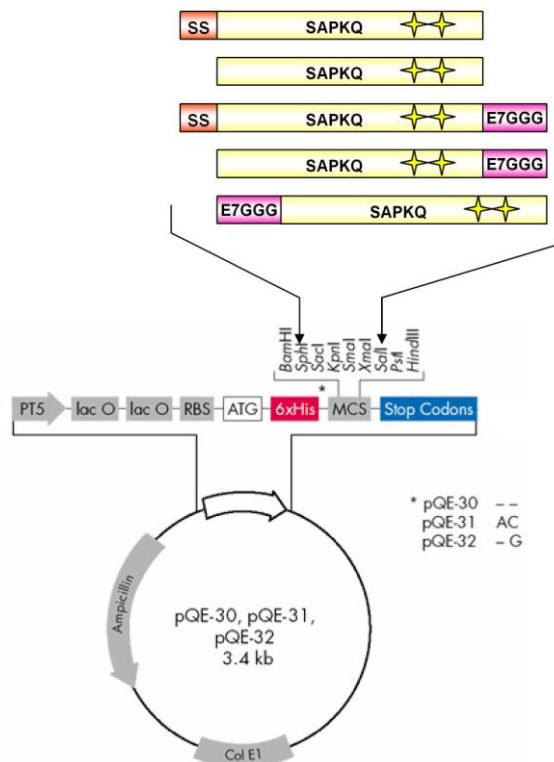


Figura 75. Schema dei costrutti ottenuti in pQE-30 per l'espressione delle proteine in batterio

Per prima cosa sono stati saggiati i costrutti pQE-30-ssSAPKQ e pQE-30-SAPKQ, in modo da valutare l'attenuazione della tossicità, dimostrata per *E. coli* usando costrutti con la saporina non mutagenizzata (Pittaluga *et al.*, 2005).

In seguito ad induzione delle colture su media scala (1 l) e quindi all'espressione dei prodotti proteici ssSAPKQ e SAPKQ, le colture non hanno mostrato problemi di crescita, dimostrando che le mutazioni hanno realmente inattivato il sito catalitico e abolito l'attività N-glicosidasi della saporina. Le proteine His₆-ssSAPKQ-E7GGG e His₆-SAPKQ-E7GGG sono state purificate in condizioni denaturanti mediante l'impiego della resina Ni-NTA (**figura 76**).

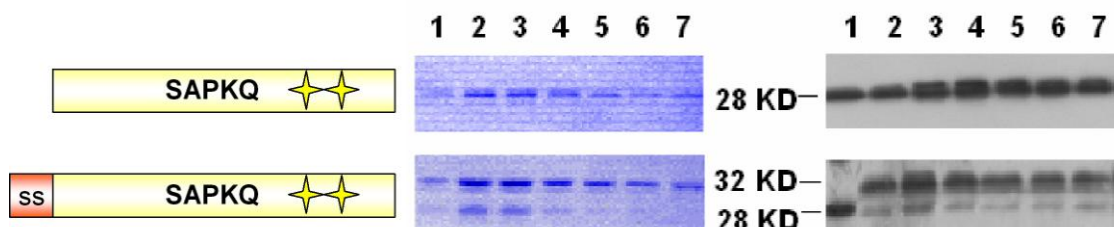


Figura 76. Analisi delle frazioni purificate da *E. coli* delle proteine SAPKQ e ssSAPKQ mediante colorazione con Coomassie blue e immunoblotting (pAb α -SAP).

Nella parte superiore è riportata l'analisi della proteina SAPKQ, mentre nella parte inferiore quella della proteina ssSAPKQ. Nel primo pozzetto dell'immunoblotting sia nella parte superiore che inferiore è riportata la frazione di eluizione E1 della SAPKQ.

1: Frazione di eluizione E1; **2:** frazione di eluizione E2; **3:** frazione di eluizione E3; **4:** frazione di eluizione E4; **5:** frazione di eluizione E5; **6:** 3: frazione di eluizione E6; **7:** frazione di eluizione E7.

In figura 76 si osservano per il costrutto SAPKQ, sia mediante colorazione del gel con blu di Coomassie che mediante immunoblotting con l'anticorpo pAb α -SAP, le bande corrispondenti a circa 28 KDa delle varie frazioni di eluizione. Per il costrutto ssSAPKQ si osserva invece una banda principale a circa 32 KDa (indicando quindi che probabilmente la sequenza segnale non viene riconosciuta e tagliata da *E. coli*) e una banda a circa 28 KDa, che potrebbe essere un prodotto di degradazione della proteina. Dopo aver verificato l'espressione delle proteine ssSAPKQ e SAPKQ, si è proceduto a verificare l'espressione delle proteine di fusione, analizzando sia le frazioni solubili che insolubili estratte dalle colture indotte (**figura 77**).

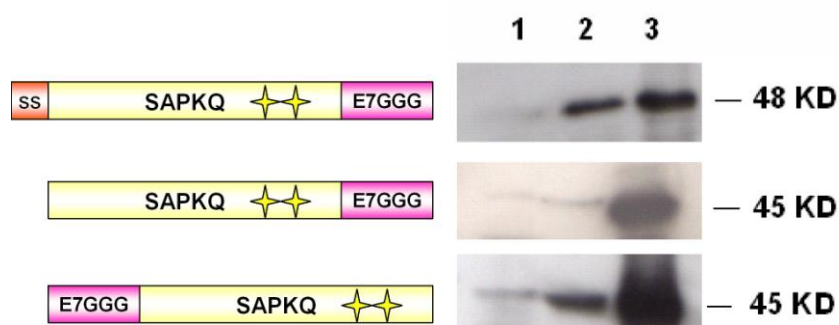


Figura 77. Analisi delle frazioni solubili e insolubili estratte dalle colture indotte di *E. coli* contenenti i costrutti di fusione mediante immunoblotting (pAb α -E7).

Nella parte superiore è riportata l'analisi della proteina ssSAPKQ-E7GG, nella parte centrale quella della proteina SAPKQ-E7GGG e nella parte inferiore quella della proteina E7GGG-SAPKQ.

1: coltura non indotta; **2:** coltura indotta frazione solubile; **3:** coltura indotta frazione insolubile.

Come si osserva in figura 77, in tutti e tre i casi, le proteine di fusione vengono prodotte, sebbene la maggior parte della proteina si trovi nella frazione insolubile. Anche in questo caso la sequenza segnale della saporina non viene riconosciuta da *E. coli*, in quanto la banda che si osserva per la proteina di fusione ssSAPKQ-E7GGG è più alta (circa 48 KDa) di quella osservata per le proteine prive della sequenza segnale SAPKQ-E7GGG e E7GGG-SAPKQ (circa 45 KDa). Sono state effettuate delle prove di purificazione delle proteine di fusione su piccola scala (non mostrato), ma prima di procedere alla purificazione su media-grande scala sarà necessario ottimizzare il protocollo di espressione e di purificazione.

4.8 VACCINI GENETICI BASATI SULLE SEQUENZE DI FUSIONE TRA E7 E LA SAPORINA

Verificata l'espressione in *E. coli*, i relativi geni sono stati clonati in un vettore per l'espressione in cellule di mammifero, al fine di realizzare vaccini genetici e di valutare le risposte immunitarie in un modello pre-clinico. Prima di procedere con la vaccinazione

degli animali con i costrutti a DNA, l'espressione delle proteine di fusione è stata verificata in cellule di mammifero in coltura.

4.8.1 Preparazione dei costrutti e verifica dell'espressione in cellule di mammifero

I costrutti basati sui geni di fusione sono stati ottenuti clonando gli inserti ssSAPKQ-E7GGG, SAPKQ-E7GGG ed E7GGG-SAPKQ nel vettore pVAX1; inoltre, al fine di avere dei controlli negli esperimenti di vaccinazione, sono stati preparati anche i costrutti pVAX1-E7GGG e pVAX1-SAPKQ (**figura 78**).

Una colonia trasformante di *E. coli* per ciascun costrutto è stata poi impiegata per effettuare una maxi-preparazione plasmidica in condizioni tali da ottenere un DNA purificato che dovrebbe essere completamente privo di endotossine batteriche, che potrebbero interferire con i processi di trasfezione delle cellule di mammifero. Una piccola aliquota del DNA è stata utilizzata per la verifica della sequenza che ha confermato la correttezza dei clonaggi effettuati.

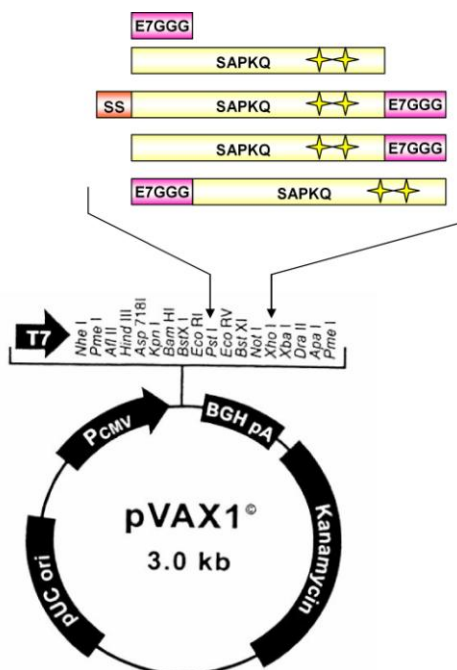


Figura 78. Schema dei costrutti ottenuti in pVAX1 per l'espressione delle proteine in cellule di mammifero

I vari plasmidi ricombinanti (pVAX1-E7GGG, pVAX1-SAPKQ, pVAX1-ssSAPKQ-E7GGG, pVAX1-SAPKQ-E7GGG e pVAX1-E7GGG-SAPKQ) sono stati impiegati per la trasfezione della linea cellulare di mammifero HEK-293, al fine di verificare l'espressione delle proteine corrispondenti in un sistema mammifero prima di procedere con la vaccinazione degli animali. Le trasfezioni sono state effettuate in presenza

dell'inibitore del proteasoma MG-132, aggiunto a 24 ore dall'aggiunzione del DNA. 48 ore dopo la trasfezione, i lisati cellulari contenenti 1×10^6 cellule sono stati estratti e analizzati mediante immunoblotting (**figura 79**).

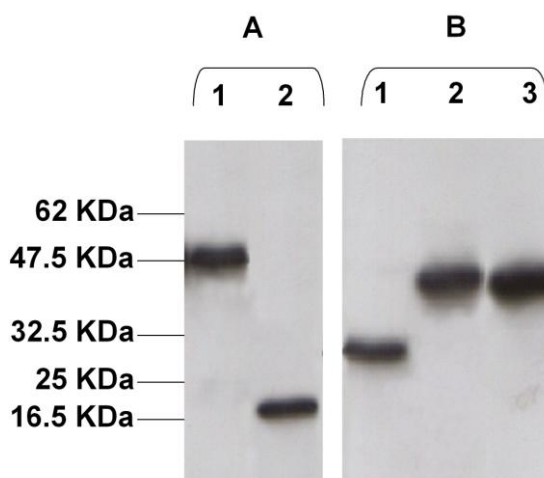


Figura 79. Analisi delle proteine prodotte in cellule di mammifero.

A) immunoblotting con pAb α -E7. 1: ssSAPKQ-E7GGG (circa 48 kDa); 2: E7GGG (circa 17 kDa).

B) immunoblotting con pAb α -SAP. 1: SAPKQ (circa 28 kDa); 2: SAPKQ-E7GGG (circa 45 kDa); 3: E7GGG-SAPKQ (circa 45 kDa).

Le proteine sono tutte espresse. Anche in questo sistema di espressione, la sequenza segnale della saporina sembra non essere riconosciuta e processata, in quanto la banda che si osserva per la proteina ssSAPKQ-E7GGG presenta un peso molecolare superiore (circa 48 kDa) rispetto alle proteine che ne sono privi SAPKQ-E7GGG e E7GGG-SAPKQ (circa 45 kDa).

4.9 VACCINAZIONI TERAPEUTICHE A DNA IN MODELLO PRE-CLINICO E VALUTAZIONE DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE

Verificata la capacità dei costrutti basati sul vettore pVAX1 di esprimersi in cellule di mammifero, i plasmidi ricombinanti sono stati preparati mediante purificazione in gradiente di CsCl e impiegati per la vaccinazione dei topi.

4.9.1 Scheda di vaccinazione terapeutica e valutazione della protezione dallo sviluppo del tumore

Per gli esperimenti di vaccinazione sono stati utilizzati gruppi di 5 topi di ceppo C57BL/6 di sesso femminile per ciascun costrutto a DNA. In un primo esperimento, la vaccinazione di 5 topi è stata condotta con un "pool" dei costrutti pVAX1-ssSAPKQ-E7GGG, pVAX1-SAPKQ-E7GGG e pVAX-E7GGG-SAPKQ, al fine di ottenere una prova di concetto circa il possibile effetto biologico della vaccinazione sulla crescita tumorale. Inoltre un gruppo di 5 topi è stato immunizzato con il costrutto pVAX1-E7GGG, in modo da avere

un confronto tra la risposta ottenuta con l'antigene E7 da solo e quella ottenuta impiegando il "carrier" SAPKQ. Nel secondo esperimento invece, sono stati valutati i costrutti separatamente.

Per valutare l'effetto biologico del vaccino sulla crescita tumorale, i topi, dopo circa 8-10 giorni di permanenza nella gabbia sperimentale, sono stati inoculati con la dose tumorigenica molto aggressiva di cellule TC-1* (5×10^3 cellule) mediante iniezione sottocutanea sul quadricipite femorale e quindi suddivisi in gabbie distinte per ogni vaccino. I vaccini a DNA sono stati iniettati tre giorni dopo mediante iniezione intramuscolare. Il trattamento è stato ripetuto, con le stesse modalità, a distanza di una settimana dal primo inoculo. Come controllo, è stato impiegato un gruppo di 5 topi inoculati con le cellule tumorali ma non vaccinati con i costrutti a DNA.

Gli animali sono stati esaminati due volte alla settimana per l'eventuale comparsa e misurazione del tumore fino al 60° giorno, in cui sono stati sacrificati.

Per valutare l'induzione delle risposte immunitarie cellulo-mediate e/o umorali indotte dai costrutti a DNA, 5 o 6 topi per ciascun costrutto sono stati immunizzati in assenza di inoculo delle cellule tumorali TC-1*.

Il primo esperimento di vaccinazione terapeutica ha mostrato che la fusione dell'antigene E7GGG con il "carrier" SAPKQ è in grado di generare un effetto anti-tumorale più potente contro i tumori aggressivi esprimenti E7 indotti dalle cellule TC-1*, rispetto al trattamento con il gene E7GGG da solo. Infatti come è mostrato in **figura 80**, è stato riportato un ritardo nello sviluppo del tumore e una protezione totale dallo sviluppo del tumore è stata riscontrata nel 40% degli animali immunizzati con il "pool" di plasmidi, rispetto a quelli vaccinati con il plasmide pVAX1-E7GGG o pcDNA-E7GGG (tale costrutto a DNA era stato sviluppato precedentemente nel nostro laboratorio con il vettore pcDNA 3.1, Massa *et al.*, 2008).

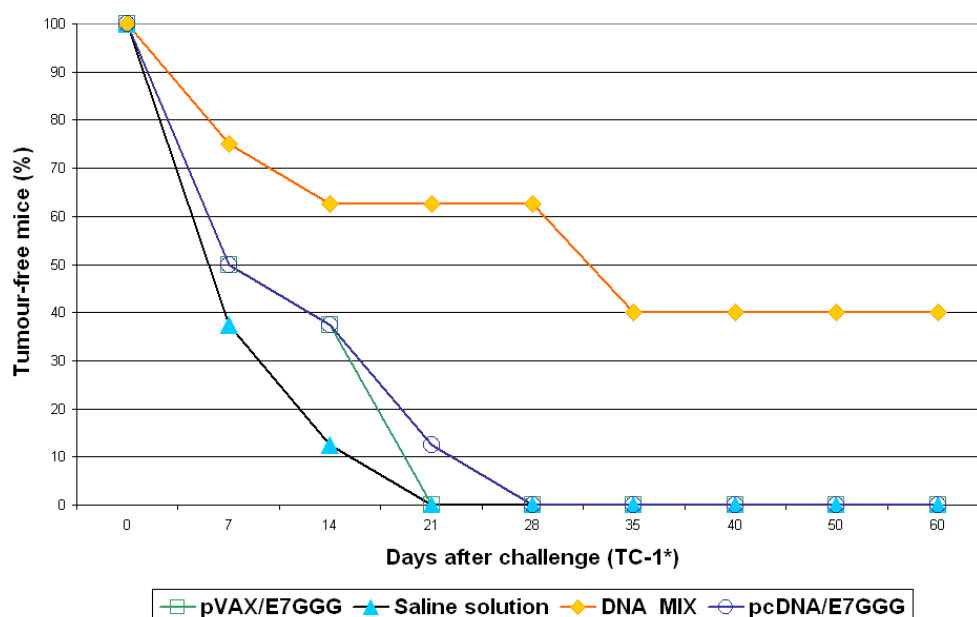


Figura 80. Protezione da sfida con cellule tumorali esprimenti E7 conferita dalla vaccinazione con il “pool” di plasmidi pVAX1-ssSAPKQ-E7GGG, pVAX1-SAPKQ-E7GGG e pVAX-E7GGG-SAPKQ (indicato in **arancio**, DNA mix).

Successivamente è stata valutata la protezione conferita dai plasmidi pVAX1-ssSAPKQ-E7GGG, pVAX1-SAPKQ-E7GGG e pVAX-E7GGG-SAPKQ somministrati singolarmente. Come si osserva in **figura 81**, il massimo dell’efficacia è stata riscontrata impiegando i costrutti pVAX1-SAPKQ-E7GGG e pVAX1-E7GGG-SAPKQ (40 % degli animali non sviluppano tumore), seguiti dal costrutto pVAX1-ssSAPKQ-E7GGG (20 %) e dal costrutto pVAX1-E7GGG (0%).

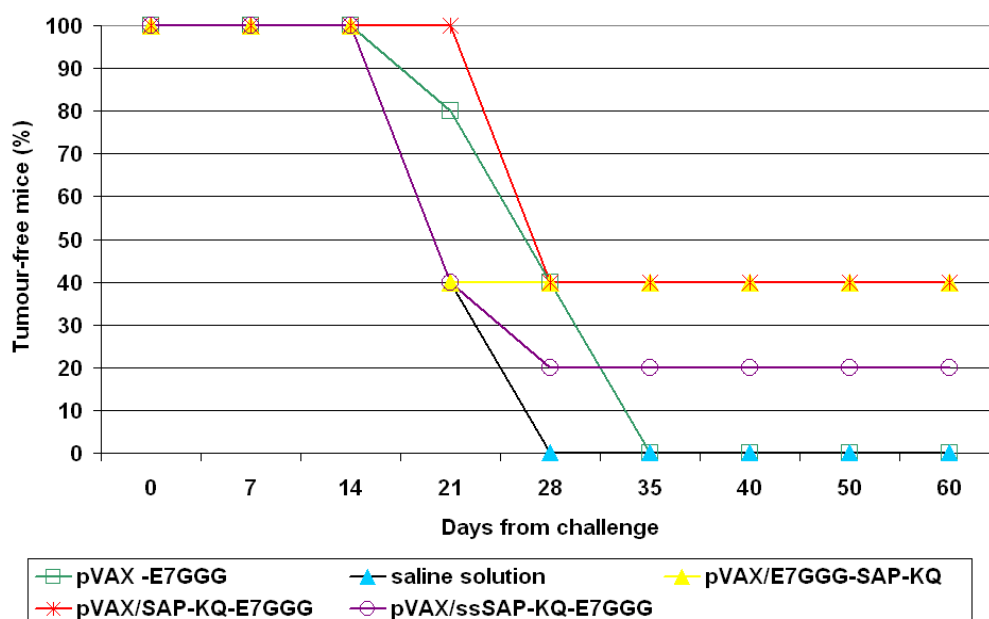


Figura 81. Protezione da sfida con cellule tumorali esprimenti E7 conferita dalla vaccinazione con i costrutti pVAX1-ssSAPKQ-E7GGG, pVAX1-SAPKQ-E7GGG e pVAX-E7GGG-SAPKQ somministrati singolarmente.

4.9.2 Analisi della risposta umorale e cellulo-mediata negli animali immunizzati

La valutazione della risposta anticorpale ottenuta sui topi vaccinati con i differenti costrutti è stata effettuata mediante saggio ELISA, come descritto nel paragrafo 3.18.3.

Rispetto ai sieri dei topi immunizzati con il plasmide pVAX1-E7GGG, i sieri dei topi immunizzati con i costrutti contenenti i geni di fusione (in particolare pVAX1-E7GGG-SAPKQ) hanno mostrato titoli di IgG totali contro E7 più alti (**figura 82**).

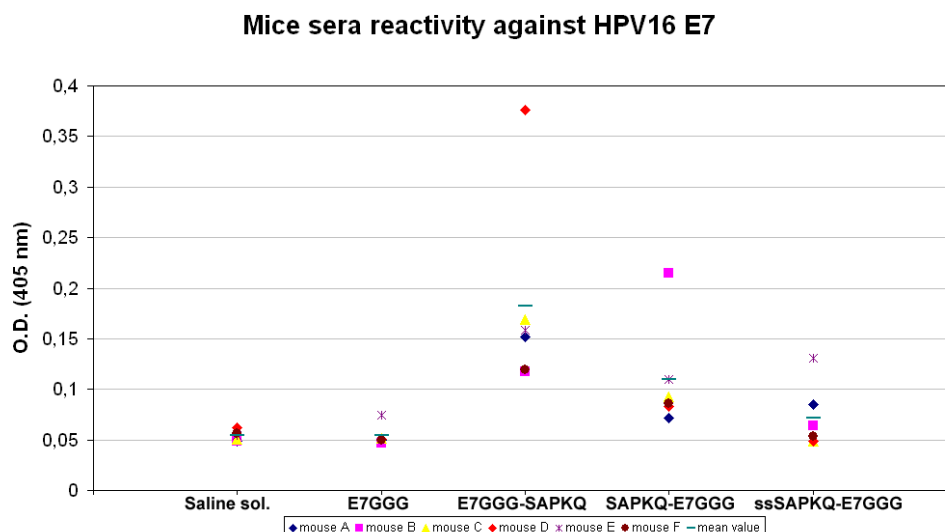


Figura 82. Saggio ELISA dei sieri dei topi vaccinati.

Le risposte IgG E7-specifiche sono presentate come valori di densità ottica a 405 nm dei sieri diluiti 1:100. Il valore medio dei titoli anticorpali ottenuti per ogni gruppo di topi vaccinati con un costrutto è rappresentato da una linea celeste.

Inoltre, è stata valutata l'induzione di cloni linfocitari E7-specifici in seguito alla vaccinazione con le preparazioni descritte. In particolare è stato valutato il numero di linfociti splenici secernenti IFN- γ in risposta all'epitopo specifico. Ci si è serviti, in proposito, della tecnica dell'ELISPOT (**figura 83**).

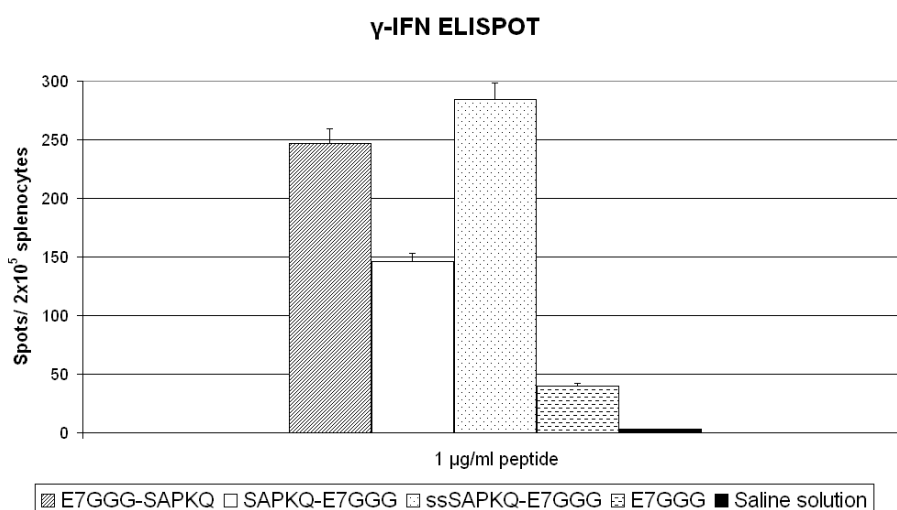


Figura 83. ELISPOT relativo agli splenociti isolati dai topi immunizzati con i plasmidi stimolati dal peptide CTL E7-specifico H-2D^b (aa 49-57, RAHYNIVTF). In ordinata è espresso il numero degli spot/ 2×10^5 splenociti.

Come mostrato in figura 83, la fusione di E7GGG con la SAPKQ, nelle tre forme E7GGG-SAPKQ, SAPKQ-E7GGG e ssSAPKQ-E7GGG determina un incremento della popolazione linfocitaria T E7-specifica stimolata dall'immunizzazione a DNA rispetto al a E7GGG da sola in seguito a sfida con cellule tumorali. La risposta CD8⁺ più alta è ottenuta con il costrutto pVAX1-ssSAPKQ-E7GGG.

4.10 PRODUZIONE DELLE PROTEINE DI FUSIONE TRA E7 E LA SAPORINA IN PIANTA

Parallelamente ai costrutti per la vaccinazione genetica, sono stati realizzati i costrutti per la produzione transiente in pianta delle proteine di fusione, al fine di sviluppare vaccini a subunità proteici.

4.10.1 Preparazione dei costrutti ed espressione in pianta

Per l'espressione in pianta delle proteine di fusione, i geni ssSAPKQ-E7GGG, SAPKQ-E7GGG e E7GGG-SAPKQ sono stati clonati nel vettore pPVX201 ottenendo i costrutti schematizzati in **figura 84**. I trasformanti batterici ottenuti sono stati verificati mediante PCR su colonia ed una o due colonie positive per ciascun costrutto sono state impiegate per effettuare maxipreparazioni di DNA plasmidico per le infezioni delle piante che sono state verificate mediante sequenziamento.

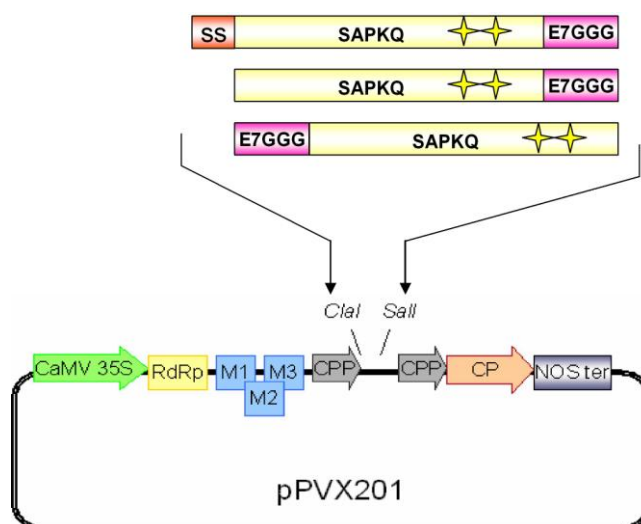


Figura 84. Schema dei costrutti ottenuti in pPVX201 per l'espressione delle proteine in pianta

Piante di *N. benthamiana* infettate con i costrutti pPVX-ssSAPKQ-E7GGG, pPVX-SAPKQ-E7GGG e pPVX-E7GGG-SAPKQ hanno mostrato i primi sintomi dell'infezione da PVX sulle foglie inoculate dopo circa 4 giorni. Dopo circa 7-10 giorni, i sintomi si

sono manifestati anche a livello sistemico, ma non in tutte le piante. Questi dati dimostrano che il virus ricombinante non rimane intrappolato nel luogo di inoculo, ma riesce a circolare nella via sistemica. Le foglie inoculate e sistemiche sintomatiche di ciascuna pianta sono state collezionate separatamente e conservate a -80 °C.

L'analisi della presenza delle diverse proteine di fusione è stata condotta sia nella frazione solubile (preparando gli estratti sia in tampone PBS sia in tampone GB), sia nella frazione insolubile (preparando gli estratti in tampone TEPT). Solo analizzando la frazione insolubile delle piante infettate con i diversi costrutti si osserva in immunoblotting con l'anticorpo pAb α -E7, la banda a circa 45 KDa, corrispondente alle proteine di fusione (**figura 85**, indicata con la freccia blu). Tuttavia, questa banda è molto debole (soprattutto nel caso della proteina E7GGG-SAPKQ, figura 85 pozzetto 3) per cui difficilmente apprezzabile sull'immagine acquisita elettronicamente.

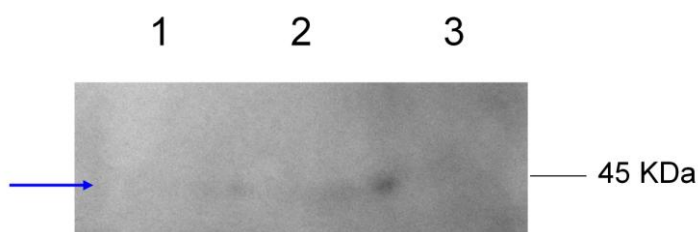


Figura 85. Analisi delle frazioni insolubili estratte dalle piante infettate con i costrutti di fusione (immunoblotting con pAb α -E7).

- 1: estratto di foglie sistemiche di piante infettate con il costrutto pPVX-SAPKQ-E7GGG
- 2: estratto di foglie sistemiche di piante infettate con il costrutto pPVX-ssSAPKQ-E7GGG
- 3: estratto di foglie sistemiche di piante infettate con il costrutto pPVX-E7GGG-SAPKQ

Inoltre, come si osserva in **figura 86**, pozzetto 3, si riporta la presenza di almeno una banda nei fluidi intercellulari estratti da foglie sistemiche di piante infettate con il costrutto secretorio pPVX-ssSAPKQ-E7GGG, ma non nei fluidi intercellulari di piante infettate con il costrutto privo di sequenza segnale pPVX-SAPKQ-E7GGG (pozzetto 7) e di piante infettate con il vettore pPVX201 “scarico” (pozzetto 8). Ciò significa che la sequenza segnale riesce effettivamente a veicolare la proteina di fusione nell'apoplasto. Tuttavia, la banda principale che si osserva ha un peso molecolare notevolmente inferiore all'atteso (circa 25 KDa); inoltre è presente una banda meno intensa di circa 28 KDa. Questi risultati suggeriscono che probabilmente avvengono dei processi di proteolisi, osservati anche nel caso dell'estratto solubile citoplasmatico (pozzetti 4 e 5). Questi aspetti dovranno essere ulteriormente investigati.

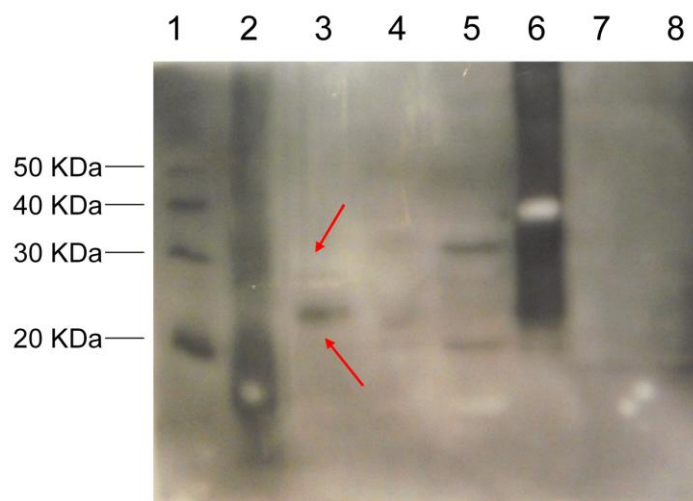


Figura 86. Analisi dei fluidi intercellulari e delle frazioni solubili citoplasmatiche estratte dalle piante infettate con il costrutto di fusione pPVX-ssSAPKQ-E7GGG (immunoblotting con pAb α -E7).

1: Marcatore di peso molecolare (Magic Mark, Invitrogen); **2:** Proteina E7GGG purificata da *E. coli*; **3:** fluidi intercellulari estratti da foglie sistemiche di due piante di *N. benthamiana* infettate con il costrutto pPVX-ssSAPKQ-E7GGG; **4, 5:** estratto di foglie sistemiche di due piante di *N. benthamiana* infettate con il plasmide pPVX-ssSap-E7GGG; **6:** Proteina LicKM-E7GGG purificata da pianta; **7:** fluidi intercellulari estratti da foglie sistemiche di due piante di *N. benthamiana* infettate con il costrutto pPVX-SAPKQ-E7GGG; **8:** fluidi intercellulari estratti da foglie sistemiche di due piante di *N. benthamiana* infettate con il plasmide wt pPVX201

I livelli di espressione ottenuti non hanno consentito di effettuare esperimenti di vaccinazione in modello pre-clinico e quindi non è stato possibile valutare l'eventuale incremento dell'immunogenicità della formulazione vaccinale basata sulla proteina E7 rispetto alle formulazioni precedenti ottenute nel nostro laboratorio.

5. DISCUSSIONE

Le piante si sono rivelate da sempre organismi estremamente duttili, capaci di adattarsi alle necessità dell'uomo, per scopi agricoli e medicinali. Con l'avvento delle biotecnologie vegetali, le piante sono state impiegate anche come bioreattori per la produzione di diverse molecole eterologhe di interesse. In particolare, negli ultimi dieci anni si è osservata un'elevata crescita dell'impiego delle piante e di altri sistemi vegetali strettamente correlati, per l'espressione di biofarmaceutici. Infatti, le piante offrono molteplici vantaggi rispetto ai sistemi convenzionali impiegati attualmente per la produzione di molecole di interesse farmaceutico. Oltre al fatto di essere organismi eucariotici in grado di dare origine a molecole con elevata autenticità strutturale (modificazioni post-traduzionali), alla capacità di crescere velocemente in condizioni di non-sterilità e a bassi costi, le piante rappresentano una piattaforma di produzione sicura per l'uomo in quanto non contengono patogeni umani noti (prioni, virus, etc.). Inoltre, nel caso della produzione di proteine a scopo vaccinale, l'utilizzo di specie edibili offrirebbe la possibilità di somministrare oralmente il materiale vegetale (senza necessità quindi di purificare la proteina di interesse) consentendo la possibilità di stimolare l'immunità mucosale, molto importante nel caso di patogeni che entrano nell'organismo attraverso le superfici mucosali.

Oltre all'uso di piattaforme di produzione basate su piante intere coltivate in campo o cresciute in serre, sono stati sviluppati altri sistemi di espressione vegetali capaci di crescere in condizioni di maggiore contenimento, come le sospensioni cellulari, le colture di organi (es. radici), le specie acquatiche della famiglia delle *Lemnaceae*, lo stadio vegetativo del muschio *Physcomitrella patens* e le microalghe fotosintetiche. Ognuno di questi sistemi presenta punti di forza o debolezza rispetto agli altri; tuttavia, per la produzione commerciale di molecole terapeutiche e vaccini per l'uomo, che devono attenersi ai criteri di produzione GMP, i sistemi vegetali "a contenimento" potrebbero rappresentare delle piattaforme più accettabili, in quanto più simili a quelle impiegate attualmente (batteri, lieviti, cellule di insetto e di mammifero in coltura).

Il presente lavoro di dottorato è stato realizzato con l'intento principale di impiegare i sistemi vegetali per l'espressione di antigeni di virus patogenici per l'uomo, al fine di sviluppare formulazioni vaccinali efficaci e/o test diagnostici specifici a basso costo e di sfruttare le piante anche come sorgente di molecole immunomodulatorie, in grado di potenziare le formulazioni vaccinali sviluppate nel nostro laboratorio.

Una parte di questo lavoro si è incentrata sull'agente eziologico della SARS, il SARS-

CoV. La SARS è stata la prima malattia infettiva a carattere potenzialmente pandemico del XXI secolo. Infatti, è una malattia altamente trasmissibile e, nonostante l'applicazione di protocolli di quarantena e l'uso di sostanze antivirali ad ampio spettro, nel giro di pochi mesi dalla prima identificazione in Cina nel 2002, casi di SARS sono stati rilevati in più di 29 paesi in tutto il mondo. In seguito alla prima epidemia, altri casi di SARS sono stati riportati nel 2004, a causa di contaminazioni accidentali nei laboratori e di contatti con animali infettati. Ad oggi la trasmissione della malattia si è fermata, ma a causa della possibilità di insorgenza di nuovi casi e del possibile utilizzo del SARS-CoV in attacchi bioterroristici, è necessario sviluppare strumenti diagnostici rapidi ed univoci e vaccini efficienti e sicuri.

I principali metodi diagnostici immunoenzimatici che sono stati sviluppati per la SARS si basano principalmente sulla proteina del nucleocapside N, in quanto è una delle proteine espresse in maniera predominante durante gli stadi precoci (anche dopo un giorno) dell'infezione da SARS-CoV e contro la quale si verifica una forte risposta anticorpale rilevabile pochi giorni dopo l'infezione (Tan *et al.*, 2004; Surjit *et al.*, 2007). Fino ad ora sono stati allestiti saggi diagnostici basati sulla proteina N prodotta in *E. coli* (Das & Suresh, 2006), in cellule di lievito (Liu *et al.*, 2004), o in cellule di insetto (Saijo *et al.*, 2005). Il sistema di espressione basato sulla proteina N prodotta in *E. coli* presenta bassi costi e alta reattività, ma è stato dimostrato che produce falsi positivi a causa dell'interferenza degli antigeni derivanti dal batterio stesso, per cui la qualità della purificazione in questo caso è cruciale (Leung *et al.*, 2006; Yip *et al.*, 2007).

In questo lavoro di dottorato la pianta è stata sfruttata come sistema alternativo di espressione della nucleoproteina N per l'allestimento di un saggio diagnostico. Durante lo svolgimento della tesi di laurea era stato già dimostrato che la proteina N del SARS-CoV poteva essere prodotta transientemente in piante di *N. benthamiana* in forma solubile, in seguito ad infezione con il vettore derivante dal virus X della patata, contenente il gene N (pPVX-His₆-N). Si era scelta questa tecnologia di espressione transiente in quanto tale vettore permette generalmente la produzione di buoni quantitativi di proteina eterologa in tempi brevi.

Nel presente lavoro è stata dimostrata la stabilità del costrutto pPVX-His₆-N in seguito a cicli di re-infezione delle piante con il materiale vegetale ottenuto dall'infezione precedente. La possibilità di re-infettare le piante permette di ottenere elevati quantitativi di materiale vegetale esprimente la proteina in tempi brevi (circa 7-10 giorni dopo l'infezione). E' stato possibile ottenere la proteina N almeno fino al III ciclo di re-infezione, dimostrando che il costrutto è stabile. Tale condizione non è sempre ottenibile,

specialmente quando geni di grandi dimensioni come N vengono inseriti nella cassetta di espressione del vettore pPVX201 a causa dell'eliminazione dell'inserito nel corso dei cicli di replicazione virale (Avesani *et al.*, 2007). Inoltre, a differenza di quanto osservato per la proteina N prodotta in *E. coli*, la proteina N prodotta in pianta è stabile, anche dopo congelamento e scongelamento degli estratti, o dopo lunghi periodi di conservazione (circa 3 anni) in seguito a liofilizzazione del materiale vegetale; tali risultati sono promettenti in vista del suo impiego come strumento di diagnosi. La quantificazione della proteina ha mostrato livelli di espressione di circa 3 µg/g di tessuto fresco, un risultato simile a quello ottenuto con il vettore pPVX per la proteina E7 di HPV-16 (Franconi *et al.*, 2002).

Di conseguenza è stata valutata la possibilità di impiegare la proteina N, presente nell'estratto grezzo vegetale o purificata, in saggi diagnostici sierologici. Queste valutazioni sono state possibili in quanto, nell'ambito della collaborazione con la Dott.ssa Paola Di Bonito dell'Istituto Superiore di Sanità, si dispone di sieri di pazienti cinesi convalescenti, affetti da SARS durante l'epidemia del 2002-2003. In entrambe le forme, la proteina N prodotta in pianta viene riconosciuta dai sieri dei pazienti SARS positivi, dimostrando di essere antigenica anche a diluizioni dei sieri SARS più spinte (1:500) di quelle riportate in letteratura (1:50) per i saggi immunoenzimatici per tutte le proteine del SARS-CoV (Tang *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2006). Inoltre il riconoscimento sembra essere specifico, almeno per i dati analizzati finora, in quanto non si osserva il riconoscimento della proteina da parte dei sieri affetti da altre malattie respiratorie non correlate alla SARS, nemmeno quando impiegata sotto forma di estratto vegetale grezzo.

Anche se il nostro sistema potrebbe essere reso più robusto aumentando i livelli di espressione e verificando la reattività della proteina prodotta in pianta su un numero maggiore di sieri di pazienti SARS-CoV e di pazienti affetti da altre malattie respiratorie o da altri coronavirus, questo dato è molto interessante perchè mostra come la pianta rappresenti un buon sistema di produzione di antigeni per diagnostica specifica a basso costo.

La proteina N che abbiamo prodotto in pianta potrebbe inoltre essere utilizzata per la formulazione di vaccini sicuri contro il SARS-CoV. Attualmente non esistono in commercio vaccini per la prevenzione dell'infezione da SARS-CoV ma sono in elaborazione diverse formulazioni, comprendenti vaccini basati su virus inattivati e vaccini a subunità basati su VLP, peptidici/proteici e genetici (Roper & Rehm, 2009). Tuttavia, la produzione di vaccini basati su virus inattivati è complicata dalla necessità di applicare condizioni di biosicurezza di livello 3 (il SARS-CoV è un patogeno di classe C); inoltre proprio a causa dell'alta patogenicità virale, tali formulazioni non sono

completamente sicure per l'uso clinico. L'uso di vaccini a subunità di seconda generazione risulta quindi un'utile alternativa nel caso del SARS-CoV. Il candidato vaccinale più studiato è rappresentato dalla proteina S prodotta in forma ricombinante, che è in grado di indurre una forte risposta anticorpale neutralizzante in grado di bloccare l'infezione virale con alta efficienza. Per ottenere una risposta immunitaria più efficace, la proteina N rappresenta un candidato molto interessante. Essa, di per sé, non fornisce protezione contro il SARS-CoV in quanto è localizzata all'interno del capside virale e non risulta quindi accessibile agli anticorpi durante i primi stadi dell'infezione (Surjit *et al.*, 2007). D'altra parte però, la proteina N è in grado di indurre una risposta cellulo-mediata efficiente (Buchholz *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2004) e un vaccino basato su questa proteina potrebbe beneficiare di tali proprietà. Vaccini peptidici/proteici basati sulla proteina N sono stati prodotti in sistemi eterologhi come *E. coli* e *Lactobacillus lactis* (Pei *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006) e più recentemente è stata riportata la produzione della proteina in tabacco mediante agroinfiltrazione ed utilizzando l'inibitore del "silencing" P19 (Zheng *et al.*, 2009). Risposte immunitarie sia di tipo umorale che cellulo-mediato e l'attivazione di molecole responsabili delle risposte innate sono state riscontrate in seguito a vaccinazione con questa proteina in topo, anche se questo non è un ospite naturale del SARS-CoV e quindi non rappresenta il miglior modello animale da utilizzare per valutare l'efficacia del vaccino.

Il secondo antigene del SARS-CoV preso in considerazione in questo lavoro di dottorato è rappresentato dalla glicoproteina M, una proteina transmembrana presente sulla superficie virale, reattiva con i sieri di pazienti SARS convalescenti (He *et al.*, 2005) e quindi potenzialmente utilizzabile nella diagnosi sierologica della SARS. Inoltre, è stato dimostrato che essa è in grado di elicitarne risposte anticorpali neutralizzanti contro il SARS-CoV, per cui è stato suggerito il suo impiego per la formulazione di vaccini protettivi (Pang *et al.*, 2004; Roper & Rehm, 2009). In aggiunta, uno studio comparativo di vaccinazioni a DNA basate sugli antigeni S, M ed N, mostra che la risposta cellulo-mediata più forte è stata generata da M (Wang *et al.*, 2005) e i pazienti affetti da SARS mostrano una memoria duratura di tipo CD4⁺ e CD8⁺ contro l'antigene M (Yang *et al.*, 2007), rafforzando l'ipotesi di impiegare questa proteina sia nella diagnosi che nella prevenzione dell'infezione da SARS-CoV.

Tuttavia, il problema principale dell'impiego di questa proteina in saggi diagnostici o in formulazioni vaccinali deriva dalla difficoltà nell'ottenere elevati quantitativi di proteina in sistemi eterologhi; infatti, la produzione della proteina M è difficile e le uniche forme espresse con successo sono costituite solamente dalle regioni idrofiliche della proteina in

E. coli (Carattoli *et al.*, 2005), oppure dalla proteina intera nel lievito *Pichia pastoris* (Huan *et al.*, 2004b).

Durante la tesi di laurea della sottoscritta era stata dimostrata la possibilità di esprimere una forma mutata in tre posizioni amminoacidiche della proteina M in cellule di *E. coli* e la forma originaria in cellule di mammifero. Inoltre, si era cercato di esprimerla transientemente in pianta, mediante l'impiego del vettore pPVX201, lo stesso usato per la produzione della proteina N. Tuttavia, con questa tecnologia i livelli di espressione erano al limite della rivelazione in immunoblotting e non riproducibili. Si è quindi deciso di esprimere la proteina in maniera transiente utilizzando il sistema mediato da *Agrobacterium*, basato sull'infiltrazione di foglie su piante intere. In questo caso la proteina è stata espressa rappresentando il primo esempio di espressione in pianta della proteina M originaria del SARS-CoV. Inoltre, i risultati ottenuti consentono di affermare che la scelta di metodi di estrazione appropriati per questa proteina dalle proprietà altamente idrofobiche è stata d'aiuto nella produzione di questo antigene 'difficile' e pongono le basi per lo sviluppo di un vaccino di origine vegetale. Infatti, oltre alla difficoltà nella produzione in diversi sistemi eterologhi, un altro elemento che rende difficile l'uso della proteina M in formulazioni vaccinali è rappresentato dalla difficoltà nel purificare su larga scala una proteina transmembranaria. La pianta potrebbe consentire la somministrazione orale del materiale vegetale senza bisogno di purificazione. Infatti, la possibilità di stimolare l'immunità mucosale è molto importante nel caso del SARS-CoV che entra nell'organismo proprio attraverso le superfici mucosali. Una strategia di questo tipo è stata perseguita nel laboratorio del gruppo di Koprowski e colleghi utilizzando il dominio S1 della proteina S del SARS-CoV. Tale epitopo è stato espresso in piante di pomodoro e tabacco. In seguito a somministrazione orale in topi, questa formulazione vaccinale ha mostrato la capacità di indurre una risposta immunitaria sia di tipo sistemico che mucosale (Pogrebnyak *et al.*, 2005).

La differenza di peso molecolare osservata tra la proteina M prodotta in *E. coli* (sequenza mutata) o in pianta (sequenza originaria) potrebbe dipendere dalla differenza nella composizione amminoacidica tra le due forme, oppure implicare che la proteina è stata glicosilata dalla pianta. La presenza di glicani appartenenti al regno vegetale dovrebbe portare alla stimolazione di risposte immunitarie più potenti, in quanto essi sono in grado di legare i recettori presenti sulla superficie delle cellule dendritiche, portando quindi ad una maggiore presentazione dell'antigene alle cellule coinvolte nelle risposte immunitarie (Bosch & Schots, 2010).

In conclusione, vaccini efficienti contro l'infezione da SARS-CoV potrebbero essere

costituiti da formulazioni comprendenti le proteine N ed M prodotte in pianta.

La seconda parte di questo lavoro si è incentrata su un altro antigene virale, l'oncoproteina E7 di HPV-16. Questo virus appartiene alla categoria degli HPV definiti ad alto rischio, in quanto agenti causali di differenti manifestazioni tumorali, principalmente a carico delle mucose genitali. In particolare, HPV-16 è il tipo virale più frequentemente associato ad infezioni cervicali latenti, benigne o pre-neoplastiche ed alla metà dei casi di carcinoma cervicale nel mondo (Da Silva *et al.*, 2001).

Attualmente sono presenti in commercio due vaccini profilattici contro HPV, ma questi hanno soltanto un potere preventivo nell'infezione da parte di HPV e non hanno quindi effetto sulle donne che presentano già infezione o che manifestano lesioni della cervice uterina. Gli unici approcci terapeutici attualmente disponibili sono di tipo chirurgico o chemio-radioterapico. Questi approcci, di tipo invasivo, sono spesso accompagnati da gravi effetti collaterali e non garantiscono la risoluzione definitiva del problema; infatti vi è un'elevata frequenza di recidive. In aggiunta queste terapie, oltre ad essere dispendiose, richiedono l'assistenza di personale sanitario specializzato. Questi problemi sono di difficile risoluzione nei Paesi in via di sviluppo, dove il carcinoma cervicale rappresenta una patologia quasi sempre ad esito fatale e dove, quindi, la realizzazione di protocolli terapeutici efficaci è ancora più urgente.

In genere nei pazienti oncologici, gli antigeni espressi dalle cellule tumorali possono elicitarne risposte immuni specifiche che, tuttavia, quasi mai sono in grado di impedire la progressione della patologia. Per questa ragione esiste un notevole interesse nel tentare di potenziare e rendere efficaci tali risposte immuni per mezzo di strategie di vaccinazione. La possibilità di applicare protocolli di immunizzazione attiva anti-tumorale si basa sulla capacità del paziente di sviluppare, dopo stimolazione con antigeni associati al tumore, una risposta immune capace di superare lo stato di tolleranza da essi instaurato e portare ad una risposta citotossica che determini un'efficiente eliminazione delle cellule tumorali (Pijpers *et al.*, 2005). Nel caso dei tumori associati ad HPV, la popolazione "target" per una vaccinazione terapeutica è rappresentata dai soggetti già infettati o che hanno già sviluppato lesioni pre-cancerose causate dagli HPV ad alto rischio. La possibilità di affrontare il carcinoma della cervice uterina, di cui è nota l'eziologia virale, attraverso l'induzione di una risposta immunitaria specifica nell'ospite, si concretizza nello sviluppo di vaccini terapeutici basati sull'antigene tumorale E7. Attualmente, diversi vaccini terapeutici basati su questo antigene sono in "trial" clinico, mostrando in alcuni casi una grande efficacia nella regressione delle lesioni cancerose.

Anche nel nostro laboratorio, precedentemente al presente lavoro di dottorato, sono stati sviluppati vaccini terapeutici efficaci di tipo genetico o proteico prodotto in sistemi vegetali, basati sull'antigene E7 (Franconi *et al.*, 2002, 2006; Massa *et al.*, 2007, 2008; Venuti *et al.*, 2009).

In questo lavoro di dottorato sono state esplorate vie alternative di produzione del vaccino terapeutico basato sulla proteina E7 di HPV-16.

Una delle strategie scelte è stata quella di esprimere in pianta la proteina E7 mediante la tecnologia dell'agroinfiltrazione. Si è scelto di esprimere la proteina nella via secretoria mediante l'uso della sequenza segnale derivata da pianta PGIPss, già usata nel nostro laboratorio per compartimentalizzare e quindi incrementare i livelli di espressione della proteina E7, rispetto alla versione citoplasmatica, mediante l'impiego del vettore pPVX201 (Franconi *et al.*, 2006). Il vettore utilizzato è lo stesso che ci ha permesso di esprimere la proteina M del SARS-CoV. Purtroppo, in questo caso, tale tecnologia non è stata di successo in quanto non si è riusciti ad incrementare i livelli di espressione della proteina E7 rispetto alle strategie da noi usate in precedenza.

Di conseguenza, in collaborazione con il Prof. Giovanni Giuliano dell'ENEA Casaccia di Roma, si è scelto di impiegare un'altra piattaforma vegetale di produzione: la microalga fotosintetica *Chlamydomonas reinhardtii*. Il "molecular farming" in questo organismo è un campo relativamente nuovo, in rapida espansione e che mostra di essere promettente per l'ottenimento di buone rese di proteina (Specht *et al.*, 2010). Inoltre *C. reinhardtii* è un organismo che può ben adattarsi alle richieste dell'espressione di proteine per scopi vaccinali. Infatti, è in grado di crescere in sistemi altamente contenuti, a basso costo ed essendo stato definito organismo GRAS, è potenzialmente edibile.

Dopo alcuni tentativi di scarso successo di espressione della proteina E7 (nella forma mutagenizzata E7GGG) mediante trasformazione nucleare utilizzando anche ceppi migliorati per l'espressione (Neupert *et al.*, 2009), si è deciso di produrre la proteina E7GGG in cloroplasto. *C. reinhardtii* presenta un unico grande cloroplasto, che occupa approssimativamente il 40% del volume cellulare, contenente circa 80 copie di genoma plastidiale. Tali caratteristiche rendono la trasformazione di questo organello molto più semplice rispetto alla trasformazione dei cloroplasti nelle piante superiori. Inoltre, i tempi per l'ottenimento di linee trasformanti omoplasmiche sono notevolmente ridotti (circa 4-6 settimane). Nonostante tutti i lavori ad oggi pubblicati sul "molecular farming" in *Chlamydomonas* riportino l'uso del metodo biolistico per l'ottenimento dei trasformanti (Specht *et al.*, 2010), un lavoro pubblicato nel 1991 mostrava la possibilità di impiegare il metodo delle "glass beads" anche per l'ottenimento di trasformanti plastidiali in ceppi

privi di parete (Kindle *et al.*, 1991). Questo metodo è molto attraente in quanto risulta più semplice, veloce e meno costoso del metodo biolistico. Nel nostro laboratorio si è scelto quindi di applicare tale protocollo, ottenendo trasformanti plastidiali stabili.

A differenza della trasformazione nucleare, la trasformazione del cloroplasto ha permesso di esprimere la proteina E7GGG in *Chlamydomonas* in forma solubile. Questo rappresenta il primo caso di espressione di un antigene di HPV in una microalga. Questi risultati sono stati ottenuti impiegando un gene con i codoni ottimizzati per l'espressione in cloroplasto e modificando un vettore che ci era stato fornito dal Prof. Jean David Rochaix dell'Università di Ginevra, in modo da porre il gene E7GGG sotto il controllo di un promotore plastidiale forte (il promotore psbD del gene che codifica per la proteina D1 del fotosistema II). La quantificazione della proteina E7GGG estratta da colture nella fase esponenziale di crescita ha portato a stime pari allo 0.01 % TSP. Sebbene questi livelli non siano più elevati di quelli ottenuti per la proteina E7 in pianta (0.03 % TSP), tali risultati sono simili a quelli ottenuti da altri gruppi di ricerca con diverse proteine di interesse farmaceutico (Specht *et al.*, 2010) e potrebbero essere migliorati dall'uso di altri promotori e/o strategie già descritte per *Chlamydomonas* (Manuell *et al.*, 2007) o per le piante (Cardi *et al.*, 2010), rendendo tale sistema estremamente competitivo. Le rese ottenute sembrano comunque sufficienti per condurre futuri esperimenti di vaccinazione in modello pre-clinico secondo le modalità utilizzate in precedenza per gli estratti di *N. benthamiana* contenenti la proteina E7 (Franconi *et al.*, 2002). In tal caso, bisognerebbe avere a disposizione almeno 1 µg di proteina E7GGG per ogni richiamo vaccinale. Dalla media dei dati ottenuti in diverse estrazioni, si è stimato che 1 µg di proteina E7GGG si ottiene da circa 100 ml di coltura di *Chlamydomonas* in fase esponenziale di crescita. Questi volumi sono facili e rapidi da ottenere e la biomassa microalgale raccolta in seguito a centrifugazione può essere direttamente (o in seguito a liofilizzazione) risospesa nel volume di tampone desiderato per le immunizzazioni. Inoltre, la quantificazione effettuata, potrebbe sottostimare il reale livello di espressione, in quanto basata sul confronto del segnale ottenuto con l'anticorpo pAb α -E7 sulla proteina His₆-E7GGG prodotta in *Chlamydomonas* e quello ottenuto sulla proteina His₆-E7GGG prodotta in *E. coli*. Infatti, il pAb α -E7, è stato ottenuto da topi immunizzati proprio con quest'ultima proteina ed è quindi più reattivo verso di essa rispetto alla proteina prodotta in altri sistemi. Una quantificazione più corrispondente al vero può essere condotta con due diversi anticorpi, mediante un TAS ELISA, o con un anticorpo che non abbia un'affinità maggiore per una delle due proteine. Questi esperimenti saranno condotti a breve con anticorpi da poco disponibili in commercio.

Oltre alle somministrazione intravenosa degli estratti, verrà effettuata una somministrazione orale del materiale microalgale liofilizzato ma non ulteriormente processato. Con questo organismo infatti, la somministrazione orale risulta ulteriormente vantaggiosa rispetto alle piante, in quanto essendo un organismo unicellulare, tutte le cellule derivate da un clone trasformato hanno uguali dimensioni e accumulano la stessa quantità di proteina, per cui la dose antigenica è molto più uniforme rispetto ai tessuti vegetali.

L'ultima parte di questo lavoro di dottorato si è focalizzata sulla ricerca di strategie in grado di potenziare le formulazioni vaccinali terapeutiche contro le lesioni associate ad HPV basate sulla proteina E7. In particolare, la nostra attenzione si è rivolta al regno vegetale. Come descritto nell'introduzione, tra le numerose molecole di origine vegetale che possono essere sfruttate dal punto di vista medico, esistono proteine e peptidi con interessanti proprietà anti-tumorali dimostrate *in vitro* o *in vivo* che potrebbero essere utilizzate in strategie di immunoterapia tumorale più mirate. Alcune di esse, come le "Ribosome Inactivating Proteins" (RIP), sono enzimi ad attività N-glicosidasi coinvolte nella difesa della pianta contro i patogeni e gli organismi invasori (Stirpe, 2004). Alcune RIP presentano delle caratteristiche molto interessanti per le terapie anti-tumorali, come la capacità di modulare risposte immunitarie aspecifiche stimolando un ambiente pro-infiammatorio e di indurre apoptosi (Ng *et al.*, 2010; Sikriwal *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009). Inoltre, alcune RIP sono altamente immunogeniche (Castelletti *et al.*, 2004; Frankel *et al.*, 2004) e potrebbero quindi essere in grado di stimolare l'immunità antigene-specifica quando usate in fusione con l'antigene di interesse. In quest'ottica, l'uso completamente nuovo delle RIP proposto in questa tesi di dottorato ha come scopo il potenziamento delle risposte immunitarie generate dal vaccino terapeutico basato sulla proteina E7 fusa alla RIP, permettendo di superare lo stato di immuno-tolleranza generato dal tumore. Inoltre, alcune RIP di tipo 1 possiedono proprietà antivirali contro virus umani (Foa'-Tomasi *et al.*, 1982; Stirpe, 2004) e il loro impiego potrebbe quindi risolvere le infezioni da HPV latenti. Infine, ma non di minore importanza, la provenienza delle RIP dal regno vegetale, garantisce la distanza filogenetica che fa sì che essa venga distinta dagli antigeni "self" che solitamente il sistema immunitario umano ignora o nei confronti dei quali sviluppa tolleranza; tale distanza scongiura, perciò, il pericolo di eventuali reazioni auto-immuni. Viste le premesse e in conseguenza del fatto che tra le RIP, la saporina di *Saponaria officinalis* presenta una tossicità aspecifica molto bassa (Ferreras *et al.*, 1993) ed è meno tossica delle RIP di tipo 2, abbiamo deciso di scegliere per le fusioni con la proteina E7,

questa proteina ed in particolare l'isoforma da foglia nella versione apoplastica, disponibile nell'ambito della collaborazione con la Prof.ssa Laura Spanò dell'Università degli Studi dell'Aquila.

Proprio perché in questa nuova visione delle RIP per la terapia del cancro non si vuole sfruttare la tossicità della saporina esplicita attraverso la sua attività N-glicosidica abbiamo usato una forma mutagenizzata della saporina a livello del sito catalitico, ma che mantiene potenzialmente intatte le proprietà immunostimolatorie. In particolare, il doppio mutante E₁₇₆>K, R₁₇₉>Q, denominato SAPKQ, risulta non tossico sia *in vitro* sia *in vivo* (Pittaluga *et al.* 2005; Zarovni *et al.*, 2007; Marshall *et al.*, 2010). L'inibizione della tossicità nel mutante SAPKQ è stata anche da noi verificata in *E. coli* e in cellule di mammifero. In entrambi i casi le cellule non hanno mostrato problemi di crescita ed hanno consentito la produzione della proteina SAPKQ.

L'impiego della SAPKQ come nuova molecola 'carrier' è stato brevettato nel nostro laboratorio (Franconi *et al.*, 2009, 2010b), principalmente per incrementare l'antigenicità della formulazione vaccinale terapeutica basata sulla proteina E7 di HPV-16, ma potrebbe essere applicata anche ad altre patologie.

Nel presente lavoro di dottorato sono state realizzate fusioni tra il gene SAPKQ e il gene E7GGG, che differiscono per la presenza o assenza della sequenza segnale della saporina e per l'orientamento dei geni nella fusione (ssSAPKQ-E7GGG, SAPKQ-E7GGG ed E7GGG-SAPKQ), con il fine ultimo di formulare vaccini a subunità genetici o proteici prodotti principalmente in pianta, ma anche in *E. coli*.

Le tre diverse forme proteiche di fusione sono state tutte espresse in cellule di *E. coli*, accumulandosi maggiormente nella frazione cellulare insolubile. In questo sistema la sequenza segnale della saporina non viene riconosciuta e l'accumulo maggiore si osserva per la proteina E7GGG-SAPKQ.

In pianta, mediante l'uso del vettore virale pPVX201, le proteine di fusione hanno mostrato di essere prodotte a bassi livelli, nella frazione insolubile cellulare e al contrario di quanto osservato in *E. coli*, la proteina E7GGG-SAPKQ è quella prodotta in minori quantità. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che l'estremità N-terminale della proteina E7GGG è particolarmente instabile e, come già accennato, viene legata dall'ubiquitina per la degradazione della proteina al sistema proteasomale. La proteina di fusione E7GGG-SAPKQ espressa in pianta presenta infatti un'estremità N-terminale libera, non protetta dal "tag" di istidine come nel caso della forma prodotta in cellule di *E. coli*. Nel caso dell'espressione in cellule di mammifero, la produzione della proteina si osserva solo quando è presente l'inibitore del proteasoma. In aggiunta, viste le basse rese

per tutte e tre le forme proteiche espresse e riscontrabili solo nelle frazioni insolubili, altri fattori inerenti al ripiegamento delle proteine di fusione, o al riconoscimento della sequenza vegetale della saporina, potrebbero essere coinvolti. Analizzando le frazioni cellulari solubili si osservano prodotti di peso molecolare inferiore che potrebbero rappresentare dei prodotti di degradazione delle proteine di fusione. A differenza di *E. coli*, in questo sistema la sequenza segnale della saporina sembrerebbe essere riconosciuta, in quanto l'anticorpo policlonale anti-E7 rileva due bande (del peso molecolare inferiore a 30 KDa) solo nei fluidi intercellulari estratti dalle piante infettate con il costrutto secretorio ssSAPKQ-E7GGG. Tali proteine potrebbero rappresentare processamenti differenti o prodotti di degradazione della proteina di fusione. Le basse rese delle proteine di fusione ottenute in pianta e la necessità di chiarire le questioni legate al processamento/degradazione delle proteine di fusione, non hanno per il momento consentito di valutare le risposte immunitarie in modello pre-clinico.

Anche per ottenere più rapidamente una prova di concetto riguardante la validità immunologica delle fusioni realizzate, sono stati elaborati vaccini a DNA come già erano stati realizzati in precedenza nel nostro laboratorio per i geni di fusione costituiti dal gene E7 fuso al gene della CP di PVX (Massa *et al.*, 2008). I vaccini a DNA consentono l'induzione di risposte cellulo-mediate, caratteristica imprescindibile per l'immunoterapia antitumorale. Inoltre questi vaccini potrebbero essere impiegati in strategie di vaccinazione di "prime-boost" eterologo, associate ai vaccini a subunità proteici.

La valutazione dell'efficacia della saporina sul potenziamento delle risposte immunitarie è stata possibile in quanto, nell'ambito della collaborazione con il Dott. Aldo Venuti del Centro di Ricerche Sperimentali dell'Istituto Regina Elena di Roma, si dispone di un animale modello in grado di sviluppare tumore in seguito ad iniezione di cellule tumorali murine esprimente l'oncoproteina E7 (TC-1*).

I primi esperimenti di vaccinazione hanno indicato che la fusione del gene E7GGG con la saporina mutagenizzata è in grado di proteggere più efficacemente dopo sfida con cellule tumorigeniche rispetto al solo gene E7GGG. Infatti l'immunizzazione terapeutica con il "pool" di plasmidi pVAX1-ssSAPKQ-E7GGG, pVAX1-ssSAPKQ-E7GGG e pVAX1-E7GGG-SAPKQ conferisce una maggior protezione rispetto a quella basata sul plasmide pVAX1-E7GGG. Il 40% degli animali vaccinati nei giorni 3-10 dopo sfida tumorale con il "pool" non mostra infatti lo sviluppo del tumore, neanche a distanza di 60 giorni dalla vaccinazione, rispetto allo 0% della protezione fornita dal costrutto con la sola E7GGG.

I successivi esperimenti condotti con i costrutti analizzati singolarmente hanno mostrato che la protezione contro lo sviluppo del tumore si è verificata per tutti e tre i costrutti, ma

L'effetto maggiore è stato ottenuto con i costrutti pVAX1-SAPKQ-E7GGG e pVAX1-E7GGG-SAPKQ (40%) seguiti dal costrutto pVAX1-ssSAPKQ-E7GGG (20%).

Probabilmente il fondamento dell'effetto di protezione riscontrato giace nella dimostrazione che principalmente la vaccinazione basata sulle fusioni è in grado di determinare la selezione di cloni linfocitari E7-specifici di tipo CD8⁺ e quindi di una risposta immune cellulo-mediata molto più consistente rispetto al solo gene E7GGG.

I risultati ottenuti indicano che tramite la fusione del gene E7GGG con la saporina mutagenizzata è possibile ottenere *in vivo* un antigene maggiormente “visibile” al sistema immunitario rispetto all'antigene E7GGG, in grado di indurre una maggiore produzione di IgG totali anti-E7 e, soprattutto, una maggiore stimolazione di cloni linfocitari T E7-specifici, superando il problema della scarsa immunogenicità dell'antigene di per sé.

In conclusione, il lavoro condotto in questi tre anni conferma l'importanza delle biotecnologie vegetali per la produzione di antigeni che risultano dotati di elevata autenticità strutturale e che, di conseguenza, possono essere impiegati per lo sviluppo di test diagnostici e di vaccini a subunità sicuri per l'uomo e a basso costo. Nel caso della nucleoproteina N del SARS-CoV le piante hanno offerto la possibilità di produrre una proteina che mantiene le proprietà antigeniche della proteina originale e che quindi può essere realmente impiegata per la realizzazione di test diagnostici sierologici della SARS. L'uso della tecnologia dell'agroinfiltrazione ha consentito di esprimere la glicoproteina M del SARS-CoV con la sequenza originaria, un antigene ancora poco caratterizzato dal punto di vista immunologico in quanto difficile da produrre in sistemi eterologhi. Inoltre, l'applicazione delle biotecnologie vegetali a sistemi di espressione innovativi ha consentito di ottenere per la prima volta l'espressione dell'antigene d'elezione (E7) per la realizzazione di vaccini terapeutici contro le lesioni associate ad HPV in microalga. I nostri risultati dimostrano come le piante rappresentino anche una sorgente di molecole a valore immunologico, il cui impiego nella formulazione di vaccini anti-cancro potrebbe consentire di sviluppare terapie altamente efficaci nella cura dei tumori indotti dal virus del papilloma umano e potenzialmente di altri tumori.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alphs** HH, Gambhira R, Karanam B, Roberts JN, Jagu S, Schiller JT, Zeng W, Jackson DC, Roden RB (2008). Protection against heterologous human papillomavirus challenge by a synthetic lipopeptide vaccine containing a broadly crossneutralizing epitope of L2. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5850–5855.
- Angeline** M, Merle E, Moroianu J (2003). The E7 oncoprotein of high-risk human papillomavirus type 16 enters the nucleus via a nonclassical Ran-dependent pathway. *Virology* 317 (1): 13–23.
- Armstrong** DJ & Roman A (1993). The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type-16 E7-protein is due to the high content of acidic amino acid residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192 (3): 1380–1387.
- Avesani** L, Marconi G, Morandini F, Albertini E, Bruschetta M, Bortesi L, Pezzotti M, Porceddu A (2007). Stability of potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. *Transgenic Res.* 16: 587–597.
- Azhakanandam** K, Weissinger SM, Nicholson JS, Qu R, Weissinger AK (2007). Amplicon-plus targeting technology (APTT) for rapid production of a highly unstable vaccine protein in tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 63: 393–404.
- Baratova** LA, Grebenshchikov NI, Shishkov AV, Kashirin IA, Radavsky JL, Jarvekulg L, Saarma M (1992). The topography of the surface of potato virus X: Tritium planigraphy and immunological analysis. *J. Gen. Virol.* 73 (2): 229–235.
- Barbieri** L, Battelli MG, Stirpe F (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1154: 237–282.
- Barbieri** L, Valbonesi P, Bonora E, Gorini P, Bolognesi A, Stirpe F (1997). Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Res.* 25: 518–522.
- Barbosa** MS, Lowy DR, Schiller JT (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J. Virol.* 63 (3): 1404–1407.
- Barbosa** MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR, Vousden KH. (1990). The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* 9 (1): 153–160.
- Barta** A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke M, Matzke A (1986). The expression of a nopalina synthase-human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol. Biol.* 6: 347–357.
- Barzegari** A, Hejazi MA, Hosseinzadeh N, Eslami S, Aghdam EM, Hejazi MS (2009). Dunaliella as an attractive candidate for molecular farming. *Mol. Biol. Rep.* [Epub ahead of print].
- Battelli** MG (2004) Cytotoxicity and toxicity to animals and humans of ribosome-inactivating proteins. *Mini Rev. Med. Chem.* 4: 513–521.
- Baulcombe** DC, Chapman S, Santa Cruz S (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* 7: 1045–1053.
- Bergamaschi** G, Perfetti V, Tonon L, Novella A, Lucetti C, Da nova M, Glennie MJ, Merlini G, Cazzola M (1996). Saporin, a ribosome-inactivating protein used to prepare immunotoxins, induces cell death via apoptosis. *British Journal of Haematology* 93: 789–794.
- Best** SR, Peng S, Juang CM, Hung CF, Hannaman D, Saunders JR, Wu TC, Pai SI (2009). Administration of HPV DNA vaccine via electroporation elicits the strongest CD8⁺ T cell immune responses compared to intramuscular injection and intradermal gene gun delivery. *Vaccine* 27: 5450–5459.
- 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 (17): 9211–9220.

- Bird G**, O'Donnell M, Moroianu J, Garcea RL (2008). A possible role for cellular karyopherins in regulating polyomavirus and papillomavirus capsid assembly. *J Virol* 82: 9848-9857.
- Block SL**, Nolan T, Sattler C, Barr E, Giacoletti KE, Marchant CD, Castellsagué X, Rusche SA, Lukac S, Bryan JT, Cavanaugh PF Jr, Reisinger KS (2006). Comparison of the immunogenicity and reactogenicity of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in male and female adolescents and young adult women. *Pediatrics* 118: 2135–2145.
- Bock R** (2001). Transgenic Plastids in Basic Research and Plant Biotechnology. *Mol. Biol.* 312: 425-438.
- Boothe J**, Nykiforuk C, Shen Y, Zaplachinsky S, Szarka S, Kuhlman P, Murray E, Morck D, Moloney MM (2010). Seed-based expression systems for plant molecular farming. *Plant Biotechnology Journal* 8: 588-606.
- Bordeaux J**, Forte S, Harding E, Darshan MS, Klucevsek K, Moroianu J (2006). The l2 minor capsid protein of low-risk human papillomavirus type 11 interacts with host nuclear import receptors and viral DNA. *J Virol* 80: 8259-8262.
- Borysiewicz LK**, Fiander A, Nimako M, *et al.* (1996). A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 347:1523–1527.
- Bosch FX**, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, and Shah KV (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 796-802.
- Bosch FX**, de Sanjose S, Chapter L (2003). Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 31: 3–13.
- Bosch D & Schots A** (2010). Plant glycans: friend or foe in vaccine development? *Expert Rev. Vaccines* 9 (8): 835–842.
- Bousarghin L**, Touze A, Sizaret PY, Coursaget P (2003). Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol* 77: 3846-3850.
- Boynton JE**, Gillham NW, Harris EH, *et al.* (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538.
- Boyer SN**, Wazer DE, Band V (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin–proteasome pathway. *Cancer Res.* 56 (20): 4620–4624.
- Brown DR**, Kitchin D, Qadadri B, Neptune N, Batteiger T, Ermel A (2006). The human papillomavirus type 11 E1^E4 protein is a transglutaminase 3 substrate and induces abnormalities of the cornified cell envelope. *Virology* 345:290-298.
- Bryan JT & Brown DR** (2000). Association of the human papillomavirus type 11 E1^E4 protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. *Virology* 277: 262-269.
- Buchholz UJ**, Bukreyev A, Yang L, Lamirande EW, Murphy BR, Subbarao K, Collins PL (2004). Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9804–9809.
- Buck CB**, Thompson CD, Pang YY, Lowy DR, Schiller JT (2005). Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol* 79: 2839-2846.
- Buck CB**, Cheng N, Thompson CD, Lowy DR, Steven AC, Schiller JT, Trus BL (2008). Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol* 82: 5190-5197.
- Burd EM** (2003). Human Papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 1-17.
- Buriani G**, Mancini C, Benvenuto E, Baschieri S (2010). Plant heat shock protein 70 as carrier for immunization against a plant-expressed reported antigen. *Transgenic Res* [Epub ahead of print].

- Bussmann** BM, Reiche S, Jacob LH, Braun JM, Jassoy C (2006). Antigenic and cellular localisation analysis of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein using monoclonal antibodies. *Virus Res* 122: 119–126.
- Bhutia** SK, Mallick S K, Maiti TK (2009). In vitro immunostimulatory properties of Abrus lectins derived peptides in tumor-bearing mice. *Phytomedicine* 16:776–782
- Carattoli** A, Di Bonito P, Grasso F, Giorgi C, Blasi F, Niedrig M, Cassone A (2005). Recombinant protein-based ELISA and immuno-cytochemical assay for the diagnosis of SARS. *J Med Virol* 76 (2):137–142.
- Cardi** T, Lenzi P, Maliga P (2010). Chloroplasts as expression platforms for plant-produced vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 9 (8): 893–911.
- Castelletti** D, Fracasso G, Righetti S, Tridente G, Schnell R, Engert A, *et al.* (2004). A dominant linear B-cell epitope of ricin A-chain is the target of a neutralizing antibody response in Hodgkin's lymphoma patients treated with an anti-CD25 immunotoxin. *Clin Exp Immunol* 136: 365–72.
- Cerovská** N, Hoffmeisterová H, Pecenkova T Moravec T, Synková H, Plchová H, Velemínský J. (2008). Transient expression of HPV16 E7 peptide (aa 44–60) and HPV16 L2 peptide (aa 108–120) on chimeric potyvirus-like particles using potato virus X-based vector. *Protein Exp Purif* 58 (1): 154–161.
- Chaddock** JA, Lord JM, Hartley MR, Roberts LM (1994). Pokeweed antiviral protein (PAP) mutations which permit *E. coli* growth do not eliminate catalytic activity towards prokaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res* 22: 1536–1540.
- Chang** CK, Sue SC, Yu TH, Hsieh CM, Tsai CK, Chiang YC, Lee SJ, Hsiao HH, Wu WJ, Chang WL, Lin CH, Huang TH (2006). Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *J Biomed Sci* 13: 59–72.
- Chapman** S, Kavanagh T, Baulcombe D (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J* 2: 549.
- Chargelegue** D, Drake PM, Obregon P Prada A, Fairweather N, Ma JK. (2005). Highly immunogenic and protective recombinant vaccine candidate expressed in transgenic plants. *Infect Immun* 73 (9): 5915–5922.
- Che** XY, Hao W, Wang YD, Di B, Yin K, Xu YC, Feng CS, Wan ZY, Cheng VCC, Yuen KY (2004). Nucleocapsid protein as early diagnostic marker for SARS. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 1947–1949.
- Chebolu** S & Daniell H (2009). Chloroplast-Derived Vaccine Antigens and Biopharmaceuticals: Expression, Folding, Assembly and Functionality. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 332: 33–54.
- Chen** XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* 5: 557–567.
- Chen** CY, Chang CK, Chang YW, Sue SC, Bai HI, Riag L, Hsiao CD, Huang TH. (2007). Structure of the SARS coronavirus nucleocapsid protein RNA-binding dimerization domain suggests a mechanism for helical packaging of viral RNA. *J. Mol. Biol.* 368: 1075–1086.
- Chikwamba** R, Cunnick J, Hathaway D McMurray J, Mason H, Wang K (2002). A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Res* 11 (5): 479–493.
- Choi** NW, Estes MK, Langridge WH (2006a). Mucosal immunization with a ricin toxin B subunit-rotavirus NSP4 fusion protein stimulates a Th1 lymphocyte response. *J. Biotechnol.* 121(2): 272–283.
- Choi** NW, Estes MK, Langridge WH (2006b). Synthesis of a ricin toxin B subunit-rotavirus VP7 fusion protein in potato. *Mol. Biotechnol.* 32 (2): 117–128.
- Chow** LT & Broker TR (1997). Small DNA tumor viruses. In: *Viral Pathogenesis* Eds: Nathanson N, Ahmed R, Gonzalez-Scarano F, Griffin DE, Holmes KV, Murphy FA and Robinson L, Rippincott-Raven, Philadelphia: 267–301.

- Chromy** LR, Pipas JM, Garcea RL (2003). Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10477-10482.
- Chu** NR, Wu HB, Wu T, Boux LJ, Siegel MI, Mizzen LA (2000). Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. *Clin Exp Immunol* 121 (2): 216–225.
- Ciccolini** F, Di Pasquale G, Carlotti F, Crawford L, Tommasino M (1994). Functional studies of E7 proteins from different HPV types. *Oncogene* 9 (9): 2633–2638.
- Cid-Arregui** A (2009). Therapeutic Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *The Open Virology Journal* 3: 67-83.
- Cole** ST & Danos O (1987). Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J. Mol. Biol.* 193 (4): 599–608.
- Collins** AS, Nakahara T, Do A, Lambert PF (2005). Interactions with pocket proteins contribute to the role of human papillomavirus type 16 E7 in the papillomavirus life cycle. *J. Virol.* 79 (23): 14769–14780.
- Conway** MJ & Meyers C (2009). Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. *J Dent Res* 88 (4): 307-317.
- Cui** Z & Huang L (2005). Liposome-polycation-DNA (LPD) particle as a carrier and adjuvant for protein based vaccines: therapeutic effect against cervical cancer. *Cancer Immunol Immunother* 54 (12): 1180–1190.
- Culp** TD & Christensen ND (2004). Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* 319: 152-161.
- Da Silva** DM, Eiben GL, Fausch SC, Wakabayashi MT, Rudolf MP, Velders MP, Kast WM (2001). Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J. Cell. Physiol.* 186: 169-182.
- Daniell** H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* 6: 219-226.
- Daniell** H (2002). Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat. Biotechnol.* 1: 71-79.
- Daniell** H, Chebolu S, Kumar S, Singleton M, Falconer R (2005). Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine* 23: 1779-1783.
- D'Aoust** MA, Couture MM, Charland N *et al.* (2010). The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol. J.* 8: 607–619.
- Das** D & Suresh MR (2006). Copious production of SARS-CoV nucleocapsid protein employing codon optimized synthetic gene. *J. Virol. Methods* 137: 343–346.
- Day** PM, Lowy DR, Schiller JT (2003). Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 307: 1-11.
- Day** A & Madesis P (2007). DNA replication, recombination, and repair in plastids. *Top. Curr. Genet.* 19: 65–119
- De Cosa** B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H (2001). Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnol.* 19: 4385-4395.
- De Jaeger** G, Scheffer S, Jacobs A, Zambre M, Zobell O, Goossens A, *et al.* (2002). Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat Biotechnol* 20: 1265–1268.
- de Jong** A, O'Neill T, Khan AY, Kwappenberg KM, Chisholm SE, Whittle NR, *et al.* (2002). Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine. *Vaccine* 20 (29–30): 3456–3464.

- De Villiers** EM, Fauquet C, Broker TR, *et al.* (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17–27.
- De Wilde** C, De Neve M, De Rycker R, Bruyns AM, De Jaeger G, Van Montagu M, Depicker A, Engler G (1996). *Plant Sci.* 114: 233-241.
- Di** B, Hao W, Gao Y, Wang M, Wang Y, Qiu L, Zhou DH, Wu XW, Lu EJ, Liao ZY, Mei YB, Zheng BJ, Che XJ (2005). Monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high sensitivity of the nucleocapsid protein in acute-phase sera of severe acute respiratory syndrome patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1: 135-140.
- Di Bonito** P, Grasso F, Mangino G, Massa S, Illiano E, Franconi R, Fanales-Belasio E, Falchi M, Affabris E, Giorgi C (2009). Immunomodulatory activity of a plant extract containing human papillomavirus 16-E7 protein in human monocyte-derived dendritic cells. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 22 (4): 967-978.
- Doorbar** J (2005). The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32 (1): 7-15.
- Drosten** C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, *et al.* (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348 (20): 1967-1976.
- Du** L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S (2009). The spike protein of SARS-CoV- a target for vaccine and therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology* 7: 226-236.
- Dubensky** TW & Reed SG (2010). Adjuvants for cancer vaccines. *Seminars in Immunology* 22: 155–161.
- Dyson** N, Guida P, Munger K, Harlow E (1992). Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J. Virol.* 66 (12): 6893–6902.
- Editorial** (2010). Success stories in molecular farming—a brief overview. *Plant Biotechnology Journal* 8: 525–528.
- Einstein** MH, Kadish AS, Burk RD, Kim MY, Wadler S, Streicher H, *et al.* (2007). Heat shock fusion protein-based immunotherapy for treatment of cervical intraepithelial neoplasia III. *Gynecol Oncol* 106 (3): 453–460.
- Enjuanes** L, Dediego ML, Alvarez E, Deming D, Sheahan T, Baric R (2008). Vaccines to prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced disease. *Virus Res* 133: 45-62.
- Fang** X, Ye L, Timani KA, Li S, Zen Y, Zhao M, Zheng H, Wu Z (2005). Peptide domain involved in the interaction between membrane protein and nucleocapsid protein of SARS-associated coronavirus. *J Biochem Mol Biol* 38: 381–385.
- Fang** X, Ye LB, Zhang Y, Li B, Li S, Kong L, Wang Y, Zheng H, Wang W, Wu Z (2006). Nucleocapsid amino acids 211 to 254, in particular, tetrad glutamines, are essential for the interaction between the nucleocapsid and membrane proteins of SARS-associated coronavirus. *J. Microbiol.* 44, 577–580.
- Fang** X, Gao J, Zheng H, LiB, Kong L, Zhang Y, Wang W, Zeng Y, Ye L (2007). The Membrane Protein of SARS-CoV Suppresses NF-κB Activation. *Journal of Medical Virology* 79: 1431–1439.
- Farran** I, McCarthy-Suarez I, Rio-Manterola F *et al.* (2010). The vaccine adjuvant extra domain A from fibronectin retains its proinflammatory properties when expressed in tobacco chloroplasts. *Planta* 231(4): 977–990
- Fay** A, Yutzy WH 4th, Roden RB, Moroianu J (2004). The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. *J Virol* 78: 13447-13454.
- Fehrmann** F, Klumpp DJ, Laimins LA (2003). Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol* 77: 2819-2831.

- Feltkamp** MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, De Jongh BM, Drijfhout JW, Ter Schegget J, Melief CJ, Kast WM (1993). Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J. Immunol.* 23: 2242.
- Fernández-San Millán** A, Susana M, Hervás-Stubbs S *et al.* (2008). Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol. J.* 6 (5): 427–441.
- Ferrante** P, Catalanotti C, Bonente G, Giuliano G (2008). An optimized, chemically regulated gene expression system for *Chlamydomonas*. *PLoS One* 3 (9): e3200.
- Ferrara** A, Nonn M, Sehr P, *et al.* (2003). Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer II: results of a clinical pilot study in 15 individual patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 129: 521–530.
- Ferrerias** JM, Barbieri L, Girbes T, Battelli MG, Rojo MA, Arias FJ, Rocher MA, Soriano F, Mendez E, Stirpe F (1993). Distribution and properties of major ribosome inactivating proteins (28S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae) *Biochim. Biophys. Acta* 1216: 31-42.
- Firzlaff** JM, Galloway DA, Eisenman RN, Lüscher B (1989). The E7 protein of human papillomavirus type 16 is phosphorylated by casein kinase II. *New Biol.* 1 (1): 44–53.
- Fischer** R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM (2004). Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* 7: 152–158.
- Fiume** E, Christou P, Giani S, Breviario D (2004). Introns are key regulatory elements of rice tubulin expression. *Planta* 218: 693–703.
- Flego** M, Di Bonito P, Ascione, *et al.* (2005). Generation of human antibody fragments recognizing distinct epitopes of the nucleocapsid (N) SARS-CoV protein using a phage display approach. *BMC Infect. Dis.* 5: 73.
- Foa`-Tomasi** L, Campadelli-Fiume G, Barbieri L, Stirpe F (1982). Effect of ribosome-inactivating proteins on virus-infected cells. Inhibition of virus multiplication and of protein synthesis. *Arch Virol* 71: 323–332.
- Fouchier** RA, Kuiken T, Schutten M, van Amerongen G, van Doornum GJ, van den Hoogen BG, Peiris M, Lim W, Stohr K, Osterhaus AD (2003). Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 423: 240.
- Fraley** RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffman NL, Woo SC (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4803-4807.
- Franconi** R, Roggero P, Piazzini P, Arias FJ, Desiderio A, Bitti O, Pashkoulov D, Mattei B, Bracci L, Masenga V, Milne RG, Benvenuto E (1999). Functional expression in bacteria and plants of an scFv antibody fragment against tospoviruses. *Immunotechnology* 4: 189-201.
- Franconi** R, Giorgi C, Venuti A, Marcante ML, Di Bonito P, Dibello F, Bitti O (2001). ‘Vaccini a subunità e procedimenti per la loro produzione’. Italian Patent RM2001A001332, PCT/IT02/00354, WOO2102410, European patent EP1401493.
- Franconi** R, Di Bonito P, Dibello F, Accardi L, Muller A, Cirilli A, Simeone P, Donà MG, Venuti A, Giorgi C (2002). Plant-derived human papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection. *Cancer Res.* 62: 3654-3658.
- Franconi** R, Massa S, Illiano E, Muller A, Cirilli A, Accardi L, Di Bonito P, Giorgi C, Venuti A (2006). Exploiting the plant secretory pathway to improve the anti-cancer activity of a plant-derived HPV16 E7 vaccine. *Int. J. Immunopath. Pharmacol.* 19 (1): 187-197.
- Franconi** R, Venuti A, Spanò L, Massa S (2009). ‘Vaccines based on genetic chimera of viral and/or tumoral antigens and plant proteins’. Italian Patent RM2009A000383.
- Franconi** R, Demurtas OC, Massa S (2010a). Plant-derived vaccines and other therapeutics produced in contained systems. *Expert Rev Vaccines* 9 (8): 877-892.

- Franconi** R, Venuti A, Spanò L, Massa S (2010b). 'Vaccines based on genetic chimera of viral and/or tumoral antigens and plant proteins'. International application No. PCT/IT2010/000324.
- Frankel** AE (2004). Reducing the Immune Response to Immunotoxin, *Clinical Cancer Research* 10: 13-15.
- Franklin** SE & Mayfield SP (2004). Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 159–165.
- Frazer** IH, Quinn M, Nicklin JL, Tan J, Perrin LC, Ng P, *et al.* (2004). Phase 1 study of HPV16-specific immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia. *Vaccine* 23 (2): 172–181.
- Frolov** MV & Dyson, NJ (2004). Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J. Cell. Sci.* 117 (11): 2173–2181.
- Gage** JR, Meyers C, Wettstein FO (1990). The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J. Virol.* 64 (2): 723–730.
- Gao** W, Tamin A, Soloff A, D'Aiuto L, Nwanegbo E, Robbins PD, Bellini WJ, Barrat-Boyes S, Gambotto A (2003). Effects of a SARS associated coronavirus vaccine in monkeys. *Lancet* 362: 1895-1896.
- Garcia** F, Petry KU, Muderspach L, Gold MA, Braly P, Crum CP, Magill M, Silverman M, Urban RG, Hedley ML, Beach KJ (2004). ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 103: 317–326.
- Gardiol** D, Kuhne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R, Banks L (1999). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 18: 5487- 5496.
- Garland** SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, *et al.* (2007). Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med* 356:1928–1943.
- Giles** S (2003). Transmission of HPV. *Can. Med. Assoc. J.* 168 (11): 1391.
- Gils** M, Kandzia R, Marillonnet S, Klimyuk V, Gleba Y (2005). High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnol J* 3: 613-620.
- Giménez** LG, Rojas J, Rojas A, Mendoza J, Camacho AG (2009). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-Based Test with a Cocktail of Nucleocapsid and Spike Proteins for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus-Specific Antibody. *Clinical And Vaccine Immunology* 16 (2): 241–245.
- Giorgi** C, Franconi F, Ribicki EP (2010). Human papillomaviruses vaccines in plant. *Expert Rev.vaccines* 9 (8): 913-924.
- Giroglou** T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75:1565-1570.
- Ghittoni** R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M (2010). The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human Papillomaviruses. *Virus Genes* 40:1–13.
- Gleba** Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2005). Magniffection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23: 2042-2048.
- Gleba** Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 134–141.
- Gomord** V & Faye L (2004). Posttranslation modification of therapeutic proteins in plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 7: 171-181.
- Graham**, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.J. *Gen Virol Jul* 36 (1): 59-74.

- Granell** A, Fernández-del-Carmen A, Orzáez D (2010). *In planta* production of plant-derived and non-plant-derived adjuvants *Expert Rev. Vaccines* 9 (8): 843–858.
- Griesbeck** C, Kobl I, Heitzer M (2006). *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biotechnology* 34: 213–223
- Guan** Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, Luo SW, Li PH, Zhang LJ, Guan YJ, Butt KM, Wong KL, Chan KW, Lim W, Shortridge KF, Yuen KY, Peiris JS, Poon LL (2003). Isolation and characterization of virus related to SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302: 276–278.
- Gupta** V, Tabiin TM, Sun K, Chandrasekaran A, Anwar A, Yang, K, Chikhlikar P, Salmon J, Brusica V, Marques ET, Kellathur SN, August TJ (2006). SARS coronavirus nucleocapsid immunodominant T-cell epitope cluster is common to both exogenous recombinant and endogenous DNA encoded immunogens. *Virology* 347: 127–139.
- Hajto** T, Hostanska K, Weber K, Zinke H, Fischer J, Mengs U *et al.* (1998). Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes in vitro and in vivo. *Nat Immun* 16:34–46.
- Hajto** T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C, Gabius HJ (1990). Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res* 50: 3322–6.
- Hallez** S, Simon P, Maudoux F, Doyen J, Noel JC, Beliard A, *et al.* (2004). Phase I/II trial of immunogenicity of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein-based vaccine in women with oncogenic HPV-positive cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Immunol Immunother* 53 (7): 642–650.
- Han** DP, Kim HG, Kim YB, Poon LL, Cho MW (2004). Development of a safe neutralization assay for SARS-CoV and characterization of S-glycoprotein. *Virology* 326 (1): 140–149.
- Han** X, Bartlam M, Jin Y, Liu X, He X, Cai X, Xie Q, Rao Z (2004b). The expression of SARS-CoV M gene in *P. pastoris* and the diagnostic utility of the expression product. *J. Virol. Meth.* 122: 105–111.
- Harper** DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuid A, Costa Clemens SA, Dubin G (2006). Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* 367:1247–1255.
- Harris** EH (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 363–406.
- Hartley** MR & Lord JM (1993). Structure, function and applications of ricin and related cytotoxic proteins. In *Biosynthesis and Manipulation of Plant Products*, ed. D Griessson 210–239.
- Hartley** MR, Chaddock JA, Bonness MS (1996). The structure and function of ribosome-inactivating proteins. *Trends Plant Sci.* 1: 254–260
- Hartley** MR & Lord JM (2004). Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochim Biophys Acta* 1701: 1–14.
- He** R, Leeson A, Andonov A, *et al.* (2003a). Activation of AP-1 signal transduction pathway by SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311: 870–876.
- He** R, Leeson A, Ballantine M, Andonov A, Baker L, Dobie F, Li Y, Bastien N, Feldmann H, Strocher U, Theriault S, Cutts T, Cao J, Booth TF, Plummer FA, Tyler S, Li X (2004). Characterization of protein-protein interaction between the nucleocapsid protein and membrane protein of the SARS coronavirus. *Virus Research* 105: 121–125.
- He** Y, Lu H, Siddiqui P, Zhou Y, Jiang S (2005a). Receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein contains multiple conformation-dependent epitopes that induce highly potent neutralizing antibodies. *J. Immunol.* 174 (8): 4908–4915.
- He** Y, Zhou Y, Siddiqui P, Niu J, Jiang S (2005b). Identification of Immunodominant Epitopes on the Membrane Protein of the Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (8): 3718–3726.

- He Q, Du Q, Lau S, et al. (2005c).** Characterization of monoclonal antibody against SARS coronavirus nucleocapsid antigen and development of an antigen capture ELISA. *J. Virol. Methods* 127: 46–53.
- Heck DV, Yee CL, Howley PM, Munger K (1992).** Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (10): 4442–4446.
- Helt AM & Galloway DA (2001).** Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. *J. Virol.* 75 (15): 6737–6747.
- Helt AM, Funk JO, Galloway DA (2002).** Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. *J. Virol.* 76 (20): 10559–10568.
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989).** Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342: 76–78.
- Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S, Rodriguez AC, Solomon D, Bratti MC, Schiller JT, Gonzalez P, Dubin G, Porras C, Jimenez SE, Lowy DR (2007).** Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *JAMA* 298: 743–753.
- Hiller T, Poppelreuther S, Stubenrauch F, Iftner T (2006).** Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15: 1262–1267.
- Hindmarsh PL & Laimins LA (2007).** Mechanisms regulating expression of the HPV 31 L1 and L2 capsid proteins and pseudovirion entry. *Virol J* 4:19.
- Hu Y, Wen J, Tang L, Zhang H, Zhang X, Li Y, Wang J, Han Y, Li G, Shi J, Tian X, Jiang F, Zhao X, Wang J, Liu S, Zeng C, Wang J, Yang H (2003).** The M protein of SARS-CoV: basic structural and immunological properties. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 1 (2): 118–130.
- Huang Z & Mason HS (2004).** Conformational analysis of hepatitis B surface antigen fusions in an Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Biotechnol J* 2: 241–249.
- Huang Q, Yu L, Petros AM, Gunasekera A, Liu Z, Xu N, Hajduk P, Mack J, Fesik SW, Olejniczak ET. (2004).** Structure of the N-terminal RNA binding domain of the SARS CoV nucleocapsid protein. *Biochemistry* 43: 6059–6063.
- Huang C, Ito N, Tseng CT, Makino S (2006a).** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a accessory protein is a viral structural protein. *J. Virol.* 80: 7287–7294.
- Huang C, Narayanan K, Ito N, Peters CJ, Makino S (2006b).** Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3a Protein Is Released in Membranous Structures from 3a Protein-Expressing Cells and Infected Cells. *J. Virol.* 80: 210–217.
- Huh K, Zhou X, Hayakawa H, Cho JY, Libermann TA, Jin J, Harper JW, Munger K (2007).** Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J. Virol.* 81 (18): 9737–9747.
- Iwasaki A & Kelsall BL (2001).** Unique function of CD11b, CD8b, and double-negative Peyer’s patch dendritic cells. *J. Immunol.* 166: 4884–4890.
- Jagu S, Karanam B, Gambhira R et al. (2009).** Concatenated multitype L2 fusion proteins as candidate prophylactic pan-human papillomavirus vaccines. *J. Natl Cancer Inst.* 101(11): 782–792.
- James MA, Lee JH, Klingelutz AJ (2006).** Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *J. Virol.* 80: 5301–5307.
- Jarvis P (2008).** Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol.* 179(2): 257–285.

- 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: 930-938.
- Kagiwada** S, Yamaji Y, Komatsu K, Takahashi S, Mori T, Hirata H, Suzuki M, Ugaki M, Namba S (2005). A single amino acid residue of RNA-dependent RNA polymerase in the Potato virus X genome determines the symptoms in *Nicotiana* plants. *Virus Res.* 110 (1-2): 177-182.
- Kalantari** M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B (2001). Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn. Mol. Pathol.* 10: 46-54.
- Kamps** S & Hoffman C (2003). SARS Reference. <http://www.SARSReference.com>
- Kanodia** S, Da Silva DM, Kast WM (2008). Recent advances in strategies for immunotherapy of human papillomavirus-induced lesions. *Int J Cancer* 122: 247-259.
- Kapila** J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G (1996). An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* 122: 101-108.
- 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: 1796-1799.
- Karg** SP & Kallio T (2009). The production of biopharmaceuticals in plant systems. *Biotechnology Advances* 27: 879-894.
- Kaufmann** AM, Stern PL, Rankin EM, Sommer H, Nuessler V, Schneider A, Adams M *et al.* (2002). Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer. *Clin Cancer Res* 8: 3676-3685.
- Kaur** P & Li A (2000). Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J Invest Dermatol* 114: 413-420.
- Kenter** GG, Welters MJ, Valentijn AR, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, Vloon AP, *et al.* (2008). Phase I immunotherapeutic trial with long peptides spanning the E6 and E7 sequences of high-risk human papillomavirus 16 in end-stage cervical cancer patients shows low toxicity and robust immunogenicity. *Clin Cancer Res* 14 (1):169-177.
- Kim** TW, Lee JH, Hung CF, Peng S, Roden R, Wang MC, Viscidi R, Tsai YC, He L, Chen PJ, Boyd DA, Wu TC (2004). Generation and characterization of DNA vaccines targeting the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J.Virol.* 78, 4638-4645.
- Kim** MJ, Baek K, Park CM (2009). Optimization of conditions for transient *Agrobacterium*-mediated gene expression assays in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 28: 1159-1167.
- Kindle** KL (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS* 87: 1228-1232.
- Kindle** KL, Kristy T, Richards L, Stern DB (1991). Engineering the chloroplast genome: Techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 88: 1721-1725.
- Kirk** DD, Rempel R, Pinkhasov J, Walmsley AM (2004). Application of *Quillaja saponaria* extracts as oral adjuvants for plant-made vaccines. *Expert Opin. Biological Ther.* 4 (6): 947-958.
- Klingelhutz** AJ, Foster SA, McDougall JK (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380: 79-82.
- Klinman** DM, Currie D, Gurstel I, Verthelyi D (2004). Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol. Rev.* 199: 201-216.
- Knapp** AA, McManus PM, Bockstall K, Moroianu J (2009). Identification of the nuclear localization and export signals of high risk HPV16 E7 oncoprotein. *Virology* 383 (1): 60-68.

- Knight** GL, Turnell AS, Roberts S (2006). Role for Wee1 in inhibition of G2-to-M transition through the cooperation of distinct human papillomavirus type 1 E4 proteins. *J Virol* 80: 7416-7426.
- Kohl** T, Hitzeroth II, Stewart D Varsani A, Govan VA, Christensen ND, Williamson AL, Rybicki EP (2006). Plant-produced cottontail rabbit papillomavirus L1 protein protects against tumor challenge: a proof-of-concept study. *Clin. Vaccine Immunol.* 13 (8): 845–853.
- Komarova** TV, Skulachev MV, Zvereva AS, Schwartz AM, Dorokhov YL, Atabekov JG (2006). New viral vector for efficient production of target proteins in plants. *Biochemistry (Mosc)* 71: 846-850.
- Komarova** TV, Baschieri S, Donini M, Marusic C, Benvenuto E, Dorokhov YL (2010). Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert Rev. Vaccines* 9 (8): 859–876.
- Komori** T, Imayama T, Kato N Ishida Y, Ueki J, Komari T (2007). Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant Physiol.* 145: 1155–1160.
- Koncz** C, Kreuzaler F, Kalman Z, Schell J (1984). A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and alpha-actin in plant tumors. *EMBO J.* 3: 1029-1037.
- Kondo** K, Ishii Y, Ochi H, Matsumoto T, Yoshikawa H, Kanda T (2007). Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV16 minor capsid protein L2 surface region. *Virology* 358: 266-272.
- Kong** WP, Xu L, Stadler K, Ulmer JB, Abrignani S, Rappuoli R, Nabel GJ (2005). Modulation of the immune response to the severe acute respiratory syndrome spike glycoprotein by gene-based and inactivated virus immunization. *J. Virol.* 79: 13915–13923.
- Kreimer** AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14: 467-475.
- Krieg** AM, Yi AK, Matson S, Waldshmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-549.
- Krokhin** O, Li Y, Andonov A, Feldmann H, Flick R, Jones S, Stroehrer U, Bastien N, Dasuri KV, Cheng K, Simonsen JN, Perreault H, Wilkins J, Ens W, Plummer F, Standing KG (2003). Mass spectrometric characterization of proteins from the sars virus: a preliminary report. *Mol. Cell Proteomics* 2: 346–356.
- Ksiazek** TG, Erdman D, Goldsmith C, Zaki S, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani, C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell S, Ling AE, Humphrey C, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes J, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348: 1953–1966.
- Kumar** SV, Misquitta RW, Reddy VS, Rao BJ, Rajam MV (2004). Genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 166: 731–738
- Lacey** CJ, Thompson HS, Monteiro EF, O'Neill T, Davies ML, Holding FP, Fallon RE, Roberts JS (1999). Phase IIa safety and immunogenicity of a therapeutic vaccine, TA-GW, in persons with genital warts. *J Infect Dis* 179 (3): 612–618.
- Lavelle** EC, Grant G, Pusztai A, Pfuller U, O'Hagan DT (2001). The identification of plant lectins with mucosal adjuvant activity. *Immunology* 102 (1): 77–86.
- Lau** SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, Wong SS, Leung SY, Chan KH, Yuen KY (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (39): 14040-14045.
- Lau** YL & Peiris JS (2005). Pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Curr. Opin. Immunol.* 17 (4): 404-410.
- Lee** MW & Yang Y (2006). Transient expression assay by agroinfiltration of leaves. *Methods Mol. Biol.* 323: 225–229.

- Lee LY & Gelvin SB (2008)**. T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiol.* 146: 325–332.
- Lehar SM, Pedersen JT, Kamath RS, Swimmer C, Goldmacher VS, et al. (1994)**. Mutational and structural analysis of the lectin activity in binding domain 2 of ricin B chain. *Protein Eng.* 7: 1261–1266.
- Leung DT, Tam FC, Ma CH, Chan PK, Cheung JL, Niu H, Tam JS, Lim PL (2004)**. Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) targets the viral nucleocapsid. *J. Infect. Dis.* 190 (2): 379–386.
- Leung DT, van Maren WW, Chan FK, Chan WS, Lo AW, Ma CH, Tam FC, To KF, Chan PK, Sung JJ, Lim PL (2006)**. Extremely low exposure of a community to severe acute respiratory syndrome coronavirus: false seropositivity due to use of bacterially derived antigens. *J. Virol.* 80: 8920–8928.
- Li M, Cripe TP, Estes PA, Lyon MK, Rose RC, Garcea RL (1997)**. Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *J Virol* 71: 2988–2995.
- Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri GZ, Hu H, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S, Wang LF (2005a)**. Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. *Science* 310 (5748): 676–679.
- Li FQ, Xiao H, Tam JP, et al. (2005b)**. Sumoylation of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *FEBS Lett.* 579: 2387–2396.
- Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC (2005c)**. Structure of SARS Receptor Binding Domain Complexed with Receptor. *Science* 309: 1864–1868.
- Li HY, Ramalingam S, Chye ML (2006)**. Accumulation of recombinant SARS-CoV spike protein in plant cytosol and chloroplasts indicate potential for development of plant-derived oral vaccines. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 231 (8): 1346–1352.
- Li M, Chen Y, Liu Z, Shen F, Bian X, Meng Y (2009)**. Anti-tumor activity and immunological modification of ribosome-inactivating protein (RIP) from *Momordica charantia* by covalent attachment of polyethylene glycol. *Acta Biochim Biophys Sin* 792–799.
- Liang MF, Du RL, Liu JZ, Li C, Zhang QF, Han LL, Yu JS, Duan SM, Wang XF, Wu KX, Xiong ZH, Jin Q, Li DX (2005)**. SARS patients-derived human recombinant antibodies to S and M proteins efficiently neutralize SARS coronavirus infectivity. *Biomed. Environ. Sci.* 18: 363–374.
- Liao QJ, Ye LB, Timani KA, Zeng YC, She YL, Ye L, Wu ZH (2005a)**. Activation of NF-kappaB by the full-length nucleocapsid protein of the SARS coronavirus. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 37: 607–612.
- Liao CW, Chen CA, Lee CN, Su YN, Chang MC, Syu MH, Hsieh CY, Cheng WF (2005b)**. Fusion protein vaccine by domains of bacterial exotoxin linked with a tumor antigen generates potent immunologic responses and antitumor effects. *Cancer Res* 65: 9089–9098.
- 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: 3103–3112.
- Liénard D & Nogué F (2009)**. *Physcomitrella patens*: a non-vascular plant for recombinant protein production. *Methods Mol. Biol.* 483: 135–144.
- Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O’Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC (1996)**. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* 56: 21–26.
- Lin K, Doolan K, Hung CF, Wu TC (2010)**. Perspectives for Preventive and Therapeutic HPV Vaccines. *J Formos Med Assoc* 109 (1): 4–24.

- Liu** RS, Yang KY, Lin J, Zhang ZH, Zhang J, Xia NS (2004). High-yield expression of recombinant SARS coronavirus nucleocapsid protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *World J. Gastroenterol.* 10: 3602–3607.
- Liu** SJ, Leng CH, Lien SP, Chi HY, Huang CY, Lin CL, Lian WC, Chen CJ, Hsieh SL, Chong P (2006). Immunological characterizations of the nucleocapsid protein based SARS vaccine candidates. *Vaccine* 24: 3100–3108.
- Liu** B, Ye D, Song X, Zhao X, Yi L, Song J, Zhang Z, Zhao Q (2008). A novel therapeutic fusion protein vaccine by two different families of heat shock proteins linked with HPV16 E7 generates potent antitumor immunity and antiangiogenesis. *Vaccine* 26 (10): 1387–1396.
- 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: 1–11.
- Lowry** F (2008). Live *Listeria* vaccine proves safe against endstage cervical cancer in human trial. *Ob Gyn News*
- Lu** B, Huang Y, Huang L, Li B, Zheng Z, Chen Z, Chen J, Hu Q, Wan H (2009). Effect of mucosal and systemic immunization with virus-like particles of severe acute respiratory syndrome coronavirus in mice. *Immunology* 130: 254–261.
- Luo** H, Ye F, Sun TY, Yue L, Peng S, Chen J, Li G, Du Y, Xie Y, Yang Y, Shen J, Wang Y, Shen X, Jiang H (2004). In vitro biochemical and thermodynamic characterization of nucleocapsid protein of SARS. *Biophys. Chem.* 112: 15–25.
- Luo** H, Ye F, Chen K, Shen X, Jiang H (2005a). SR-rich motif plays a pivotal role in recombinant SARS coronavirus nucleocapsid protein multimerization. *Biochemistry* 44: 15351–15358.
- Luo** H, Chen Q, Chen J, Chen K, Shen X, Jiang H (2005b). The nucleocapsid protein of SARS coronavirus has a high binding affinity to the human cellular heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *FEBS Lett.* 579: 2623–2628.
- Maciag** PC, Radulovic S, Rothman J (2009). The first clinical use of a live-attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine: a Phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix. *Vaccine* 27: 3975–3983.
- 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: 1460–1469.
- Manuell** AL, Beligni MV, Elder JH, Siefker DT, Tran M, Weber A, McDonald TL, Mayfield SP (2007). Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnology Journal* 5: 402–412.
- Markowitz** LE, Dunne EF, Saraiya M, Lawson HW, Chesson H, Unger ER (2007). Quadrivalent human papillomavirus vaccine: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 56: 1–24.
- Marra** MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, Khattra J, Asano JK, et al. (2003). The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300: 1399–1404.
- Marshall** RS, D’Avila F, Di Cola A, Traini R, Solinas M, Spanò L, Fabbrini MS, Ceriotti A (2010). Signal peptide regulated toxicity of a plant ribosome-inactivating protein during cell stress (*submitted*).
- Martin** JE, Louder MK, Holman LA, Gordon IJ, Enama ME, Larkin BD, Andrews CA, Vogel L, Richard A, et al. (2008). A SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a Phase I clinical trial. *Vaccine* 26 (50): 6338–6343.

- 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 responses against human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75: 8434–8439.
- Mason** HS, Lam DM, Arntzen CJ (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11745–11749.
- Massa** S, Franconi R, Brandi R, Muller A, Mett V, Yusibov V, Venuti A (2007). Anti-cancer activity of plant-produced HPV16 E7 vaccine. *Vaccine* 25: 3018–3021.
- Massa** S, Simeone P, Muller A, Benvenuto E, Venuti A, Franconi R (2008). Antitumor Activity of DNA Vaccines Based on the Human Papillomavirus-16 E7 Protein Genetically Fused to a Plant Virus Coat Protein. *Human Gene Therapy* 19: 354–364.
- Massa** S, Skarjinskaia M, Mett V, Venuti A, Yusibov V, Franconi R (2009). Plant platforms for producing anti-cancer therapeutic vaccines. Presented at: 'Plant-Based Vaccines & Antibodies plant expression systems for recombinant pharmacologics' PBVA. Verona, Italy, 15–17 June (Poster A109).
- Massimi** P & Banks L (2000). Differential phosphorylation of the HPV-16 E7 oncoprotein during the cell cycle. *Virology* 276 (2): 388–394.
- Matoba** N, Kajiura H, Cherni I, Doran JD, Bomsel M, Fujiyama K, Mor TS (2009). Biochemical and immunological characterization of the plant-derived candidate human immunodeficiency virus type 1 mucosal vaccine CTB-MPR. *Plant Biotechnol. J.* 7(2): 129–145.
- Matsumoto** Y, Suzuki S, Nozoye T, Yamakawa T, Takashima Y, Arakawa T, Tsuji N, Takaiwa F, Hayashi Y (2009). Oral immunogenicity and protective efficacy in mice of transgenic rice plants producing a vaccine candidate antigen (As16) of *Ascaris suum* fused with cholera toxin B subunit. *Transgenic Res.* 18 (2): 185–192.
- Mayfield** SP, Manuell AL, Chen S, Wu J, Tran M, Siefker D, Muto M, Marin-Navarro J (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 126–133.
- McCormick** AA, Kumagai MH, Hanley K, Turpen TH, Hakim I, Grill LK, Tusé D, Levy S, Levy R (1999). Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 703–708.
- McCormick** AA, Reddy S, Reinl SJ, Cameron TI, Czerwinski DK, Vojdani F, Hanley KM, Garger SJ, White EL, Novak J, Barrett J, Holtz RB, Tusé D, Levy R (2008). Plant produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:10131–10136.
- McLaughlin-Drubin** ME & Münger K (2009a). Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Research* 143: 195–208.
- McLaughlin-Drubin** ME & Münger K (2009b). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 384: 335–344.
- 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: 10–15
- Medina-Bolivar** F, Wright R, Funk V, Sentz D, Barroso L, Wilkins TD, Petri W Jr, Cramer CL (2003). A non-toxic lectin for antigen delivery of plant-based mucosal vaccines. *Vaccine* 21 (9–10): 997–1005.
- Medrano** G, Reidy MJ, Liu J, Ayala J, Dolan MC, Cramer CL (2009). Rapid system for evaluating bioproduction capacity complex pharmaceutical proteins in plants. *Methods Mol. Biol.* 483: 51–67.
- Medrano** G, Dolan MC, Stephens NT, McMickle A, Erf G, Radin D, Cramer CL (2010). Efficient plant-based production of chicken interleukin-12 yields a strong immunostimulatory cytokine. *J. Interferon Cytokine Res.* 30 (3): 143–154.
- Merchant** SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB *et al.* (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318: 245–251.

- Meyers** C, Frattini MG, Hudson JB, Laimins LA (1992). Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science* 257: 971-973.
- Millar** DG, Hirst TR, Snider DP (2001). Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. *Infect. Immun.* 69 (5): 3476–3482.
- Mohr** IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250:1694-1699.
- Moody** CA & Laimins LA (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *PLoS Pathog.* 5: 10
- Morgenfeld** M, Eugenia Segretin M, Wirth S, Lentz E, Zelada A, Mentaberry A, Gissmann L, Bravo-Almonacid F (2009). Potato virus X coat protein fusion to human papillomavirus 16 E7 oncoprotein enhance antigen stability and accumulation in tobacco chloroplast. *Mol. Biotechnol.* 43 (3): 243–249.
- Mowat** AM (2005). Dendritic cells and immune responses to orally administered antigens. *Vaccine* 23: 1797-1799.
- Muderspach** L, Wilczynski S, Roman L, Bade L, Felix J, Small LA, Kast WM, Fascio G, Marty V, Weber J (2000). A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive. *Clin Cancer Res* 6 (9): 3406–3416.
- Mundy** J, Leah R, Boston R, Endo Y, Stirpe F. (1994). Genes encoding ribosome-inactivating proteins. *Plant Mol.Biol. Rep.* 12: 60–62.
- Münger** K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R (1989a). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 63: 4417–4421.
- Munger** K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM (1989b). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8 (13): 4099–4105.
- Münger** K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20: 7888-7898.
- Munoz** N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348: 518–527.
- Musiychuk** K, Stephenson N, Bi H, Farrance CE, Orozovic G, Brodelius M, Brodelius P, Horsey A, Ugulava N, Shamloul AM, Mett V, Rabindran S, Streatfield SJ, Yusibov V (2007). A launch vector for the production of vaccine antigens in plants. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 1: 19–25.
- Mutsch** M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, Spyr C, Steffen R (2004). Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N. Engl. J. Med.* 350 (9): 896–903.
- Narayanan** K, Chen CJ, Maeda J, Makino S (2003). Nucleocapsid-independent specific viral RNA signal. *J. Virol.* 77 (5): 2922-2927.
- Narayanan** S, Surendranath K, Bora N, Surolia A, Karande AA (2005). Ribosome inactivating proteins and apoptosis. *FEBS Lett.* 579: 1324–1331.
- Nardelli-Haeffliger** D, Lurati F, Wirthner D, Spertini F, Schiller JT, Lowy DR, Ponci F, De Grandi P (2005). Immune responses induced by lower airway mucosal immunisation with a human papillomavirus type 16 virus-like particle vaccine. *Vaccine* 23: 3634–3641.
- Negrout** V, Eisner G, Lee H *et al.* (2005). Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce. *Plant Sci.* 169: 433–438.

- Neupert J**, Karcher D, Bock R (2009). Generation of Chlamydomonas strains that efficiently express nuclear transgenes. *The Plant Journal* 57: 1140–1150.
- Ng TB**, Wong JH, Wang H (2010). Recent progress in research on ribosome inactivating proteins *Curr. Prot. Pept. Sci.* 11: 37– 53.
- Nguyen CL**, Eichwald C, Nibert ML, Munger K (2007). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component gamma-tubulin. *J. Virol.* 81 (24): 13533–13543.
- Nicolas E**, Beggs JM, Haltiwanger BM, Taraschi TF (1998). A new class of DNAGlycosylase/apurinic/aprimidinic lyases that act on specific adenines in single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* 273:17216–17220.
- Nielsen K & Boston RS** (2001). Ribosome-Inactivating Proteins: A Plant Perspective. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 785–816.
- Nilsson L**, Asano K, Svensson B, Poulsen FM, Nygard O (1986). Reduced turnover of the elongation factor EF-1 X ribosome complex after treatment with the protein synthesis inhibitor II from barley seeds. *Biophys. Acta* 868: 62–70.
- Nochi T**, Takagi H, Yuki Y Yang L, Masumura T, Mejima M, Nakanishi U, Matsumura A, Uozumi A, Hiroi T, Morita S, Tanaka K, Takaiwa F, Kiyono H (2007). Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104 (26): 10986–10991.
- Nuzzaci M**, Vitti A, Condelli V Lanorte MT, Tortorella C, Boscia D, Piazzolla P, Piazzolla G (2010). *In vitro* stability of cucumber mosaic virus nanoparticles carrying a hepatitis C virus-derived epitope under simulated gastrointestinal conditions and *in vivo* efficacy of an edible vaccine. *J. Virol. Methods* 165 (2): 211–215.
- O'Brien GJ**, Bryant CJ, Voogd C, Greenberg HB, Gardner RC, Bellamy AR (2000). Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in Nicotiana benthamiana coats PVX rods and also assembles into viruslike particles. *Virology* 270: 444–453.
- Ogra PL**, Faden H, Welliver RC (2001). Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 430–445.
- Ohlenschlager O**, Seiboth T, Zengerling H, Briese L, Marchanka A, Ramachandran R, Baum M, Korbas M, Meyer-Klaucke W, Durst M, Gorlach M (2006). Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7. *Oncogene* 25 (44): 5953–5959.
- Oostra M**, de Haan CAM, de Groot RJ, Rottier PJM (2006). Glycosylation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Triple-Spanning Membrane Proteins 3a and M. *Journal of Virology* 80 (5): 2326–2336.
- Paavonen J**, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, *et al.* (2007). Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 369: 2161–2670.
- Palmer KE**, Benko A, Doucette SA Cameron TI, Foster T, Hanley KM, McCormick AA, McCulloch M, Pogue GP, Smith ML, Christensen ND (2006). Protection of rabbits against cutaneous papillomavirus infection using recombinant tobacco mosaic virus containing L2 capsid epitopes. *Vaccine* 24 (26): 5516–5525.
- Pang H**, Liu Y, Han X, Xu Y, Jiang F, Wu D, Kong X, Bartlam M, Rao Z (2004). Protective humoral responses to several acute respiratory syndrome-associated coronavirus: implications for the design of an effective protein-based vaccine. *J. Gen. Virol.* 85: 3109–3113.
- Pardoll DM** (1998). Cancer vaccines. *Nature Medicine Vaccine Supplement* 4: 525–531.
- Parikh BA & Tumer NE** (2004). Antiviral activity of ribosome inactivating proteins in medicine. *Mini Rev. Med. Chem.* 4: 523–543.

- Parker L, Kendall A, Stubbst G (2002).** Surface features of Potato Virus X from fiber diffraction. *Virology* 300: 291-295.
- Parkin DM (2006).** The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118: 3030–3044.
- Paul M & Ma JKC (2010).** Plant-made immunogens and effective delivery strategies *Expert Rev. Vaccines* 9 (8): 821–833.
- Paz De la Rosa G, Monroy-García A, Mora-García ML Peña CG, Hernández-Montes J, Weiss-Steider B, Gómez-Lim MA (2009).** An HPV 16 L1-based chimeric human papillomavirus-like particles containing a string of epitopes produced in plants is able to elicit humoral and cytotoxic T-cell activity in mice. *Virol. J.* 6: 1–11.
- Pei H, Liu J, Cheng Y, Sun C, Wang C, Lu Y, Ding J, Zhou J, Xiang H (2005).** Expression of SARS-coronavirus nucleocapsid protein in Escherichia coli and Lactococcus lactis for serodiagnosis and mucosal vaccination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 220–227.
- Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY (2003).** SARS study group. Coronavirus as possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361: 1319-1325.
- Peiris JS, Guan Y, Yuen KY (2004).** Severe acute respiratory syndrome. *Nat. Med.* 10: 88–97.
- Pereira R, Hitzeroth II, Rybicki EP (2009).** Insights into the role and function of L2, the minor capsid protein of papillomaviruses. *Arch. Virol.* 154 (2): 187–197.
- Peto J, Gilham C, Fletcher O, Matthews FE (2004).** The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet* 364: 249–256.
- Phelps WC, Yee CL, Munger K, Howley PM (1988).** The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 53 (4): 539-547.
- Pijpers F, Faint R, Saini N (2005).** Therapeutic cancer vaccines. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 623.
- Pittaluga E, Tucci A, Poma A, Spanò L (2005).** Expression and characterization in E.coli of mutant forms of saporin. *J. Biotechnology* 117: 263-266.
- Pogrebnyak N, Golovkin M, Andrianov V, Spitsin S, Smirnov Y, Egolf R, Koprowski H (2005).** Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 9062–9067.
- Preville X, Ladant D, Timmerman B, Leclerc C (2005).** Eradication of established tumors by vaccination with recombinant Bordetella pertussis adenylate cyclase carrying the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Cancer Res* 65: 641–649.
- Pujol M, Ramírez NI, Ayala M, Gavilondo JV, Valdés R, Rodríguez M, Brito J, Padilla S, Gómez L, Reyes B, Peral R, Pérez M, Marcelo JL, Milá L, Sánchez RF, Páez R, Cremata JA, Enríquez G, Mendoza O, Ortega M, Borroto C (2005).** An integral approach towards a practical application for a plant-made monoclonal antibody in vaccine purification. *Vaccine* 23: 1833–1837.
- Qin E, Shi H, Tang L, Wang C, Chang G, Ding Z, Zhao K, Wang J, Chen Z, Yu M, Si B, Liu J, Wu D, Cheng X, Yang B, et al. (2006).** Immunogenicity and protective efficacy in monkeys of purified inactivated Vero-cell SARS vaccine. *Vaccine* 24: 1028–1034.
- Qin Z, Jinming C, Xiaojun H, Huanying Z, Jicheng H, Ling F, Kunpeng L, Jingqiang Z (2004).** The Life Cycle of SARS Coronavirus in Vero E6 Cells. *J. Med. Virol.* 73: 332-337.
- Qiu M, Shi Y, Guo Z, Chen Z, He R, Chen R, Zhou D, Dai E, Wang X, Si B, Song Y, Li J, Yang L, Wang J, Wang H, et al. (2005a).** Antibody responses to individual proteins of SARS coronavirus and their neutralization activities. *Microbes Infect.* 7: 882–889.

- Qiu M**, Wang J, Wang H, Chen Z, Dai E, Guo Z, Wang X, Pang X, Fan B, Wen J, Wang J, Yang R (2005b). Use of the COOH portion of the nucleocapsid protein in an antigen-capturing enzyme-linked immunosorbent assay for specific and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 474–476.
- Radakovits R**, Jinkerson RE, Darzins A, Posewitz MC. (2010). Biofuels from Eukaryotic Microalgae. *Eukaryot Cell* [Epub ahead of print].
- Rajamani S**, Siripornadulsil S, Falcao V, Torres M, Colepiccolo P, Sayre R. (2007). Phycoremediation of heavy metals using transgenic microalgae. *Adv. Exp. Med. Biol.* 616: 99-109.
- Rechtsteiner G**, Warger T, Osterloh P, et al. (2005). Cutting edge: priming of CTL by transcutaneous peptide immunization with imiquimod. *J Immunol* 174: 2476–2480.
- Reinstein E**, Scheffner M, Oren M, Ciechanover A, Schwartz A (2000). Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene* 19 (51): 5944–5950.
- Reisinger KS**, Block SL, Lazcano-Ponce E, Samakoses R, Esser MT, Erick J, Puchalski D, Giacoletti KE, Sings HL, Lukac S, Alvarez FB, Barr E (2007). Safety and persistent immunogenicity of a quadrivalent human papillomavirus types 6, 11, 16, 18 L1 virus-like particle vaccine in preadolescents and adolescents: a randomized controlled trial. *Pediatr Infect Dis J* 26: 201–209.
- Ressing ME**, van Driel WJ, Brandt RM, Kenter GG, de Jong JH, Bauknecht T (2000). Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. *J Immunother* 23: 2255-2266.
- Richards RM**, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1522-1527.
- Roggero P**, Ciuffo M, Benvenuto E, Franconi R (2001). The expression of a single-chain Fv antibody fragment in different plant hosts and tissues by using Potato virus X as a vector. *Protein Expr Purif* 22 (1): 70-74.
- Roper RL & Rehm KE** (2009). SARS vaccines: where are we? *Expert Rev Vaccines* 8 (7): 887-898.
- Rota PA**, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Penaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen MH, Tong S, Tamin A, et al. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300 (5624): 1394-1399.
- Rowland RR**, Chauhan V, Fang Y, Pekosz A, Kerrigan M, Burton MD (2005). Intracellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein: absence of nucleolar accumulation during infection and after expression as a recombinant protein in vero cells. *J. Virol.* 79: 11507–11512.
- Roy P & Noad R** (2009). Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Adv. Exp. Med. Biol.* 655: 145–158.
- Rybicki EP** (2009). Plant produced vaccines: promise and reality. *Drug Discovery Today* 14 (1-2): 16-24.
- Rybicki EP** (2010). Plant-made vaccines for humans and animals *Plant Biotechnology Journal* 8: 620–637.
- Sadler L**, Saftlas A, Wang W, Exeter M, Whittaker J, McCowan L (2004). Treatment for cervical intraepithelial neoplasia and risk of preterm delivery. *JAMA* 291: 2100–2106.
- Saijo M**, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NT, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S (2005). Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J. Virol. Methods* 125: 181–186.
- Saint-Jore-Dupas C**, Faye L, Gomord V (2007). From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *TRENDS in Biotechnology* 25 (7): 317-323.

- Sang** BC & Barbosa MS (1992). Single amino acid substitutions in “low-risk” human papillomavirus (HPV) type 6 E7 protein enhance features characteristic of the “high-risk” HPV E7 oncoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (17): 8063–8067.
- Santanchè** S, Bellelli A, Brunori M (1997). The unusual stability of saporin, a candidate for the synthesis of immunotoxins. *Biochem Biophys Res. Commun.* 234 (1): 129-132.
- 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 USA* 103: 861-866.
- 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 (15): 1846–1854.
- Santin** AD, Bellone S, Palmieri M, Ravaggi A, Romani C, Tassi R, Roman JJ, Burnett A, Pecorelli S, Cannon MJ (2006). HPV16/18 E7-pulsed dendritic cell vaccination in cervical cancer patients with recurrent disease refractory to standard treatment modalities. *Gynecol Oncol* 100: 469–478.
- Saunders** K, Sainsbury F, Lomonosoff 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 (2): 329–337.
- Schijns** VEJC & O’Hargan DT (2006). Immunopotentiators in modern vaccines. Academic Press (Book)
- Schulze** K, Staib C, Schätzlb HM, Ebensen T, Erfler V, Guzman CA (2008). A prime-boost vaccination protocol optimizes immune responses against the nucleocapsid protein of the SARS coronavirus. *Vaccine* 26 (51): 6678-6684.
- See** RH, Zakhartchouk AN, Petric M, Lawrence DJ, Mok CP, Hogan RJ, Rowe T, Zitzow LA, Karunakaran KP, Hitt MM, Graham FL, Prevec L, Mahony JB, Sharon C, Auperin TC (2006). Comparative evaluation of two severe acute respiratory syndrome (SARS) vaccine candidates in mice challenged with SARS coronavirus. *J. Gen. Virol.* 87: 641–650.
- Shadwick** FS & Doran PM (2007a). Infection, propagation, distribution and stability of plant virus in hairy root cultures. *J. Biotechnol.* 131: 318–329.
- Shadwick** FS & Doran PM (2007b). Propagation of plant viruses in hairy root cultures: a potential method for in vitro production of epitope vaccines and foreign proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 96: 570–583.
- Shang** B, Wang XY, Yuan JW, Vabret A, Wu XD, Yang RF, Tian L, Ji YY, Deubel V, Sun B (2005). Characterization and application of monoclonal antibodies against N protein of SARS-coronavirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336: 110–117.
- Sharma** AK & Sharma MK (2009). Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances* 27: 811–832.
- Sheets** EE, Urban RG, Crum CP, Hedley ML, Politch JA, Gold MA, Muderspach LI, Cole GA, Crowley-Nowick PA (2003). Immunotherapy of human cervical high-grade cervical intraepithelial neoplasia with microparticle-delivered human papillomavirus 16 E7 plasmid DNA. *Am J Obstet Gynecol* 188: 916–926.
- Shi** YL, Wan ZY, Li L, Li P, Li C, Ma Q, Cao C (2004). Antibody responses against SARS-coronavirus and its nucleocapsid in SARS patients. *J Clin Virology* 31: 66-68.
- Sikriwal** D, Ghosh P, Batra JK (2008). Ribosome inactivating protein saporin induces apoptosis through mitochondrial cascade, independent of translation inhibition. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40: 2880–2888.
- Simmons** CW, VanderGheynst JS, Upadhyaya SK (2009). A model of *Agrobacterium tumefaciens* vacuum infiltration into harvested leaf tissue and subsequent in planta transgene transient expression. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 965–970.
- Singh** M (2007). Vaccine adjuvants and delivery systems. Wiley-Interscience (Book)

- Skarjinskaia** M, Karl J, Araujo A Ruby K, Rabindran S, Streatfield SJ, Yusibov V (2008). Production of recombinant proteins in clonal root cultures using episomal expression vectors. *Biotechnol. Bioeng.* 100: 814–819.
- Slupetzky** K, Gambhira R, Culp TD Shafiti-Keramat S, Schellenbacher C, Christensen ND, Roden RB, Kimbaurer R (2007). A papillomavirus-like particle (VLP) vaccine displaying HPV16 L2 epitopes induces cross-neutralizing antibodies to HPV11. *Vaccine* 25 (11): 2001–2010.
- Smahel** M, Šima P, Ludvíková V, Vonka V (2001). Modified HPV16 E7 genes as DNA vaccine against E7-containing oncogenic cells. *Virology* 281: 231–238.
- Smith** JL, Campos SK, Ozburn MA (2007). Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes. *J Virol* 81: 9922–9931.
- Smith-McCune** K, Kalman D, Robbins C, Shivakumar S, Yuschenko L, Bishop JM (1999). Intranuclear localization of human papillomavirus 16 E7 during transformation and preferential binding of E7 to the Rb family member p130. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (12): 6999–7004.
- Smotkin** D & Wettstein FO (1987). The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J. Virol.* 61: 1686–1689.
- Specht** E, Stoner SM, Mayfield S (2010). Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnol Lett* 32 (10): 1373–1383.
- Srivastava** PK (2002). Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol.* 20: 395–425.
- Stadler** K, Maignani V, Eickmann M, Becker S, Abrignani S, Klenk HD, Rappuoli R. (2003). SARS-Beginning to understand a new virus. *Nature Microbiology* 1 (3): 209–218.
- Steller** MA, Gorski KJ, Murakami M, Daniel RW, Shah KV, Celis E, Sette A, Trimble EL, Park RC, Marincola FM (1998). Cell-mediated immunological responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with a lipidated epitope of human papillomavirus type 16 E7. *Clin Cancer Res* 4 (9): 2103–2109.
- Stevenson** FK, Ottensmeier CH, Johnson P, Zhu D, Buchan SL, McCann KJ, Robbick JS, King AT, McNicholl F, Savelyeva N, Rice J (2004). DNA vaccine to attack cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 14646–14652.
- Stewart** TJ, Drane D, Malliaros J, Elmer H, Malcolm KM, Cox JC, Edwards SJ, Frazer IH, Fernando GJ (2004). ISCOMATRIX adjuvant: an adjuvant suitable for use in anticancer vaccines. *Vaccine* 22 (27–28): 3738–3743.
- Stirpe** F (2004). Ribosome inactivating proteins. *Toxicon* 44: 371–383.
- Stirpe** F & Battelli MG (2006). Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 1850–1866.
- Strugnell** RA & Wijburg OL (2010). The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Rev Microbiol* 8 (9): 656–667.
- Su** JH, Wu A, Scotney E, Ma B, Monie A, Hung CF, Wu TC (2010). Immunotherapy for Cervical Cancer: Research Status and Clinical Potential. *BioDrugs.* 24 (2): 109–129.
- Sui** J, Li W, Murakami A, Tamin A, Matthews LJ, Wong SK, Moore MJ, Tallarico AS, Olurinde M, Choe H, Anderson LJ, Bellini WJ, Farzan M, Marasco WA (2004). Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (8): 2536–2541.
- Sun** HX, Xie Y, Ye YP (2009a). ISCOMs and ISCOMATRIX. *Vaccine* 27(33): 4388–4401.
- Sun** HX, Xie Y, Ye YP (2009b). Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* 27(12): 1787–1796.
- Sun** JB, Czerkinsky C, Holmgren J (2010). Mucosally induced immunological tolerance, regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit. *Scand. J. Immunol.* 71(1) : 1–11.

- Sunil Kumar** GB, Ganapathi TR, Srinivas L, Revathi CJ, Bapat VA (2006). Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots. *Plant Science* 170: 918–925.
- Surjit** M, Kumar R, Mishra RN, Reddy MK, Chow VT, Lal SK (2005). The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3-mediated translocation. *J. Virol.* 79: 11476–11486.
- Surjit** M, Liu B, Chow VT, Lal SK (2006). The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome-coronavirus inhibits the activity of cyclin/cyclin-dependent kinase complex and blocks S phase progression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 281: 10669–10681.
- Surjit** M & Lal SK (2007). The SARS-CoV nucleocapsid protein: A protein with multifarious activities. *Infection, Genetics and Evolution* 8 (4): 397–405.
- Surzycki** R, Greenham K, Kitayama K, Dibal F, Wagner R, Rochaix JD, Ajam T, Surzycki S (2009). Factors effecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals* 37: 133–138.
- Szalai** K, Scholl I, Forster-Waldl E, Polito L, Bolognesi A, Untersmayr E, Riemer AB, Boltz-Nitulescu G, Stürpe F, Jensen-Jarolim E (2005). Occupational sensitization to ribosome-inactivating proteins in researchers. *Clin Exp Allergy* 35: 1354–1360.
- Tacket** CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ (1998). Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat. Med.* 4 (5): 607–609.
- 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: 302–305.
- Tacket** CO (2005). Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. *Vaccine* 23: 1866–1869.
- Tague** BW & Mantis J (2006). In planta Agrobacterium-mediated transformation by vacuum infiltration. *Methods Mol. Biol.* 323: 215–223.
- Tan** YJ, Goh PY, Fielding BC, Shen S, Chou CF, Fu JL, Leong HN, Leo YS, Ooi EE, Ling AE, Lim SG, Hong W (2004). Profiles of antibody responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus recombinant proteins and their potential use as diagnostic markers. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 362–371.
- Tang** P, Louie M, Richardson SE, Smieja M, Simor AE, Jamieson F, Fearon M, Poutanen SM, Mazzulli T, Tellier R, Mahony J, Loeb M, Petrich A, Chernesky M, McGeer A, *et al.* (2004). Interpretation of diagnostic laboratory tests for severe acute respiratory syndrome: the Toronto experience. *CMAJ* 170 (1): 47–54.
- 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 USA* 102: 3378–3382.
- Thiel** V, Ivanov KA, Putics A, Hertzog T, Schelle B, Bayer S, Weissbrich B, Snijder EJ, Rabenau H, Doerr HW, Gorbalenya AE, Ziebuhr J (2003). Mechanisms and enzyme involved in SARS coronavirus genome expression. *J. Gen. Virol.* 84: 2305–2315.
- Thompson** HS, Davies ML, Holding FP, Fallon RE, Mann AE, O'Neill T, Roberts JS (1999). Phase I safety and antigenicity of TA-GW: a recombinant HPV6 L2E7 vaccine for the treatment of genital warts. *Vaccine* 17(1): 40–49.
- Timani** KA, Liao Q, Ye L, Zeng Y, Liu J, Zheng Y, Ye L, Yang X, Lingbao K, Gao J, Zhu Y (2005). Nuclear/nucleolar localization properties of C-terminal nucleocapsid protein of SARS coronavirus. *Virus Res.* 114: 23–34.
- Tiwari** S, Verma PC, Singh PK, Tuli R (2009). Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnology Advances* 27: 449–467.
- Trimble** CL, Peng S, Kos F, Gravitt P, Viscidi R, Sugar E, Pardoll D, Wu TC (2009). A phase I trial of a human papillomavirus DNA vaccine for HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3. *Clin Cancer Res* 15: 361–7.

- Tripp** RA, Haynes LM, Moore D, Anderson B, Tamin A, Harcourt BH, Jones LP, Yilla M, Babcock GJ, Greenough T, *et al.* (2005). Monoclonal antibodies to SARS-associated coronavirus (SARS-CoV): identification of neutralizing and antibodies reactive to S, N, M and E viral proteins. *J. Virol. Methods* 128 (1-2): 21-28.
- Tudor** D, Dubuquoy C, Gaboriau V, Lefevre F, Charley B, Riffaults S (2005). TRL9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines. *Vaccine* 23: 1258-1264.
- Twyman** RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* 21: 570-578.
- Uhde** K, Fischer R, Commandeur U (2005). Expression of multiple foreign epitopes presented as synthetic antigens on the surface of potato virus X particles. *Arch. Virol.* 150: 327–340.
- Ulmer** JB, Valley U, Rappuoli R (2006). Vaccine manufacturing: challenges and solutions. *Nature Biotechnology* 24: 1377-1383.
- Vambutas** A, DeVoti J, Nouri M, Drijfhout JW, Lipford GB, Bonagura VR, van der Burg SH, Melief CJ (2005). Therapeutic vaccination with papillomavirus E6 and E7 long peptides results in the control of both established virus-induced lesions and latently infected sites in a pre-clinical cottontail rabbit papillomavirus model. *Vaccine* 23: 5271–5280.
- van Driel** WJ, Rensing ME, Kenter GG, Brandt RM, Krul EJ, van Rossum AB, Schuurin E, Offringa R, Bauknecht T, Tamm-Hermelink A, van Dam PA, Fleuren GJ, Kast WM, Melief CJ, Trimbos JB (1999). Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial. *Eur J Cancer* 35 (6): 946–952.
- Van Etten** J (2009). Lesser known large dsDNA viruses. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 328: 5-7.
- van Rooijen** GJ & Moloney MM (1995). Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. *Biotechnology (NY)* 13 (1): 72–77.
- Vaquero** C, Sack M, Chandler J, Drossard J, Schuster F, Monecke M, Schillberg S, Fischer R (1999). Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11128-11133.
- 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 (9): 1771–1786.
- Varsani** A, Williamson AL, Stewart D, Rybicki EP (2006). Transient expression of human papillomavirus type16 L1 protein in *Nicotiana benthamiana* using an infectious tobamovirus vector. *Virus Res.* 120 (1–2): 91–96.
- Venuti** A, Massa S, Mett V, Vedova LD, Paolini F, Franconi R, Yusibov V (2009). An E7-based therapeutic vaccine protects mice against HPV16 associated cancer. *Vaccine* 27: 3395–3397.
- Verchot-Lubicz** J (2005). A new cell-to-cell transport model for Potexviruses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 283–290.
- Verchot-Lubicz** J, Ye CM, Bamunusinghe D (2007). Molecular biology of potexviruses: recent advances. *J. Gen. Virol.* 88: 1643–1655.
- Verma** D & Daniell H (2007). Chloroplast vector systems for biotechnology applications. *Plant Physiol.* 145 (4): 1129–1143.
- Vermij** P & Waltz E (2006). USDA approves the first plant-based vaccine. *Nat Biotechnol* 24: 233–234.
- Vidi** PA, Kessler F, Brehelin C (2007). Plastoglobules: a new address for targeting recombinant proteins in the chloroplast. *BMC Biotechnol* 7: 4.
- Voß** D, Pfefferle S, Drosten C, Stevermann L, Tragglai E, Lanzavecchia A, Becker S (2009). Studies on membrane topology, N-glycosylation and functionality of SARS-CoV membrane protein. *Virology Journal* 6: 79.

- Voinnet** O, Rivas S, Meste 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. *The Plant J.* 33: 949-956.
- von Krogh** G (2001). Management of anogenital warts (condylomata acuminata). *Eur J Dermatol* 11: 598-604.
- Vunsh** R, Li J, Hanania U, *et al.* (2007). High expression of transgene protein in *Spirodela*. *Plant Cell Rep.* 26 (9): 1511-1519.
- Waite** DC, Jacobson EW, Ennis FA *et al.* (2001). Three double-blind, randomized trials evaluating the safety and tolerance of different formulations of the saponin adjuvant QS-21. *Vaccine* 19 (28–29): 3957–3967.
- Walboomers** JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12–19.
- Walker** TL, Purton S, Becker DK, Collet C (2005). Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep.* 24: 629–641.
- Walmsley** AM & Arntzen CJ (2000). Plants for delivery of edible vaccines: *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 126-129.
- Wang** P & Tumer NE (2000) Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins. *Adv. Virus Res.* 55: 325–355.
- Wang** Y, Wu X, Wang Y, Li B, Zhou H, Yuan G, Fu Y, Luo Y (2004). Low stability of nucleocapsid protein in SARS virus. *Biochemistry* 43: 11103–11108.
- Wang** Z, Yuan Z, Matsumoto M, Hengge UR, Chang YF (2005). Immune responses with DNA vaccines encoded different gene fragments of severe acute respiratory syndrome coronavirus in BALB/c mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327: 130–135.
- Wang** HH, Yin WB, Hu ZM (2009). Advances in chloroplast engineering. *J. Genet. Genomics* 36: 387-398.
- 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(16): 8702–8711.
- Weiss** SR & Navas-Martin S (2005). Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 635–664.
- Welch** PJ & Wang JY (1995). Disruption of retinoblastoma protein function by coexpression of its C pocket fragment. *Genes and Development* 9 (1): 31–46.
- Welters** MJ, Kenter GG, Piersma SJ, Vloon AP, Löwik MJ, Berends-van der Meer DM, Drijfhout JW, Valentijn AR, Wafelman AR, Oostendorp J, Fleuren GJ, Offringa R, Melief CJ, van der Burg SH (2008). Induction of tumor-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin Cancer Res* 14: 178–187.
- Woo** PCY, Lau SKP, Wong BHL, Chan KH, Chu CM, Tsoi HW, Huang Y, Peiris, JSM, Yuen KY (2004). Longitudinal profile of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in patients with pneumonia due to the SARS coronavirus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11: 665–668.
- Woo** PC, Lau SK, Tsoi HW, Chen ZW, Wong BH, Zhang L, Chan JK, Wong LP, He W, Ma C, Chan KH, Ho DD, Yuen KY (2005). SARS coronavirus spike polypeptide DNA vaccine priming with recombinant spike polypeptide from *Escherichia coli* as booster induces high titer of neutralizing antibody against SARS coronavirus. *Vaccine* 23: 4959–4968.
- Woodman** CBJ, Collins SI, Young LS (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issue. *Nature Reviews Cancer* 7: 11-22.
- Yang** L, Peng H, Zhu Z, Li G, Huang Z, Zhao Z, Koup RA, Bailer RT, Wu C (2007). Persistent memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses in recovered severe acute respiratory syndrome (SARS) patients to SARS coronavirus M antigen. *J Gen Virol.* 88 (10): 2740–2748.

- Yang** L, Wang H, Liu J Li L, Fan Y, Wang X, Song Y, Sun S, Wang L, Zhu X, Wang X (2008). A simple and effective system for foreign gene expression in plants via root absorption of agrobacterial suspension. *J. Biotechnol.* 134: 320–324.
- Yip** CW, Hon CC, Zeng F, Chow KY, Chan KH, Peiris JS, Leung FC (2007). Naturally occurring anti-Escherichia coli protein antibodies in the sera of healthy humans cause analytical interference in a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 99–101.
- Yoon** CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW (2001). Alpha (6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 668-673.
- You** J, Dove BK, Enjuanes L, DeDiego ML, Alvarez E, Howell G, Heinen P, Zambon M, Hiscox JA (2005). Subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *J. Gen. Virol.* 86: 3303–3310.
- Yuki** Y, Tokuhara D, Nochi T Yasuda H, Mejima M, Kurokawa S, Takahashi Y, Kataoka N, Nakanishi U, Hagiwara Y, Fujihashi K, Takaiwa F, Kiyono H (2009). Oral MucoRice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralising immunity. *Vaccine* 27(43): 5982–5988.
- Zakhartchouk** AN, Liu Q, Petric M, Babiuk LA (2005). Augmentation of immune responses to SARS coronavirus by a combination of DNA and whole killed virus vaccines. *Vaccine* 23: 4385–4391.
- Zarovni** N, Vago R, Soldà T, Monaco L, Fabbri MS (2007). Saporin as a novel suicide gene in anticancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 14: 165-173.
- Zarovni** N, Vago R, Fabbri MS (2009). Saporin suicide gene therapy. *Methods Mol Biol* 542: 261-83.
- Zhao** J, Ben LH, Wu YL, Hu W, Ling K, Xin SM, Nie HL, Ma L, Pei G (1999). Anti-HIV Agent Trichosanthin Enhances the Capabilities of Chemokines to Stimulate Chemotaxis and G Protein Activation, and This Is Mediated through Interaction of Trichosanthin and Chemokine Receptors. *J. Exp. Med.* 190: 101–111.
- Zhao** J, Huang Q, Wang W, Zhang Y, Lv P, Gao XM (2007). Identification and characterization of dominant helper T-cell epitopes in the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 81 (11): 6079–6088.
- Zheng** ZM & Baker CC (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 11: 2286-2302.
- Zheng** N, Xia R, Yang C Yin B, Li Y, Duan C, Liang L, Guo H, Xie Q (2009). Boosted expression of the SARS-CoV nucleocapsid protein in tobacco and its immunogenicity in mice. *Vaccine* 27: 5001–5007.
- Zhu** MS, Pan Y, Chen HQ, Shen Y, Wang XC, Sun YJ, Tao KH (2004). Induction of SARS-nucleoprotein-specific immune response by use of DNA vaccine. *Immunol. Lett.* 94: 237-243.
- Zhu** H, Hu S, Jona G, Zhu X, Kreiswirth N, Willey BM, Mazzulli T, Liu G, Song Q, Chen P, Cameron M, Tyler A, Wang J, Wen J, Chen W, Compton S, Snyder M (2006). Severe acute respiratory syndrome diagnostics using a coronavirus protein microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (11): 4011-4016.
- zur Hausen** H (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2: 342-350.
- Zwaveling** S, Ferreira Mota SC, Nouta J, Johnson M, Lipford GB, Offringa R, van der Burg SH, Melief CJ (2002). Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* 169: 350–358.

SITI WEB

- 1-https://www.msu.edu/course/isb/202/ebertmay/2004/notes/snotes/02_28_06_bghuman.html
- 2-<http://www.ventrabilio.com/products/>
- 3-<http://www.sembiosys.com/>
- 4-<http://www.biolex.com/>
- 5-<http://www.greenovation.com/>
- 6-<http://www.niaid.nih.gov/>
- 7-http://www.hku.hk/respari/research_03.htm
- 8-<http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Coronaviruses.html>
- 9-<http://www.salute.gov.it/malattieInfettive/paginaInternaMenuMalattieInfettive.jsp?id=818&lingua=italiano&menu=altremalattie>
- 10-http://www.pharmaproject.com/therapy_analysis/hpv_1009.htm
- 11-<http://www.fda.gov/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/VaccinesandRelatedBiologicalProductsAdvisoryCommittee/ucm18136.htm>
- 12-<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00155766?term=HPV%2C+DC&rank=1>
- 13- <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00943722>
- 14-<http://www.clinicaltrials.gov> [ClinicalTrials.gov identifier NCT00019110].
- 15-<http://www.clinicaltrials.gov> [ClinicalTrials.gov identifier NCT00493545].

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare innanzitutto la Dott.ssa Rosella Franconi che, con entusiasmo e grinta unici, mi ha trasmesso le sue conoscenze e mi ha coinvolta nei suoi progetti di ricerca in ogni momento di questo percorso formativo. Le sono grata anche per la sua disponibilità e per il sostegno che mi ha fornito nelle diverse fasi di questo lavoro e per la sua capacità di incoraggiarmi nei momenti più difficili.

Ringrazio di cuore le Dott.sse Silvia Massa ed Elena Illiano per l'importante e sincera amicizia e per avermi aiutata costantemente nella vita di laboratorio. In particolare ringrazio Silvia per avermi seguito nelle diverse fasi del lavoro e soprattutto per il suo fondamentale contributo alla realizzazione e sperimentazione pre-clinica dei vaccini genetici. Desidero ringraziare anche Orsola Bitti per avermi aiutata soprattutto nella crescita e nelle infezioni delle piante.

Un sentito ringraziamento va al Dott. Gennaro di Giorgio per avermi sostenuta e incoraggiata per tutto il corso del Dottorato.

Ringrazio la Prof.ssa Stefania Masci per la sua disponibilità in tutte le occasioni che si sono presentate nel corso di questi tre anni.

Ringrazio tutte le persone che mi sono state vicine in questi anni, in particolare mio marito Fausto, i miei genitori e i miei suoceri che con amore mi hanno sostenuta in ogni momento del lavoro e il mio piccolo Giovanni che con i suoi sorrisi ha riempito di gioia le mie giornate.

COLLABORAZIONI

Un sentito ringraziamento va ai ricercatori che hanno collaborato alla realizzazione di questo progetto:

-Dott.ssa Paola Di Bonito, Dipartimento di Malattie infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

-Prof. Giovanni Giuliano e Dott.ssa Paola Ferrante, ENEA Casaccia, Roma.

-Dott. Aldo Venuti, Centro di Ricerche Sperimentali, Istituto Regina Elena, Roma.

-Prof.ssa Laura Spanò, Università degli Studi dell'Aquila.