



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI
VITERBO**

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA ED AGROCHIMICA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

IN BIOTECNOLOGIE VEGETALI - XVIII CICLO.

***Validazione di un repertorio di anticorpi ad alta stabilità
per studi di interferenza funzionale in pianta attraverso un
approccio proteomico***

S.S.D. BIO 04

Coordinatore: Prof. Domenico Lafiandra

Tutor: Dott.ssa Angiola Desiderio

Dottoranda: Mariasole Di Carli

1. INTRODUZIONE

1.1 ANTICORPI RICOMBINANTI E PROTEOMICA

1.1.1	Gli anticorpi: aspetti generali.....	1
1.1.2	I frammenti anticorpali “scFv”	4
1.1.3	Applicazioni degli anticorpi ricombinanti “scFv”	6

1.2 SISTEMI PER LO STUDIO DELLE FUNZIONI PROTEICHE

1.2.1	L’indagine proteomica	9
1.2.2	Il sistema del “doppio ibrido”	11
1.2.3	I “microarray” di proteine	14

1.3 GLI “INTRABODIES”

1.3.1	L’ immunomodulazione di funzioni cellulari	16
1.3.2	Difficoltà di espressione in ambiente citoplasmatico	18
1.3.3	Tentativi di ottenere gli “intrabodies”	19
1.3.4	Gli “intrabodies” e la proteomica.....	20
1.3.5	Applicazioni in pianta	22

1.4 REPERTORI MOLECOLARI: LE “PHAGE DISPLAY LIBRARIES”

1.4.1	Aspetti generali	26
1.4.2	Il principio del “phage display”	28
1.4.3	Repertori di anticorpi sintetici.....	31
1.4.4	Il repertorio “ETH”	32

1.5 LA “LIBRARY F8”

1.5.1	Stabilità termodinamica dell'anticorpo F8.....	34
1.5.2	Il scFv(F8) come “scaffold” per la costruzione di anticorpi a nuova specificità	35
1.5.3	Disegno e costruzione del repertorio di anticorpi basato sul scFv(F8).....	36
1.5.4	Selezione di anticorpi con differente specificità	38
1.5.5	Proprietà di ripiegamento <i>in vitro</i>	39
1.6	SCOPO DELLA TESI	40

2. MATERIALI E METODI

2.1 REAGENTI DI BASE E COLTURE BATTERICHE

2.1.1	Soluzioni di base	43
2.1.2	Ceppi batterici	44
2.1.3	Terreni di coltura.....	44

2.2 SELEZIONE DEL REPERTORIO MOLECOLARE

2.2.1	Selezione sull'antigene immobilizzato: cicli di “biopanning”	45
2.2.2	Infezione con “Helper-Phage”	45
2.2.3	Recupero dei fagi	46
2.2.4	Analisi dei cloni selezionati	46

2.3 CLONAGGI IN PLASMIDE

2.3.1	Il vettore pDN332	47
-------	-------------------------	----

2.3.2	Digestione del DNA con enzimi di restrizione	49
2.3.3	Amplificazione di specifici frammenti di DNA tramite PCR.....	49
2.3.4	Elettroforesi su gel d'agarosio	50
2.3.5	Estrazione e purificazione di DNA da gel d'agarosio	50
2.3.6	Reazione di defosforilazione.....	50
2.3.7	Reazione di ligazione	51
2.3.8	Trasformazione delle cellule batteriche	51
2.3.9	Caratterizzazione dei ricombinanti batterici mediante PCR.....	52
2.3.10	Mini preparazione di DNA plasmidico ad elevata purezza	52
2.3.11	Sequenze nucleotidiche.....	53

2.4 ANALISI DEI FRAMMENTI ANTICORPALI scFv

2.4.1	Estrazione delle proteine espresse nel periplasma di <i>E. coli</i>	54
2.4.2	Estrazione delle proteine espresse nel citoplasma di <i>E. coli</i>	54
2.4.3	Purificazione dei frammenti scFv	55
2.4.4	Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE).....	55
2.4.5	Determinazione della concentrazione proteica	56
2.4.6	“Western blotting”	56
2.4.6	Saggio ELISA	57

2.5	MISURE DI AFFINITA' ANTIGENE-ANTICORPO MEDIANTE SPR (RISONANZA PLASMONICA DI SUPERFICIE)	58
------------	---	-----------

2.6 ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE

2.6.1	Preparazione del campione	60
2.6.2	Purificazione degli estratti proteici	62
2.6.3	Determinazione della concentrazione proteica	62
2.6.4	Colorazione con nitrato di argento	62
2.6.5	Marcatura con i fluorofori	63
2.6.6	Separazione in prima dimensione: isoelettrofocalizzazione	63
2.6.7	Separazione in seconda dimensione: SDS-PAGE	64
2.6.8	Scansione delle immagini	64
2.6.9	Analisi differenziale	64
2.6.10	Prelievo degli “spot” proteici per l’identificazione	65
2.6.11	Analisi di spettrometria di massa	65

3. RISULTATI

3.1 SELEZIONE DI NUOVI ANTICORPI DAI REPERTORI MOLECOLARI

3.1.1	Isolamento di anticorpi contro il virus PVX	67
-------	---	----

3.2 CARATTERIZZAZIONE DEI FRAMMENTI scFv SELEZIONATI

3.2.1	Sequenza e specificità di legame degli anticorpi	68
-------	--	----

3.3	ESPRESSIONE DEGLI ANTICORPI scFv SELEZIONATI NEL CITOPLASMA E NEL PERIPLASMA DI CELLULE BATTERICHE	
3.3.1	Analisi dei frammenti scFv espressi nel periplasma di <i>E. coli</i>	71
3.3.2	Costrutti per espressione dei frammenti scFv selezionati nel citoplasma batterico.....	71
3.3.3	Studio delle condizioni riducenti	73
3.3.4	Analisi dei frammenti scFv espressi nel citoplasma di <i>E. coli</i>	73
3.4	ANALISI DELLE COSTANTI DI AFFINITA' ANTIGENE-ANTICORPO	
3.4.1	Studio dei parametri cinetici di interazione	76
3.5	ANALISI PROTEOMICA	
3.5.1	Preparazione del campione per elettroforesi bidimensionale	81
3.5.2	Disegno sperimentale per l'analisi DIGE ("two dimensional difference in gel electrophoresis")	84
3.5.3	Analisi differenziale.....	87
4.	DISCUSSIONE	91
5.	BIBLIOGRAFIA	99

1. INTRODUZIONE

1.1 ANTICORPI RICOMBINANTI E PROTEOMICA

1.1.1 Gli anticorpi: aspetti generali

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

Una grande rivoluzione è rappresentata dalla tecnica degli anticorpi monoclonali (Kohler e Milstein, 1975) che ha permesso di sviluppare sistemi per la produzione di anticorpi in quantità adeguate per varie applicazioni. Tale tecnica permette, infatti, di selezionare e produrre molecole anticorpali specifiche in seguito alla fusione di linee cellulari con linee tumorali. Pur tuttavia, il loro impiego è limitato, anche a causa della scarsa stabilità degli ibridomi (linee cellulari immortalizzate che producono anticorpi) e della derivazione delle molecole anticorpali da fusioni cellulari in cui ha preso parte una linea tumorale. Inoltre l'uso di anticorpi monoclonali in terapia umana non manca di fattori di rischio legati alla possibile contaminazione con DNA, virus o prioni potenzialmente capaci di trasmettere patologie ai pazienti. Inoltre, derivando generalmente da animali immunizzati, gli anticorpi da ibridomi potrebbero scatenare risposte immunogeniche quando impiegati sull'uomo.

Allo scopo di superare problemi di carattere strutturale e di espressione in organismi eterologhi sono stati creati, mediante ingegneria proteica, molecole anticorpali o frammenti anticorpali ricombinanti. Ad esempio, i geni codificanti per un anticorpo monoclonale possono essere clonati dalle cellule dell'ibridoma ed espressi in altri sistemi biologici, diversi da quello di provenienza, quali ad esempio batteri (Skerra & Pluckthun, 1998), lievito (Horwitz *et al.*, 1998), pianta (Benvenuto *et al.*, 1991) e cellule d'insetto (Haseman & Capra, 1990).

La particolare struttura a domini delle immunoglobuline ha permesso la costruzione di nuove molecole anticorpali in cui i domini responsabili del legame per l'antigene (Fv,

Fab) e delle funzioni effettrici (Fc) possono essere separati o scambiati con quelli di altri anticorpi (**figura 1**). In tal modo è stato possibile costruire anticorpi ricombinanti, o frammenti di questi, in grado di operare in ambienti diversi da quello di provenienza (Winter & Milstein, 1991).

Notevoli passi avanti sono stati fatti nell'utilizzo degli anticorpi dal momento in cui è stato possibile esprimerli in sistemi batterici (Skerra & Pluckthun, 1988). La produzione di molecole anticorpali in sistemi procariotici offre innumerevoli vantaggi, come la rapidità di crescita (che ne permette una veloce ed economica produzione su larga scala) e la facilità di manipolazione del materiale genetico. Inoltre le moderne tecniche di biologia molecolare consentono di studiare gli effetti di modifiche strutturali della molecola anticorpale mediante mutagenesi e di costruire repertori sintetici di anticorpi da cui selezionare molecole con specificità desiderata (Pluckthun, 1991).

Anticorpi ricombinanti

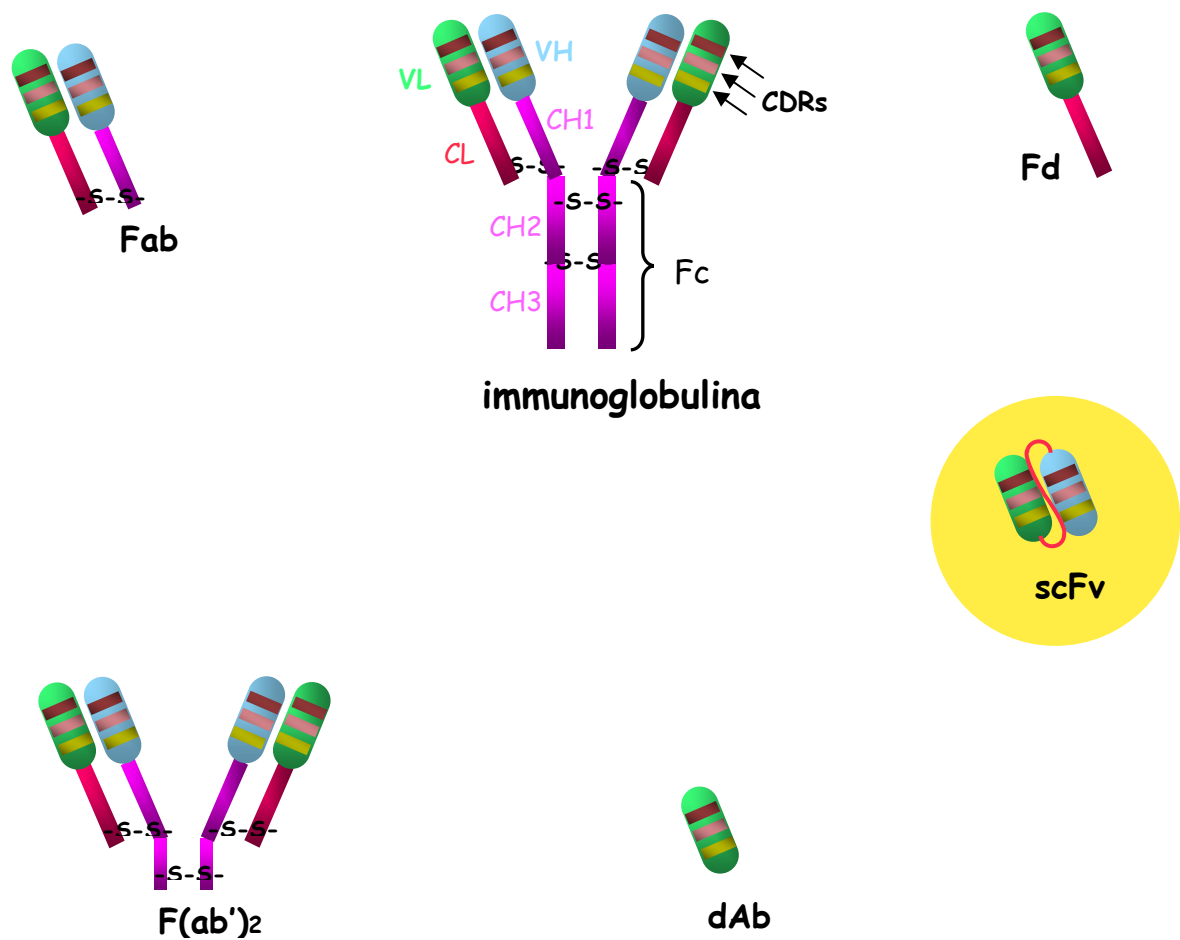


Figura 1. Schema di una struttura di una immunoglobulina completa e dei frammenti anticorpali ricombinanti Fab, F(ab)₂, Fd, dAb, scFv. Con le frecce sono evidenziate le tre CDR (“complementarity determining regions”), responsabili del riconoscimento dell’antigene. La regione anticorpale Fc, responsabile nella risposta immunitaria naturale delle funzioni effettrici, non viene generalmente inclusa nella costruzione di anticorpi ricombinanti perché non implicata nel legame con l’antigene.

1.1.2 I frammenti anticorpali “scFv”

Le immunoglobuline sono molecole di dimensioni relativamente grandi (150 K) e richiedono complessi meccanismi di ripiegamento e di assemblaggio all'interno della cellula per essere espresse in forma funzionale. Allo scopo di superare i problemi connessi all'espressione di molecole anticorpali intere in cellule eterologhe, sono stati creati frammenti anticorpali di più piccole dimensioni (12-50 K).

Tra questi i frammenti Fv, costituiti dall'associazione dei domini V_H e V_L, sono le più piccole molecole derivate dagli anticorpi in grado di mantenere inalterate le capacità di legame dell'antigene. D'altro canto essi mostrano una bassa affinità di associazione dei domini V_H e V_L a causa delle ridotte dimensioni delle due molecole e dell'assenza di legami covalenti, provocando un'inevitabile perdita di stabilità della molecola. Per ovviare a questo inconveniente sono stati costruiti frammenti ricombinanti a singola catena ('single-chain Fv', scFv) che sono, invece, risultati particolarmente stabili. In una molecola scFv le regioni V_H e V_L, responsabili del riconoscimento dell'antigene, sono legate covalentemente tra loro mediante un peptide flessibile ('linker') che lega l'estremità C-terminale della V_H all'estremità N-terminale della V_L, o viceversa (Bird *et al.* 1988; Huston *et al.*, 1988; Glockshuber *et al.*, 1990).

Caratteristica importante di un buon "linker" è la capacità di permettere alla molecola anticorpale una certa flessibilità necessaria per un efficace adattamento all'epitopo riconosciuto. Inoltre esso deve poter congiungere i due domini variabili senza interferire con il ripiegamento molecolare degli stessi e deve essere resistente alla degradazione proteolitica (Huston *et al.*, 1988). Sulla base di queste caratteristiche sono stati costruiti diversi "linker", il più stabile dei quali si è dimostrato quello costituito da un modulo di quattro glicine e una serina ripetuto tre volte (Gly₄Ser)₃ (Huston *et al.*, 1988), o da varianti con qualche sostituzione in questo motivo. La caratteristica essenziale deve essere quella di non contenere residui carichi allo scopo di rendere minime le interferenze con i residui della superficie dei domini V_H e V_L (Huston *et al.*, 1991). La maggior parte dei scFv non presenta particolari problemi di assemblaggio come dimostrato, in alcuni casi, dalla produzione stabile in sistemi di espressione batterica (Tavladoraky *et al.*, 1993; Biocca *et al.*, 1993; Duan *et al.*, 1994; Mhashilkar *et al.*, 1995). Il formato scFv offre inoltre dei notevoli vantaggi rispetto agli anticorpi

monoclonali, poiché oltre a mantenere una affinità di legame per l'antigene paragonabile a quella dell'anticorpo completo da cui deriva, non presenta problemi di assemblaggio e grazie alle piccole dimensioni della molecola (27-30 K) riesce a raggiungere bersagli inaccessibili a molecole più grandi. Oltre a ciò la mancanza della regione costante, non necessaria per la maggior parte delle applicazioni, riduce il livello di interazioni aspecifiche.

Un ulteriore vantaggio dei frammenti scFv è dato dalla possibilità di ottenere l'espressione sulla superficie di virus batterici (fagi) come prodotto di fusione con il gene che codifica la normale proteina capsidica virale ('phage display') (**figura 2**). Fagi che esprimono scFv con specificità diverse di legame costituiscono un repertorio molecolare.

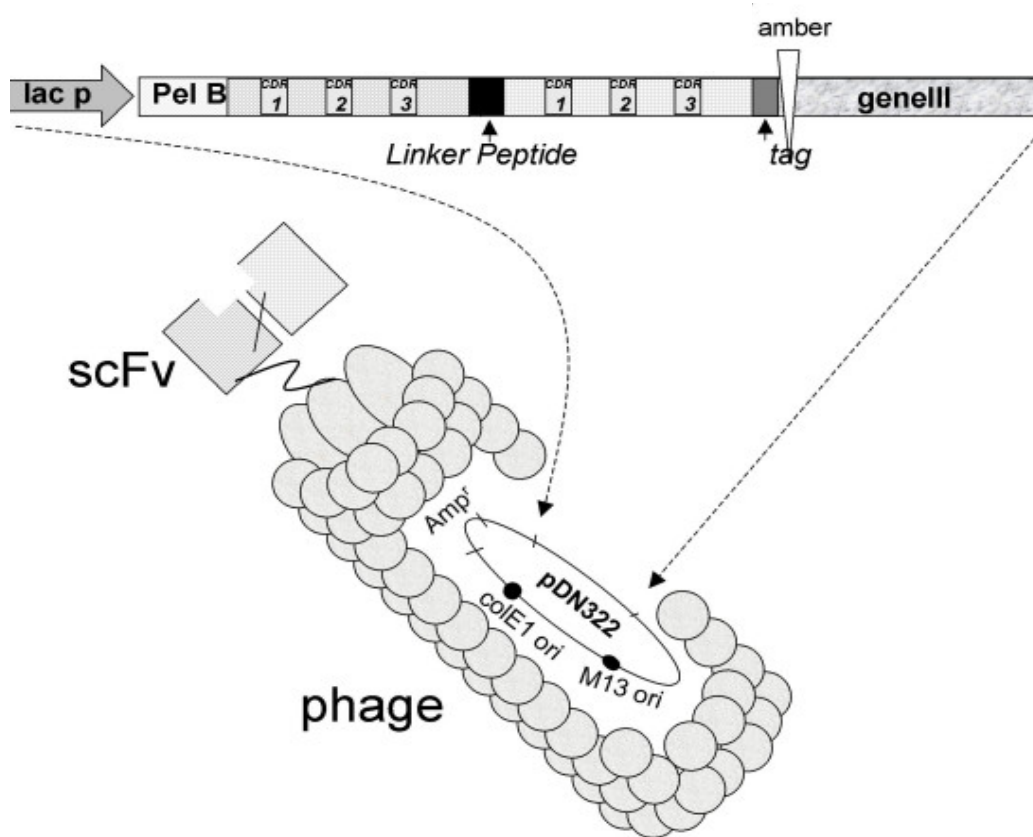


Figura 2. *'Phage display': schema di espressione di anticorpi scFv su fago*

1.1.3 Applicazioni degli anticorpi ricombinanti “scFv”

Gli anticorpi ricombinanti scFv, in virtù della loro alta affinità e specificità di legame e della loro facile manipolazione, trovano applicazione in molti campi biologici, chimici e medici (Harris *et al.*, 1999). Largo uso di scFv viene fatto in diagnostica e terapia anche sotto forma di molecole coniugate o fuse geneticamente ad un vasto assortimento di molecole come tossine, isotopi radioattivi, virus, proteine, enzimi, liposomi al fine di migliorare lo sviluppo e la formulazione di farmaci (Nakamura *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2005). La fusione dei frammenti scFv con citochine ha dato dei risultati davvero promettenti nella terapia contro il cancro, un esempio è il caso della fusione scFv-interleuchina 12 (IL-12) che ha mostrato essere più efficace dell'IL-12 da sola nel trattamento delle metastasi (Halin *et al.*, 2002). Frammenti anticorpali fusi ai lipidi nelle particelle liposomiche possono efficacemente indirizzare sia i farmaci citotossici verso le cellule tumorali che i vaccini verso le cellule dendritiche (Schnyder *et al.*, 2005; Brignole *et al.*, 2004; van Broekhoven *et al.*, 2004). L'impiego di anticorpi ingegnerizzati è sempre più in espansione per la necessità di trovare reagenti specifici per un ampio numero di nuovi 'biomarker' che si stanno scoprendo in seguito a studi di proteomica e di metabolomica. Questi anticorpi permetteranno di investigare e studiare nuove strutture e funzioni molecolari oltre che consentire nuove applicazioni per la diagnosi e per la terapia (Philipp, *et al.*, 2005).

Un limite all'applicazione degli anticorpi è rappresentato dalla scarsa penetrabilità di immunoglobuline complete in tessuti tumorali solidi e dalla conseguente distribuzione non uniforme che, in qualche caso, può provocare effetti tossici. Questi problemi sono stati in buona parte risolti dall'impiego di frammenti anticorpali di più piccole dimensioni e quindi con maggiore capacità di penetrazione dei tessuti. Frammenti a singola catena, ma anche altri anticorpi ricombinanti sono stati impiegati per un ampio numero di esperimenti pre-clinici e clinici nella terapia contro il cancro, oltre che come agenti diagnostici (Huston *et al.*, 1999). Un requisito fondamentale per un frammento scFv diretto contro un marcatore tumorale è una buona stabilità molecolare necessaria a garantire il mantenimento della funzionalità in circolo per numerose ore o giorni dopo l'iniezione, evitando la precipitazione o la degradazione.

Ottime prospettive applicative sono fornite dai multimeri dei frammenti scFv, come per esempio i 'diabodies' (55 K), molecole multivalenti di dimensioni intermedie, caratterizzati da una veloce penetrazione nel tessuto bersaglio, alta ritenzione di

specificità, ed una rapida ‘clearance’ ematica (Kenanova *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2005).

Un’applicazione con potenzialità terapeutica particolarmente promettente è stata l’espressione nella via secretoria di cellule umane di frammenti anticorpali diretti contro proteine del virus HIV (gp120). L’uso di anticorpi anti-gp120 causa la formazione di particelle virali non infettive (Chen *et al.*, 1994). Un’ulteriore applicazione dei frammenti scFv per la quale è richiesta un’alta stabilità molecolare è l’espressione nel compartimento citoplasmatico di cellule eucariotiche: ambiente riducente che ostacola la formazione dei ponti disolfuro intracatena dei domini V_H e V_L importanti per il corretto ripiegamento proteico. Anticorpi espressi all’interno della cellula, chiamati “intrabodies” (Biocca & Cattaneo, 1995), possono essere diretti verso differenti compartimenti come il citoplasma, il reticolo endoplasmatico, l’apparato di Golgi, i mitocondri, il nucleo, i lisosomi o i perossisomi, attraverso la fusione con opportune sequenze segnale. La possibilità di direzionare “intrabodies” permette di raggiungere, legare ed eventualmente interferire con la funzione di proteine direttamente nel compartimento cellulare in cui sono espresse.

Tra le molte applicazioni degli “intrabodies” vi è la possibilità di immunomodulare funzioni cellulari, ad esempio agendo sul ciclo riproduttivo virale (Marasco *et al.*, 1995). Di recente è stato dimostrato che anticorpi espressi intracellularmente, in grado di riconoscere e legare la proteina Vif del virus HIV1 sono in grado di bloccarne la replicazione e l’infettività (Aires da Silva *et al.*, 2004). Anche le patologie tumorali rappresentano un interessante campo di applicazione degli anticorpi intracellulari, per la loro capacità di inibire la proliferazione cellulare. Recentemente è stato infatti dimostrato che “intrabodies” specifici per la proteina H-RAS sono in grado di bloccare la trasformazione oncogenica in culture cellulari (Tanaka *et al.*, 2003), mentre “intrabodies” specifici per la ciclina E rappresentano un impiego promettente per il trattamento del cancro al polmone (Strube *et al.*, 2002).

Nel campo della neurobiologia, gli “intrabodies” possono inibire o prevenire la polimerizzazione e l’aggregazione delle proteine responsabili della patologia nelle malattie degenerative (Colby *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004). In particolare gli anticorpi diretti contro il precursore della proteina β -amiloide, coinvolta nella patogenesi della malattia dell’Alzheimer, si sono dimostrati in grado di inibire la produzione della proteina β -amiloide, sia bloccando il principale sito di taglio del precursore, sia prevenendo il passaggio della proteina nel reticolo endoplasmatico (Paganetti *et al.*,

2005). La tecnologia degli anticorpi intracellulari ha trovato applicazione anche nelle biotecnologie vegetali, permettendo di ottenere tramite l'espressione in piante transgeniche resistenza a virus fitopatogeni (Tavladoraki *et al.*, 1993; Boonrod *et al.*, 2004; Villani *et al.*, 2005).

Oltre ai campi di applicazione biotecnologico e biomedico frammenti scFv sono largamente adoperati nel settore alimentare, nella cosmetica, nelle produzioni industriali, nel settore ambientale (Huston *et al.*, 1999). Esempi di possibilità di utilizzo di ligandi ad alta affinità e specificità sono rappresentati dall'inibizione di enzimi che causano alterazioni negli alimenti, o dalla neutralizzazione di batteri orali mediante somministrazione di scFv in dentifrici o collutori, o ancora dalla individuazione di fattori ambientali presenti in bassissime concentrazioni (come biosensori) (Worn & Pluckthun, 2001).

1.2 SISTEMI PER LO STUDIO DELLE FUNZIONI PROTEICHE

1.2.1 L'indagine proteomica

All'interno della cellula le proteine si assemblano in strutture dinamiche e in complessi macromolecolari ed è principalmente come componenti di complessi che le proteine svolgono le loro funzioni cellulari. Le nuove tecnologie per lo studio del proteoma costituiscono dei preziosi strumenti di indagine sia per l'identificazione e la localizzazione di proteine di interesse, sia per studiare i livelli di espressione proteica e la funzione delle proteine.

La finalità della proteomica non è solo quella di creare un inventario di tutte le proteine codificate dal genoma e di analizzarne i livelli di espressione, ma riguarda anche aspetti più complessi come lo studio delle modifiche post-traduzionali e delle interazioni. Infatti, per comprendere pienamente i meccanismi cellulari non è sufficiente identificare la presenza di una proteina, ma devono essere delineate tutte le interazioni tra queste. Studi recenti testimoniano la complessità dei 'networks' di alcune interazioni proteiche, che rappresentano il più alto livello dell'organizzazione del proteoma (Uetz *et al.*, 2000; Gavin *et al.* 2002; Ho *et al.*, 2002). Negli ultimi anni nuovi approcci sono stati sviluppati nel campo della biologia molecolare, della proteomica e della bioinformatica, al fine di delineare il vasto campo delle interazioni proteina-proteina. La tecnologia attualmente più utilizzata in proteomica è l'elettroforesi bidimensionale (2D SDS-PAGE) per la separazione delle proteine, seguita dalla spettrometria di massa (MS) e dall'identificazione proteica attraverso la correlazione in database degli spettri di massa (**figura 3**). La caratterizzazione finale delle proteine richiede l'applicazione della bioinformatica, strumento che fornisce metodi sofisticati per rispondere a domande complesse di interesse biologico. L'integrazione di tutte le discipline è essenziale per il successo dell'esperimento proteomico. Il miglioramento delle singole metodologie ha portato ad una ricerca in larga scala rendendo possibile identificare ampie frazioni proteiche di un dato proteoma (Fleischmann *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 2000).

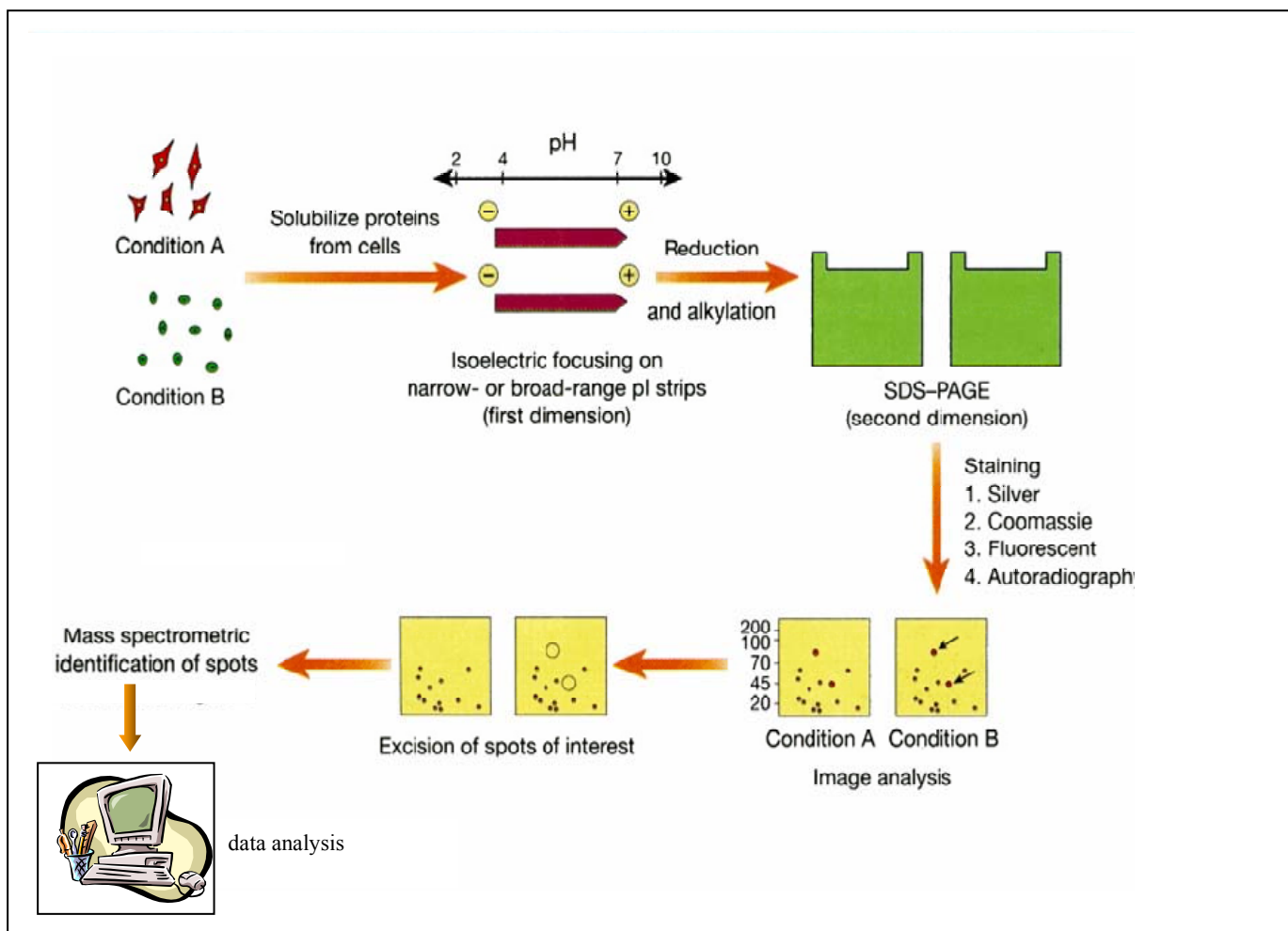


Figura 3. Schema del processo di analisi proteomica basato sull'elettroforesi bidimensionale, sulla spettrometria di massa e sulla elaborazione bioinformatica.

1.2.2 Il sistema del “doppio ibrido”

Tradizionalmente le interazioni proteiche sono state studiate mediante cromatografia di affinità proteina-proteina, immunoprecipitazione, sedimentazione e gel-filtrazione (Phizicky *et al.*, 1995). Pur tuttavia la velocità con cui vengono scoperte nuove proteine ha portato alla necessità di trovare nuovi metodi per l'identificazione di interazioni proteiche. Il metodo più conosciuto per isolare anticorpi ricombinanti funzionali nel citoplasma o studiare l'interazione binaria proteina-proteina è il metodo del “doppio ibrido” (Fields & Song, 1989) (**figura 4**). Questo metodo si basa sull'interazione molecolare nel citoplasma cellulare e può essere utilizzato per identificare i partner di interazione di una proteina d'interesse o per verificare un'interazione antigene-anticorpo. I vantaggi di questo sistema sono costituiti dalla facilità di esecuzione, dall'alta sensibilità, dal fatto che non richiede informazioni preventive sull'interattore e dalla possibilità di impiego avendo a disposizione soltanto il gene della proteina di interesse (Moranti & Valeri, 2001). Tale approccio è stato applicato anche nello studio dell'intero proteoma di un organismo per costruire una mappa di interazioni proteina-proteina (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001). Inoltre il “doppio ibrido” è un ottimo approccio per la selezione di frammenti anticorpali scFv che abbiano una buona funzionalità intracellulare, destinati a studi di immunomodulazione, ad applicazioni diagnostiche e terapeutiche in campo medico e ad analisi di genomica funzionale (Visintin *et al.*, 1999) (Pandey & Mann, 2000). Tramite questo saggio è possibile verificare l'efficienza dell'interazione antigene-anticorpo *in vivo*, per mezzo dell'attivazione di geni reporter, generalmente in cellule di lievito ma anche di mammifero (Visintin *et al.*, 1999).

Nonostante i successi applicativi, l'impiego del “doppio ibrido” di lievito presenta alcuni svantaggi, come la difficoltà di ottenere repertori ad alta complessità, legata ai limiti intrinseci di clonaggio in vettori di lievito. Questo problema è stato però parzialmente risolto attraverso una combinazione della tecnica del “phage display” (Visintin *et al.*, 1999) (descritta in dettaglio nel paragrafo 1.4.2). Un ulteriore limite è rappresentato, inoltre, dall'impossibilità di individuare interazioni che coinvolgono tre o più proteine e quelle che dipendono da modifiche post-traduzionali (Ito *et al.*, 2002). Ma lo svantaggio maggiore è causato da un significativo numero di falsi positivi (interazioni che non sono di origine biologica) (Uetz, *et al.*, 2002) dovuti al fatto che molte delle interazioni individuate potrebbero non essere correlate alle condizioni fisiologiche.

Il metodo del “doppio ibrido” rappresenta quindi un sistema ottimale per la caratterizzazione di interazioni binarie, ma non per l’analisi di complessi proteici e va pertanto integrato con approcci basati sulla spettrometria di massa che permettono di isolare grandi complessi proteici e di individuare ‘networks’ di interazioni tra proteine. D’altro canto anche questa integrazione di tecniche è condizionata dal fatto che l’approccio basato sulla spettrometria di massa permette di individuare complessi altamente abbondanti e stabili, a differenza del sistema ”doppio ibrido” che è particolarmente utile per le interazioni deboli e transienti.

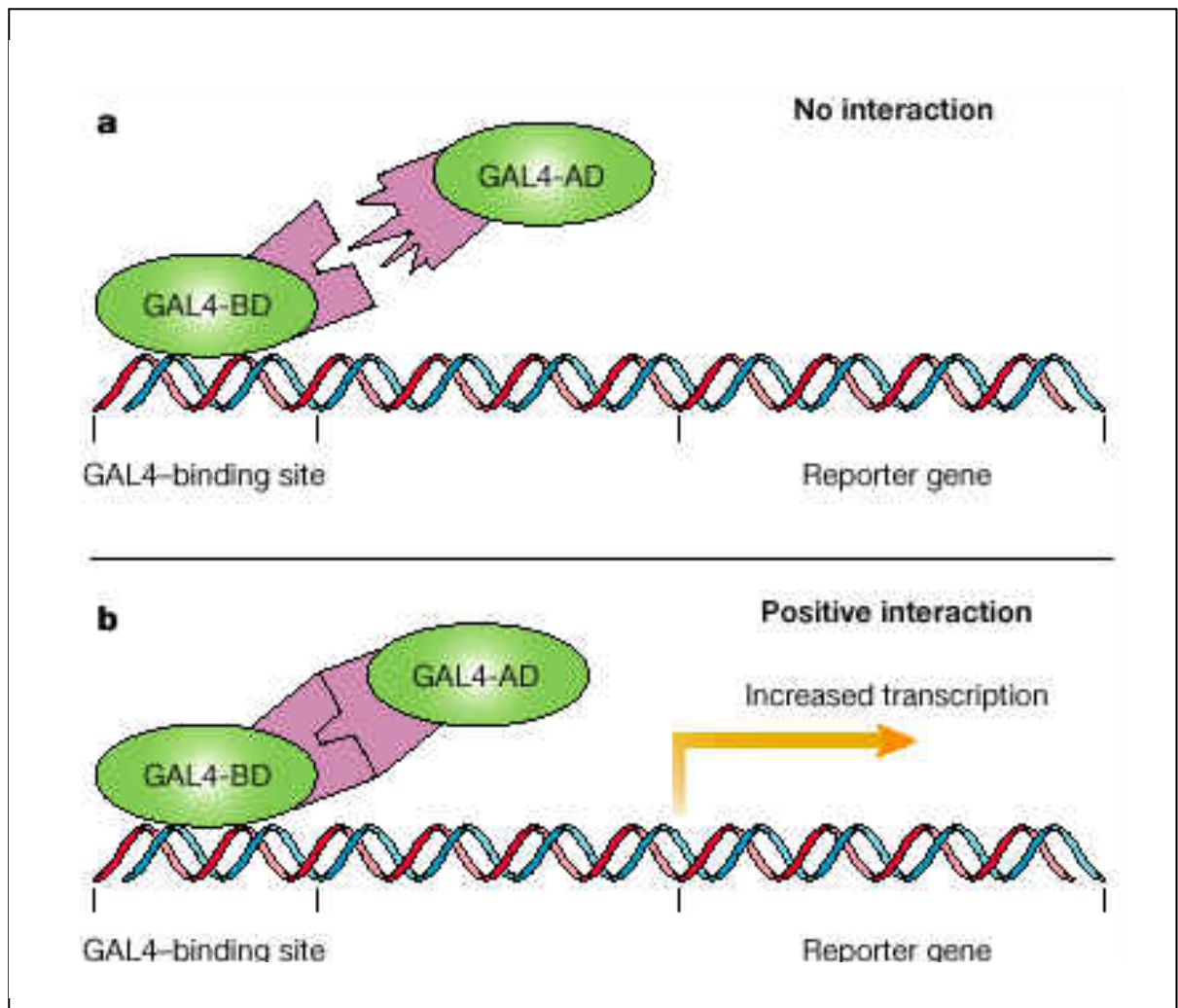


Figura 4. Il sistema del “doppio ibrido” si basa sui fattori di trascrizione, proteine modulari e quindi scomponibili. Un esempio è il fattore GAL4 di lievito che può essere diviso in due componenti: uno si lega al DNA (BD), l’altro attiva la trascrizione quando viene portato in prossimità del DNA (AD). Per lo studio dell’interazione antigene-anticorpo vengono preparati due costrutti in vettori indipendenti, per l’assemblaggio e l’espressione in lievito come prodotti di fusione. All’interno del citoplasma della cellula il dominio LexA-BD, fuso all’antigene, si lega al DNA. Se l’anticorpo riconosce l’antigene in questo compartimento il dominio AD viene avvicinato al DNA, promuovendo la trascrizione di entrambi i geni reporter di lievito, il gene per l’istidina e il gene LacZ, importanti per la crescita di lievito e per il rilevamento.

1.2.3 I “microarray” di proteine

Un approccio molto più diretto per un’identificazione globale delle attività biochimiche è costituito dai ‘microarray’ di proteine funzionali. Con questa tecnica insiemi di proteine o un intero proteoma sono sovra-espressi, purificati, distribuiti in un adeguato ‘array’ ed infine analizzati. Nei metodi più comuni le proteine sono legate alla superficie dei substrati mediante legami covalenti o per affinità. Le proteine legate sono analizzate per la specificità di legame o per l’attività enzimatica (**figura 5**). E’ stato dimostrato che è così possibile individuare le interazioni antigene-anticorpo, le attività delle chinasi e le interazioni proteiche con piccole molecole (MacBeath *et al.*, 2000).

Questi sistemi di analisi permettono di controllare le condizioni sperimentali rendendo possibile anche lo studio dell’effetto dovuto all’aggiunta di cofattori o inibitori. Un ulteriore vantaggio è che questo approccio consente anche l’esame di proteine meno abbondanti e può essere utilizzato per identificare i substrati degli enzimi come per esempio chinasi, fosfatasi, metil-trasferasi e proteasi.

Un esempio di impiego dei ‘microarray’ di proteomi per individuare interazioni proteina-proteina è costituito dall’impiego di calmodulina biotinilata su un chip su cui è stato immobilizzato il proteoma di lievito. Questo sistema ha permesso di isolare 39 proteine che interagiscono con la calmodulina, di cui trentatre mai identificate finora (Zhu *et. al.*, 2001).

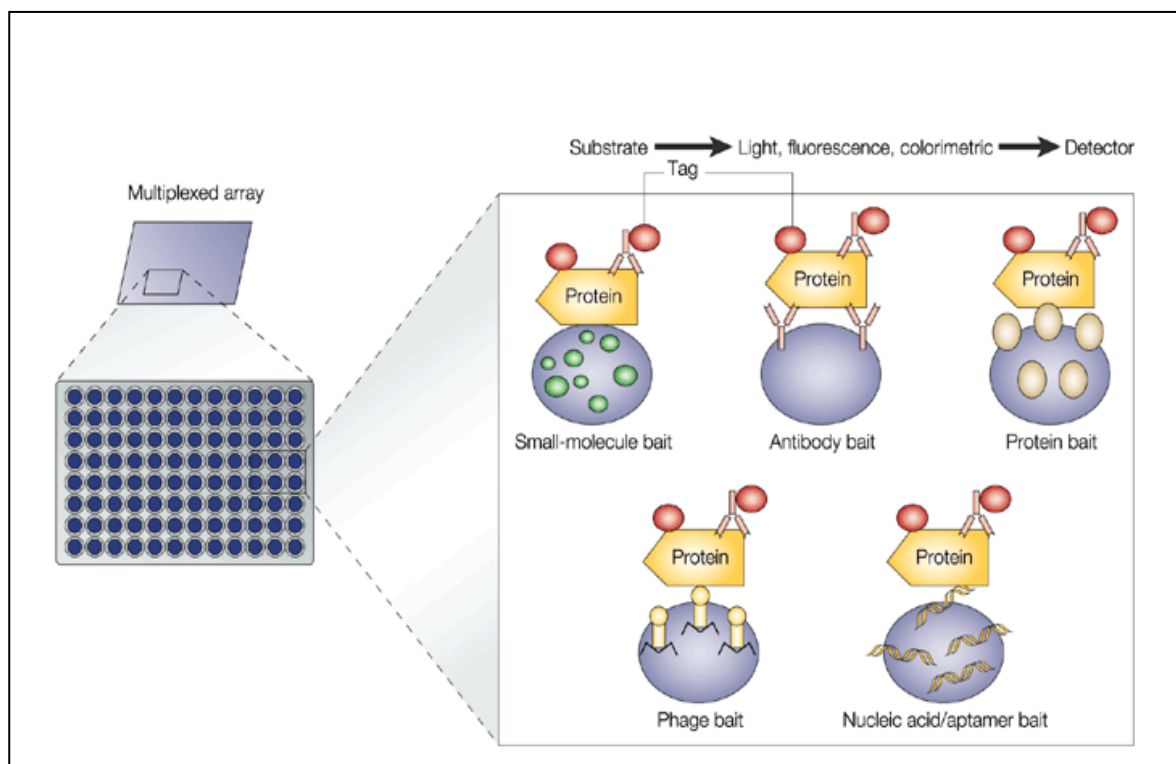


Figura 5. I microarray di proteine consistono di campioni proteici immobilizzati su una fase solida. La miscela di proteine contenente l'analita di interesse viene marcata. Le proteine di interesse sono rilevate mediante segnali di fluorescenza o di chemiluminescenza.

1.3 GLI “INTRABODIES”

1.3.1 L’immunomodulazione di funzioni cellulari

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

Gli anticorpi che riconoscono specificamente recettori solubili o associati a membrane, enzimi o proteine legate al DNA, possono interferire con la funzione di queste proteine generando dei complessi antigene-anticorpo o causando cambiamenti sterici nella struttura molecolare con conseguente perdita di funzionalità (Conrad *et al.*, 2001). Il legame di un anticorpo può essere utilizzato per neutralizzare direttamente il sito attivo di una proteina bersaglio. In questo caso essi agiscono da competitori o da inibitori dell’antigene. Possono anche agire in modo più indiretto interferendo con il normale traffico intracellulare dell’antigene.

Per realizzare tale tecnologia è importante che siano superati alcuni ostacoli. La maggior parte degli anticorpi perde funzionalità all’interno della cellula a causa della mancanza dei legami disolfuro che non si formano nell’ambiente riducente del citoplasma. Pertanto anticorpi ricombinanti stabili e funzionali nel citoplasma rappresentano una valida strategia per interferire con la funzione di molecole specifiche *in vivo* (**figura 6**). Inoltre per inibire funzioni enzimatiche è importante che gli anticorpi siano in grado di raggiungere e legare il sito attivo dell’enzima. L’uso di frammenti a singola catena scFv con queste caratteristiche può facilitare enormemente l’immunomodulazione di processi metabolici in molti organismi.

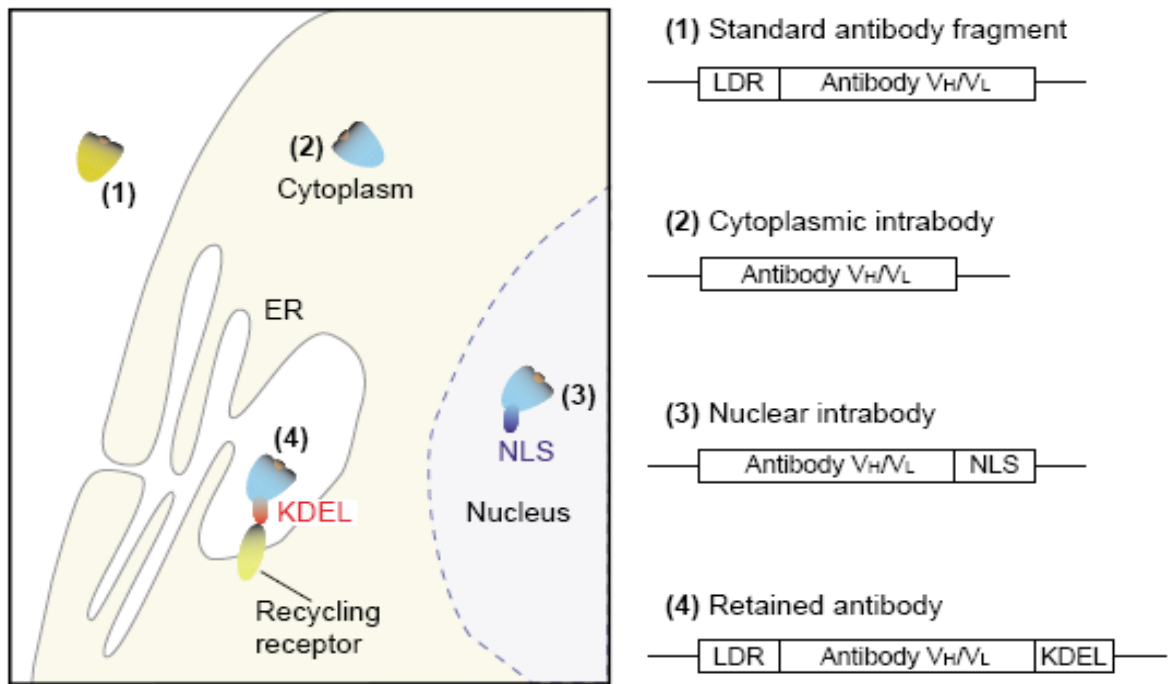


Figura 6. La localizzazione cellulare di un prodotto genico è controllata da una sequenza 'leader' (LDR) che permette di indirizzare l'anticorpo nel lume del reticolo endoplasmatico. Durante il passaggio nel reticolo il peptide LDR viene tagliato. Una volta nel lume, vari fattori assistono il corretto ripiegamento dell'anticorpo e catalizzano la formazione di ponti disolfuro intra- e intercatena che ne stabilizzano la struttura. L'anticorpo maturo quindi lascia il reticolo endoplasmatico ed è così libero nei fluidi extracellulari (1) o viene esposto sulla superficie delle cellule. Rimuovendo la sequenza 'leader' o sostituendola con un gruppo di aminoacidi più idrofilici, l'anticorpo viene trattenuto nel citoplasma della cellula (2). L'aggiunta di motivi di localizzazione subcellulare, come il segnale di localizzazione nucleare (NLS), si può dirigere l'anticorpo in particolari regioni o organelli (3). Alternativamente è possibile utilizzare segnali di ritenzione nel ER/Golgi (KDEL) che agganciano l'anticorpo alla membrana del reticolo, prevenendone la secrezione (4).

1.3.2 Difficoltà di espressione in ambiente citoplasmatico

Uno dei limiti principali nell'uso degli anticorpi è costituito dal fatto che sono proteine di tipo secretorio, pertanto se vengono indirizzate in compartimenti cellulari diversi dalla via di secrezione, possono incorrere in problemi di stabilità e ripiegamento, che portano alla perdita di funzionalità della molecola e alla sua degradazione. Per molte applicazioni è necessario disporre di anticorpi in grado di raggiungere, legare ed interferire con la funzione di proteine che sono espresse nel compartimento citoplasmatico. Il citoplasma è un ambiente caratterizzato da un potenziale redox, che impedisce la formazione di ponti disolfuro. Tali legami covalenti generalmente contribuiscono per circa 4-6 Kcal/mol alla stabilizzazione della conformazione proteica stabilizzando la struttura di ciascun dominio V_H e V_L (Creighton, 1986; Hinck *et al.*, 1996). Inoltre l'assenza di enzimi che assistono il ripiegamento molecolare, è causa principale di aggregati proteici insolubili che vengono rapidamente degradati dalla cellula.

Sono pochi gli esempi di anticorpi naturalmente dotati sia di un'elevata stabilità termodinamica *in vitro*, sia della capacità di essere espressi in forma funzionale nel compartimento citoplasmatico ('intrabodies'). Nel caso dell'espressione come anticorpi intracellulari, la versione più usata è quella di frammento a singola catena (scFv), questa classe di anticorpi presenta due ponti disolfuro intracatena rispettivamente nei domini V_H e V_L . Questa caratteristica ne limita l'utilizzo come interferenti molecolari *in vivo* per la difficoltà di ottenere una espressione funzionale nel citoplasma. I ponti disolfuro intracatena sono molto conservati, quindi critici per la stabilità dei frammenti scFv (Proba *et al.*, 1997; Glockshuber *et al.*, 1992). Solo i frammenti intrinsecamente stabili sono capaci di ripiegarsi correttamente ed in quantità sufficienti per essere attivi come "intrabodies". La maggior parte dei scFv espressi nel citoplasma mostrano bassi livelli di espressione, limitata emi-vita e bassa funzionalità (Biocca *et al.*, 1995; Martineau *et al.*, 1998; Visintin *et al.*, 1999). Altri sono attivi nel citoplasma a temperature basse (20°C) ma non a 30°C, impedendo molte applicazioni *in vivo* (Visintin *et al.*, 1999).

1.3.3 Tentativi di ottenere gli “intrabodies”

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

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

Alternativamente sono state applicate strategie di evoluzione basate sulla mutagenesi casuale di un frammento scFv tipicamente con buona affinità per l'antigene bersaglio, ma con bassa stabilità molecolare. Il repertorio risultante è quindi sottoposto a selezione in condizioni opportune per riuscire ad ottenere frammenti con aumentata stabilità rispetto al frammento di origine. Le tecniche di selezione adottate a questo scopo si basano su “biopanning” su fago (Benhar *et al.*, 2000), “ribosome display” (Lipovsek & Pluckthun, 2004) o “yeast display” (Feldhaus *et al.*, 2003). Attraverso queste procedure, messe a punto a seconda delle esigenze sperimentali, è stato possibile selezionare in modo specifico scFv con proprietà modificate in termini di affinità, stabilità, tossicità o livelli di espressione.

E' inoltre possibile combinare approcci di evoluzione e razionali per aumentare ulteriormente la stabilità dei scFv (Knappik & Pluckthun, 1995; Forsberg *et al.*, 1997; Nieba *et al.*, 1997). Altri approcci prevedono l'espressione di anticorpi già esistenti, per potenziarne la stabilità e la solubilità intracellulare, come proteine di fusione per esempio con elementi strutturali come il frammento Fc o con la proteina di *E. coli* che lega il maltosio (Stube *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1999). In quest'ultimo caso è stato dimostrata l'aumentata solubilità nel citoplasma del 60% rispetto al frammento scFv non fuso (Shaki-Loewenstein *et al.*, 2005). Comunque, nonostante gli sforzi scientifici di numerosi gruppi di ricerca, sono ancora pochi gli anticorpi in grado di interferire funzionalmente con antigeni espressi nel compartimento citoplasmatico.

Tra i rari esempi vi è un mutante scFv dell'anti β -galattosidasi umana capace di accumularsi ad alti livelli nel citoplasma di *E. coli*. Studi comparati di questo mutante con l'anticorpo originario hanno evidenziato livelli di espressione comparabili in forma attiva ed ossidata nel periplasma, mentre se un agente riducente come il DTT veniva

aggiunto al mezzo di crescita, solo il scFv mutante era ancora capace di ripiegarsi (Martineau *et al.*, 1999).

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

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

Un approccio alternativo si basa sull'impiego di anticorpi intrinsecamente stabili da utilizzare come struttura molecolare per ottenere, mediante mutagenesi, molecole con nuove specificità di legame. Il limite principale di questa tecnica è legato alla difficoltà di preservare le caratteristiche di stabilità della molecola di partenza dopo le operazioni di ingegneria proteica. Risultati molto promettenti sono però stati ottenuti impiegando un frammento anticorpale scFv, chiamato scFv(F8), con qualità molecolari particolarmente apprezzabili (vedi paragrafo 1.5.1).

1.3.4 Gli "intrabodies" e la proteomica

Negli ultimi anni la crescita esplosiva della genomica e delle metodologie proteomiche ha permesso di sviluppare nuovi sistemi per lo studio delle funzioni delle proteine e delle interazioni proteina-proteina in molti sistemi biologici. In realtà, poiché le informazioni derivate dalla sequenza del DNA permettono di avere solo un'immagine statica delle potenzialità di espressione di una cellula, si è resa necessaria l'integrazione delle informazioni della genomica con quelle della proteomica. La proteomica, infatti, permette di correlare l'enorme quantità di sequenze geniche con i rispettivi prodotti

proteici e le interazioni tra questi mediante un'analisi di confronto tra cellule in condizioni normali e alterate.

Uno dei problemi fondamentali nella genomica funzionale è trovare tecniche generali che permettessero di studiare le interazioni proteina-proteina o proteina-DNA, che a loro volta fanno parte di sistemi di interazione proteica più complessi. Gli anticorpi espressi intracellularmente si sono dimostrati un valido strumento per lo studio di numerosi processi biologici, offrendo nuove opportunità per l'analisi di funzioni di un vasto numero di molecole (Biocca & Cattaneo, 1995; Richardson & Marasco, 1995). Gli “intrabodies” possono essere infatti impiegati per l'identificazione e la localizzazione di proteine *in vivo* oltre che per interferire con specifiche funzioni proteiche correlate a condizioni fisio-patologiche di interesse. Dall'analisi dell'interazione anticorpo-antigene è inoltre possibile ottenere informazioni biochimiche dirette sulla proteina riconosciuta e sui suoi partner di legame.

Gli “intrabodies” hanno pertanto un grande valore applicativo per studi di proteomica funzionale e di interazione proteina-proteina. Nuove strategie sperimentali hanno consentito la selezione di anticorpi in condizioni di espressione intracellulare. La tecnologia IACT (Intracellular Antibody Capture Technology), basata sul sistema del doppio ibrido, ha permesso l'identificazione rapida ed efficace di nuove interazioni antigene-anticorpo nel compartimento intracellulare, oltre che l'identificazione *in vivo* di epitopi riconosciuti selettivamente da anticorpi intracellulari (Visitin *et al.*, 2002). La IACT rappresenta quindi la tecnologia elettiva per studi in larga scala di ‘knockout’ di proteine, e quindi per studi di genomica funzionale.

Sfruttando questa tecnologia, è stato costruito un repertorio (SLINT) di scFv espressi direttamente nel citoplasma di lievito in un formato tale che i complessi antigene-intrabody possano essere isolati direttamente dalle sequenze geniche senza manipolazioni delle sequenze proteiche corrispondenti (Visitin *et al.*, 2004). L'isolamento da questo repertorio di diversi “intrabodies” specifici per varie proteine dimostra la valenza della tecnologia degli “intrabodies” per studi in larga scala dell'organizzazione funzionale del proteoma di una cellula

1.3.5 Applicazioni in pianta

Anticorpi o frammenti di anticorpi espressi in pianta sono chiamati ‘plantibodies’. Questi possono essere impiegati per applicazioni *ex planta*, come strumenti per la diagnostica o per la terapia medica, ma anche per applicazioni *in planta*, per la manipolazione di processi cellulari o per conferire resistenza a patogeni (**figura 7**). Inoltre i ‘plantibodies’ possono non solo interferire con enzimi o proteine regolatorie ma sono anche in grado di prevenire la formazione di complessi proteici ed interferire con le interazioni proteina-proteina.

L’espressione di frammenti scFv nell’apoplasto, nel reticolo endoplasmatico e nel citoplasma è stata dimostrata evidenziando il successo dell’immunomodulazione in pianta (de Jaeger *et al.*, 2000).

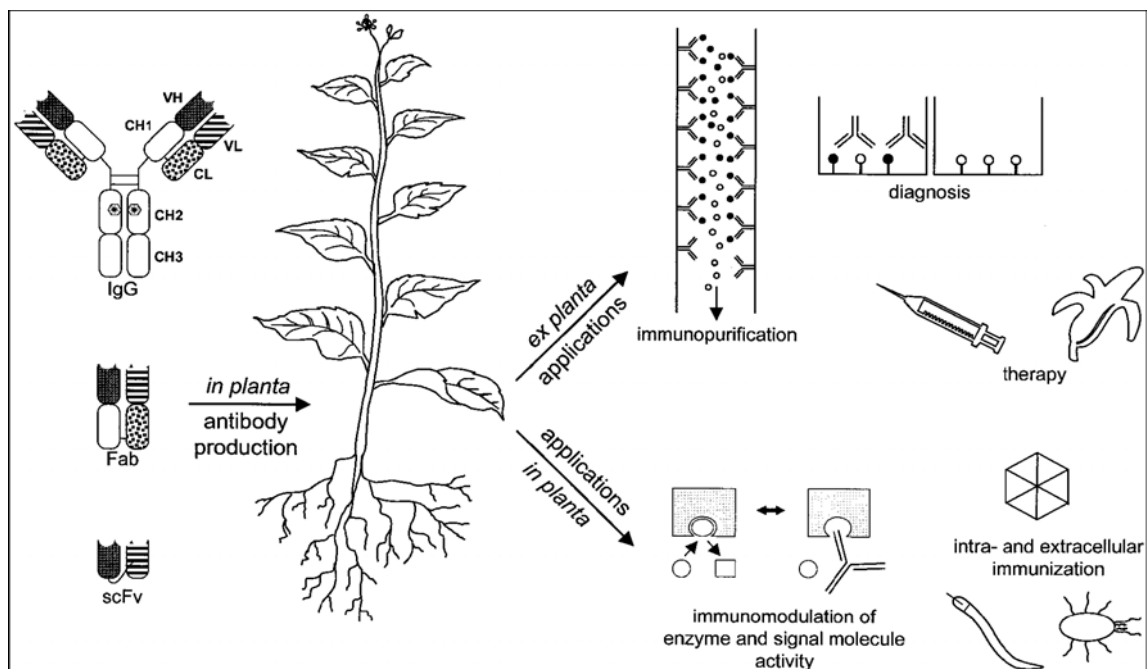


Figura 7. Applicazioni di anticorpi e di frammenti anticorpali prodotti in pianta. Le piante possono essere modificate geneticamente per la sintesi di anticorpi al fine produttivo (produzione ‘*ex planta*’) oppure per ottenere resistenza ai patogeni (immunizzazione intra– e extracellulare) o per manipolare il metabolismo della pianta stessa, come per esempio l’immunomodulazione di enzimi o l’attività di molecole segnale (produzione ‘*in planta*’).

I potenziali meccanismi che sono alla base della modulazione dell'attività di una proteina o di una molecola segnale sono differenti (**figura 8**).

Il primo esempio di 'mistargeting' è stato applicato per immunomodulare l'attività dell'acido abscissico (ABA), fitormone responsabile di diversi processi di sviluppo e fisiologici, come per esempio la regolazione dello stato dell'acqua mediante il controllo della chiusura degli stomi. L'anticorpo specifico, in formato scFv, per l'ABA è stato prodotto in piante transgeniche di tabacco ed accumulato ad alti livelli nel reticolo endoplasmatico (Artsaenko *et al.*, 1995). Queste piante hanno mostrato un aumento dei ritmi di traspirazione, causati da un'incapacità di chiudere gli stomi. Molto probabilmente gli anticorpi scFv accumulati ad alte concentrazioni prevengono il trasporto dell'ormone e la sua interazione con i recettori nelle cellule degli stomi. Sono stati anche espressi anticorpi scFv nel seme per modulare i livelli e l'attività dell'ormone ABA affinché fossero tessuto e tempo specifici (Philips *et al.*, 1999). Un altro esempio di immunomodulazione dell'attività di fitormoni è rappresentato dall'espressione di anticorpi scFv in piante di tabacco contro le giberelline A19 e A24 precursori delle giberelline biologicamente attive A1 e A4. Le linee transgeniche che hanno accumulato alti livelli di scFv nel reticolo endoplasmatico hanno mostrato bassi livelli di espressione dell'ormone A1 causati dall'inibizione del metabolismo dei precursori delle giberelline (Shimada *et al.*, 1999).

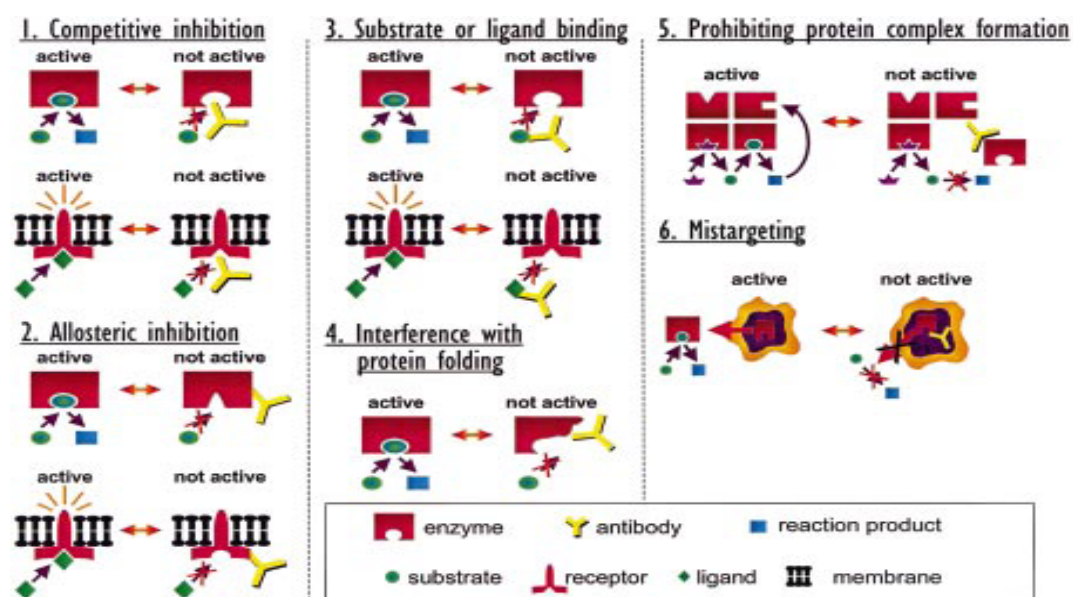


Figura 8. Potenziali meccanismi per la modulazione in vivo di proteine o di molecole segnale mediata da anticorpi

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

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

Un esempio interessante di questa applicazione è rappresentato dalla modulazione dell'infezione virale causata dal virus CMV (Cucumber Mosaic Virus). Sono stati espressi nel citoplasma di piante transgeniche di pomodoro anticorpi scFv specifici per la proteina di rivestimento del virus (**figura 9**). Gli anticorpi diretti contro il CMV, sono il primo esempio di molecole selezionate dalla (vedi paragrafo 1.5.4) ad essere state utilizzate come intrabodies. In queste piante il frammento scFv si lega al virus nelle foglie inoculate e, prevenendo il movimento virale a lunga distanza, inibisce la replicazione virale *in vivo* (Villani *et al.*, 2005).

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



Figura 9. Confronto dei fenotipi di pomodoro transgenico e 'wild type', infettati con il virus CMV

1.4 REPERTORI MOLECOLARI: LE “PHAGE DISPLAY LIBRARIES”

1.4.1 Aspetti generali

Un repertorio molecolare è un insieme di differenti varianti molecolari di strutture proteiche o peptidiche.

L'utilizzo dei repertori molecolari sta diventando uno strumento indispensabile, grazie alle informazioni sempre più dettagliate di interi genomi e dei relativi proteomi, nello studio dei meccanismi che determinano la formazione di strutture complesse in seguito ad interazione proteina-proteina. Inoltre tali repertori offrono la possibilità di identificare selettivamente proteine specifiche da vasti e complessi assortimenti proteici quali sono i campioni biologici. Questa tecnologia, pertanto, permette di studiare eventuali modificazioni post-traduzionali e di distinguere forme proteiche con ripiegamento alterato, spesso associate a condizioni patologiche. A questo scopo sono state realizzate vaste collezioni di peptidi/proteine e sviluppate tecniche selettive che permettono di isolare da queste collezioni ligandi specifici diretti contro bersagli molecolari di interesse.

Una delle metodologie maggiormente usate nella costruzione dei repertori molecolari è basata sull'uso dei fagi filamentosi che infettano *Escherichia coli* (batteriofagi).

E' infatti possibile inserire sequenze aminoacidiche in regioni “tolleranti” delle proteine strutturali di alcuni batteriofagi, senza alterare l'infettività virale. Il vantaggio che questo sistema sperimentale, detto del “phage display”, offre è la possibilità di associare nella stessa particella fagica il fenotipo, rappresentato dalla proteina/peptide esposta sulla superficie virale, e il relativo genotipo, incluso nel genoma del fago. Ciò permette, una volta isolato un fago in virtù delle sue caratteristiche di legame, di risalire direttamente al genotipo, semplificando le procedure di clonaggio. Le molecole così selezionate possono poi essere espresse in forma solubile in fusione con opportuni peptidi ‘tag’ che ne permettono una rapida identificazione e purificazione.

La tecnologia del ‘phage display’ ha portato alla costruzione di molti repertori molecolari interamente *in vitro*, da cui sono stati selezionati anticorpi ad alta affinità. Alcuni di questi repertori sono stati costruiti fondendo oligopeptidi a sequenza casuale all'amino-terminale della proteina pVIII del capsido del batteriofago filamentoso f1 (Felici *et al.*, 1991), all'amino-terminale della proteina pVI del batteriofago filamentoso phi Lf (Hufton *et al.*, 1999) o al carbossi-terminale della proteina D del batteriofago

lambda (Sternberg & Hoess, 1995). Attraverso una operazione di “setacciamento” (“biopanning”), che prevede una serie ripetuta di cicli di selezione, di eluizione e di amplificazione, è possibile isolare fagi che presentano sul capsido peptidi in grado di interagire con una specifica proteina bersaglio (anticorpo, recettore, enzima ecc.). Questa tecnologia è stata utilizzata anche per studiare le interazioni molecolari che sono alla base della trasduzione di segnali extracellulari (Dente *et al.*, 1997) per determinare la specificità di riconoscimento di domini proteici (Vaccaro *et al.*, 1997) e, più in generale, per isolare peptidi capaci di legare in modo specifico proteine ed acidi nucleici (Meth *et al.*, 1993).

Una delle applicazioni di maggior successo del “phage display” è rappresentata dalla costruzione di repertori di anticorpi ricombinanti. Queste ampie collezioni di varianti anticorpali (nell’ordine di complessità di 10^8 - 10^{10}) “mimano” la variabilità del sistema immunitario animale, fornendo la possibilità di selezionare molecole ad alta affinità e specificità in modo molto più semplice, economico ed eticamente accettabile rispetto al sistema classico di isolamento di immunoglobuline attraverso l’immunizzazione di animali (Marks *et al.*, 1992).

L’esposizione sulla superficie di fagi filamentosi di frammenti di anticorpi (McCafferty *et al.*, 1990; Barbas *et al.*, 1991; Breitling *et al.*, 1991; Garrard *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991), grazie alla fusione della proteina minore di superficie (pIII) del fago M13, ha fornito un potente mezzo per selezionare anticorpi con predefinite specificità di legame da repertori molecolari di geni V, codificanti i domini variabili delle immunoglobuline (Winter *et al.*, 1994). Partendo da repertori derivati da geni V, provenienti da topi immunizzati e costituiti da combinazioni casuali catena pesante (V_H)-catena leggera (V_K o V_L), sono stati isolati frammenti anticorpali ad alta affinità di legame (Clackson *et al.*, 1991). Infatti la variabilità dei repertori anticorpali può essere ulteriormente aumentata mediante riarrangiamenti dei geni V *in vivo*, basata sull’assortimento casuale di geni V_H e V_K o V_L che favorisce la possibilità di isolare ligandi con buona affinità (Marks *et al.*, 1991).

Una strategia alternativa *in vitro* permette di introdurre variabilità a livello delle CDR₃ (‘complementarity determining region’ 3) mediante mutagenesi casuale per PCR nei domini variabili sia delle catene pesanti che delle catene leggere (Hoogenboom e Winter, 1992).

I repertori fagici presentano un particolare vantaggio quando si rendono necessari ligandi specifici difficili da ottenere attraverso l’immunizzazione, ad esempio contro

antigeni “self” (Griffiths *et al.*, 1993; Marks *et al.*, 1993) o proteine del lumen del reticolo endoplasmatico (Nissim *et al.*, 1994).

1.4.2 Il principio del “phage display”

Molte differenti tipologie di ligandi (proteine, peptidi, frammenti anticorpali) possono essere clonati nel genoma fagico come fusione con il gene che codifica una proteina fagica di superficie (pIII, pVIII) (**figura 10**). La scelta della proteina capsidica è dettata principalmente dal numero di copie della proteina di interesse che si vogliono esporre su fago (circa 2700 copie per fago nel caso della pVIII, contro le 5 copie al massimo per fago nel caso della pIII). La fusione con la proteina maggiore di rivestimento permette la selezione di proteine con basse affinità di legame (è questo il caso ad esempio di repertori peptidici espressi su fago), mentre fusioni con la proteina pIII permettono di selezionare proteine dotate di elevate affinità di legame (ad esempio da repertori di esposizione di frammenti anticorpali). Peptidi o proteine di interesse, espresse come prodotti di fusione con le proteine fagiche, sono assemblate nel batterio durante l'infezione ed esposte sulla superficie dei fagi maturi.

La connessione tra genotipo e fenotipo del ligando permette l'arricchimento in fagi specifici, mediante la selezione su bersagli molecolari immobilizzati su supporti adeguati (tubi di plastica, membrane, microsfele, ecc...). E' possibile anche effettuare la selezione con l'antigene libero in soluzione, ad esempio utilizzando l'antigene biotinilato. In questo caso i fagi legati all'antigene possono essere recuperati mediante biglie magnetiche rivestite con streptavidina. Tale strategia permette di selezionare anticorpi che legano l'antigene in soluzione nella sua forma nativa. Solo i fagi che espongono ligandi con affinità per il bersaglio di interesse vengono trattiene, mentre quelli aspecifici vengono eluiti attraverso lavaggi. I fagi leganti vengono recuperati ed utilizzati per reinfectare batteri che vengono fatti crescere per un ulteriore arricchimento (**figura 11**).

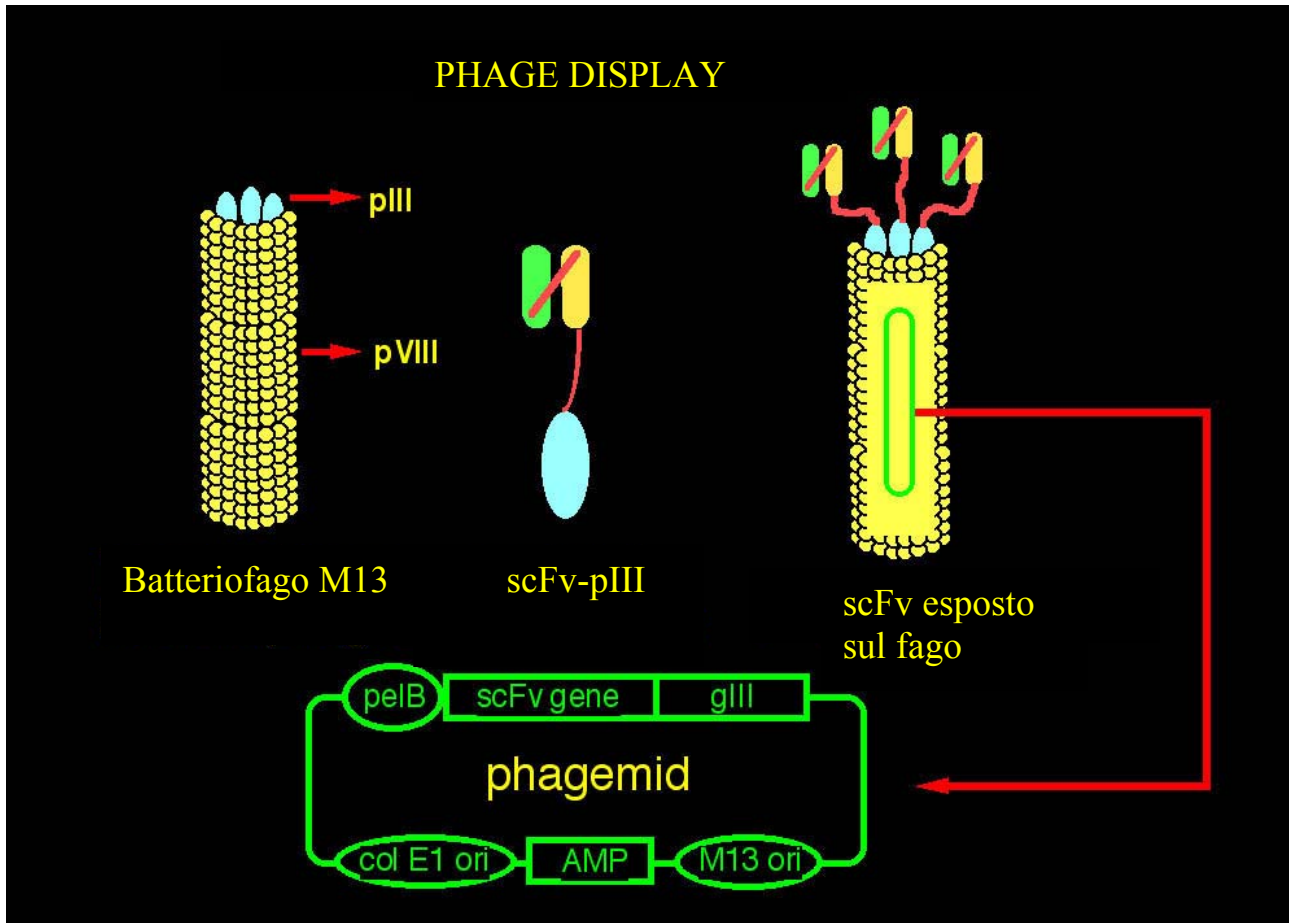


Figura 10. Frammenti scFv espressi sulla superficie del fagoM13 come prodotti di fusione con la proteina capsidica pIII. Una volta che un anticorpo è stato isolato per la specificità di legame con l'antigene, è possibile risalire direttamente al suo genotipo in tempi brevi e senza ulteriori procedure di clonaggio.

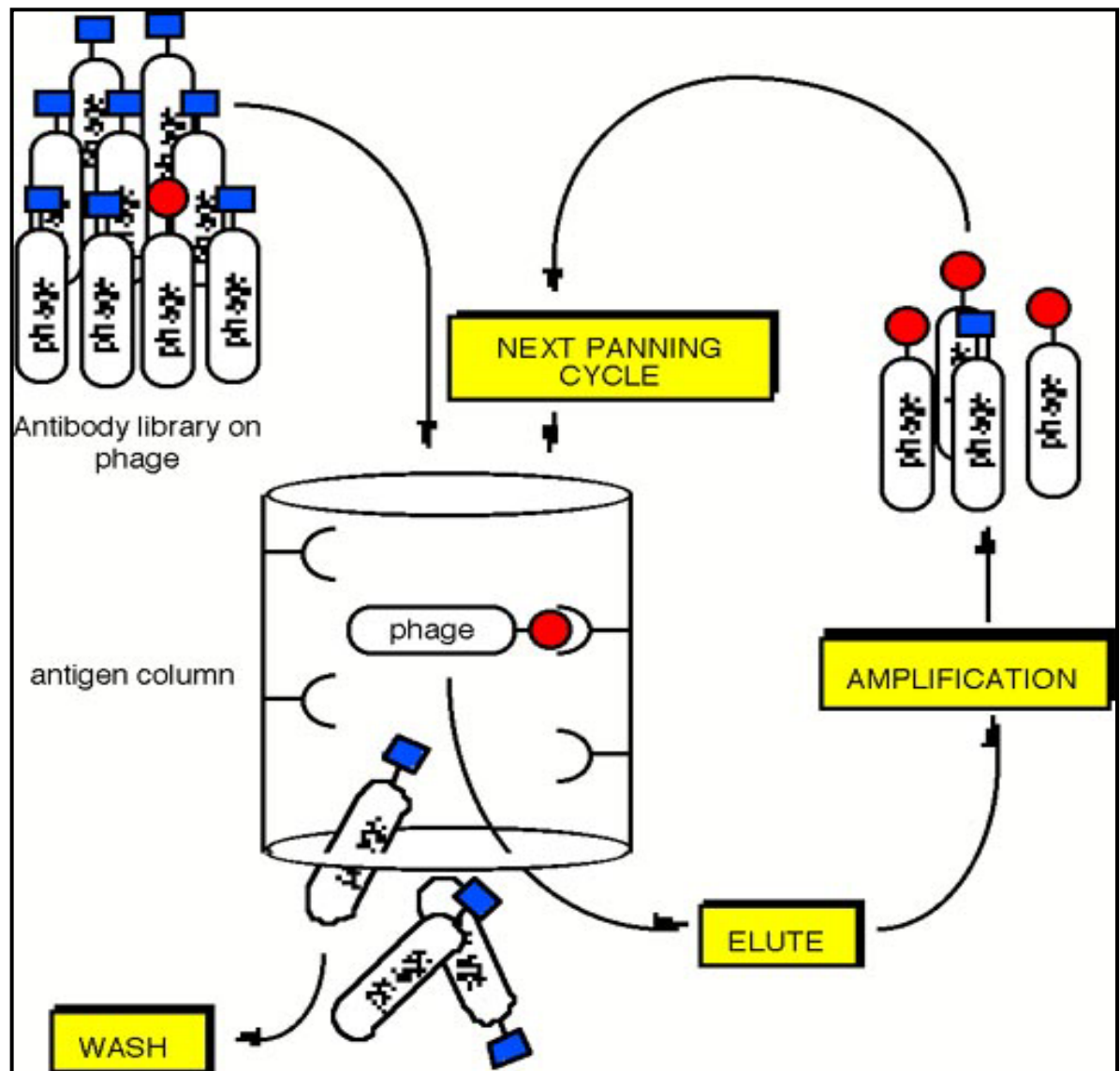


Figura 11. Schema di “biopanning” di un repertorio in “phage display”

1.4.3 Repertori di anticorpi sintetici

Per la costruzione di un repertorio di anticorpi sintetici, i geni codificanti per i domini variabili V, vengono assemblati introducendo variazioni casuali in posizioni definite delle regioni “complementarity determining regions” (CDRs), anse ipervariabili in cui è concentrata la maggior parte della diversità. In particolare le CDR₃ occupano una posizione centrale nella formazione del sito di legame e, sulla base di studi di struttura molecolare, è stato dimostrato che queste corrispondono alle regioni maggiormente implicate nel riconoscimento dell’antigene. Questo dato è anche confermato dalla maggior variabilità registrata per le CDR₃ degli anticorpi noti, rispetto alle altre CDR, indice questo di maggior adattamento all’epitopo molecolare da riconoscere. Per questa ragione le CDR₃ costituiscono il bersaglio principale per introdurre diversità nei repertori sintetici. E’ comunque possibile migliorare l’affinità degli anticorpi ottenuti da una prima selezione, attraverso la successiva modifica casuale delle CDR₁ e/o delle CDR₂. Questo permette di ottenere nuovi “sotto-repertori molecolari”, da cui è possibile selezionare molecole con maggiore affinità di legame che meglio si adattano all’epitopo riconosciuto (Garrard & Henner, 1993; Soderlind *et al.*, 1995).

Altri sistemi per aumentare l’affinità di anticorpi selezionati da repertori prevedono cicli di “chain shuffling” (Marks *et al.*, 1992) o mutagenesi puntiforme (Hawkins *et al.*, 1992), in modo da ottenere ligandi specifici e con alta affinità, perfino superiore a quella di molecole prodotte da un sistema immunitario. D’altro canto repertori sintetici di più recente costruzione, in virtù dell’uso di tecniche di clonaggio e di sistemi di trasformazione più efficienti, hanno raggiunto livelli di complessità particolarmente alti (vicini a 10^{10}) (Griffiths *et al.*, 1994). Questo ha permesso di ottenere anticorpi con ottima affinità anche senza ricorrere ad ulteriori passaggi di miglioramento di affinità. Esistono comunque limiti fisici nell’arricchimento che sono legati alla procedura di selezione e che condizionano sia la grandezza che la diversità genetica di un repertorio. Una seconda generazione di repertori sono stati costruiti dalla società MorhoSys (Hoogenboom *et al.*, 1998), usando segmenti di geni V basati sulle strutture canoniche che rappresentano tutte le sottoclassi ufficialmente riconosciute (Kabat *et al.*, 1991) in modo da incorporare solo le strutture opportunamente espresse. Un altro esempio è legato all’idea di combinare complementarietà e diversità di una “library” primaria di anticorpi (“germline”) e una secondaria (ipermutazioni somatiche) in un unico repertorio di anticorpi su fago. Questo può dar luogo ad un “super repertorio” che

contiene anticorpi con maggiore affinità di quelli che producono naturalmente le cellule B (Tomlinson *et al.*, 1996; Hoogenboom, 1997).

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

1.4.4 Il repertorio "ETH"

La library 'ETH' è un esempio di repertorio molecolare di anticorpi sintetici ad alta funzionalità, costituito da $6 \cdot 10^8$ cloni indipendenti, la cui funzionalità è stata verificata sottoponendo questa a cicli di "biopanning" contro molti antigeni biologicamente rilevanti (Pini *et al.*, 1998). Nella costruzione del repertorio in forma scFv sono stati utilizzati i geni di due linee germinali umane DP47 per la V_H e DPK22 per la V_K. Questi sono stati modificati introducendo variabilità a livello di quattro posizioni aminoacidiche nella CDR₃ della V_L e di altre quattro posizioni nella CDR₃ della V_H (**figura 12**). Anche le dimensioni delle CDR₃, naturalmente variabili, sono state opportunamente progettate per questo repertorio in modo da rientrare nella lunghezza media delle strutture canoniche degli anticorpi. Il vantaggio che deriva da dimensioni contenute delle CDR₃, come delle altre anse ipervariabili, è una maggiore stabilità contro la proteolisi, la possibilità di riconoscere un maggior numero di antigeni diversi e una migliore espressione batterica (Castellani *et al.*, 1991; Clackson *et al.*, 1991; Neri *et al.*, 1996).

Le varianti anticorpali ottenute sono state clonate in configurazione scFv in un vettore fagemidico chiamato pDN332 che permette di aggiungere all'estremità C-terminale dell'anticorpo ricombinante peptidi tag (FLAG-Tag e His-tag) utili per la caratterizzazione e la purificazione (Neri *et al.*, 1996).

The ETH antibody phage-display library

The diagram illustrates the ETH antibody phage-display library. On the left, a phage particle is shown with a yellow surface and a tail. A single-chain variable fragment (scFv) antibody, represented by a green and yellow structure, is attached to the phage. An arrow points from the scFv to a protein structure on the right. The protein structure is a complex of grey and blue spheres, with several residues highlighted in yellow and blue. The residues are labeled with numbers: 31, 32, 33, 50, 52, 54, 93, 94, 95, 96, 97, 98, and 99. The protein structure is identified as DP-47 (VH). The phage particle is identified as DPK-22 or DPL-16 (VL).

Figura 12. *Library ETH. Disegno schematico dell'esposizione dei frammenti anticorpali scFv su fago come prodotti di fusione con la proteina pIII. Le linee germinali, DP47 e DPK22, sono state modificate casualmente nelle CDR₃ della V_k nelle posizioni 91, 93, 94 e 96 (in giallo) e nelle CDR₃ della V_H nelle posizioni 95, 96, 97 e 98 (in blu) .*

1.5 LA “LIBRARY F8”

1.5.1 Stabilità termodinamica dell’anticorpo F8

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

Sulla base dell’osservazione che il frammento anticorpale scFv(F8) è in grado di accumularsi in elevate quantità nel citoplasma di piante transgeniche e per valutare se tale capacità dipendesse effettivamente dall’elevata stabilità della molecola è stata inoltre determinata la velocità di “turnover” del frammento scFv(F8). La determinazione di tale parametro è stata eseguita, lasciando sospensioni cellulari e protoplasti ottenuti da piante transgeniche in incubazione per 2 ore con aminoacidi marcati e analizzando poi aliquote della miscela di reazione per misurare la concentrazione di molecola scFv(F8) marcata. La quantità di scFv(F8) marcata è risultata costante per oltre 16 ore sia nelle sospensioni cellulari che nei protoplasti, dimostrando la bassa velocità di “turnover”, quindi l’alta emi-vita di questo frammento anticorpale nelle cellule vegetali (Tavladoraki *et al.*, 1993).

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

completa (concentrazione di GdmCl fino a 4M). Il prodotto rinaturato inoltre mostra la stessa capacità di legame dell'anticorpo in forma nativa.

La denaturazione è completamente reversibile anche in presenza di un agente riducente, il DTT, che impedisce la formazione dei ponti disolfuro. Il prodotto rinaturato in condizioni riducenti (20 mM DTT; pH 9,0) è stato caratterizzato mediante le sue proprietà spettrali ed ha rivelato gli stessi valori di fluorescenza intrinseca, lo stesso spettro lontano-UV e vicino-UV del scFv(F8) nativo.

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

1.5.2 Il scFv(F8) come "scaffold" per la costruzione di anticorpi a nuova specificità

Esperimenti di "grafting" (trapianto molecolare), effettuati mediante le moderne tecniche di ingegneria proteica, sono stati effettuati per valutare la possibilità di modificare la specificità del scFv(F8), tentando di preservare le caratteristiche di stabilità (Donini *et al.*, 2003). Questi studi sono stati effettuati inserendo sullo "scaffold" del scFv(F8) alcune regioni di un altro anticorpo, il scFv(D1.3) ben conosciuto in letteratura e di cui è nota la struttura cristallografica in complesso con il suo antigene, il lisozima. Ciò ha permesso di formulare un modello computerizzato che consentisse di prevedere ragionevolmente l'effetto di ogni singola modificazione aminoacidica sulla struttura del scFv(F8) e quindi sulla sua stabilità. In particolare è stato progettato il trapianto sul scFv(F8), attraverso mutagenesi graduale, di tutte le CDR del scFv(D1,3), delle zone di bordo delle anse ipervariabili e di alcuni residui delle "framework" (FR) che si reputavano importanti nel garantire la giusta conformazione delle anse ipervariabili.

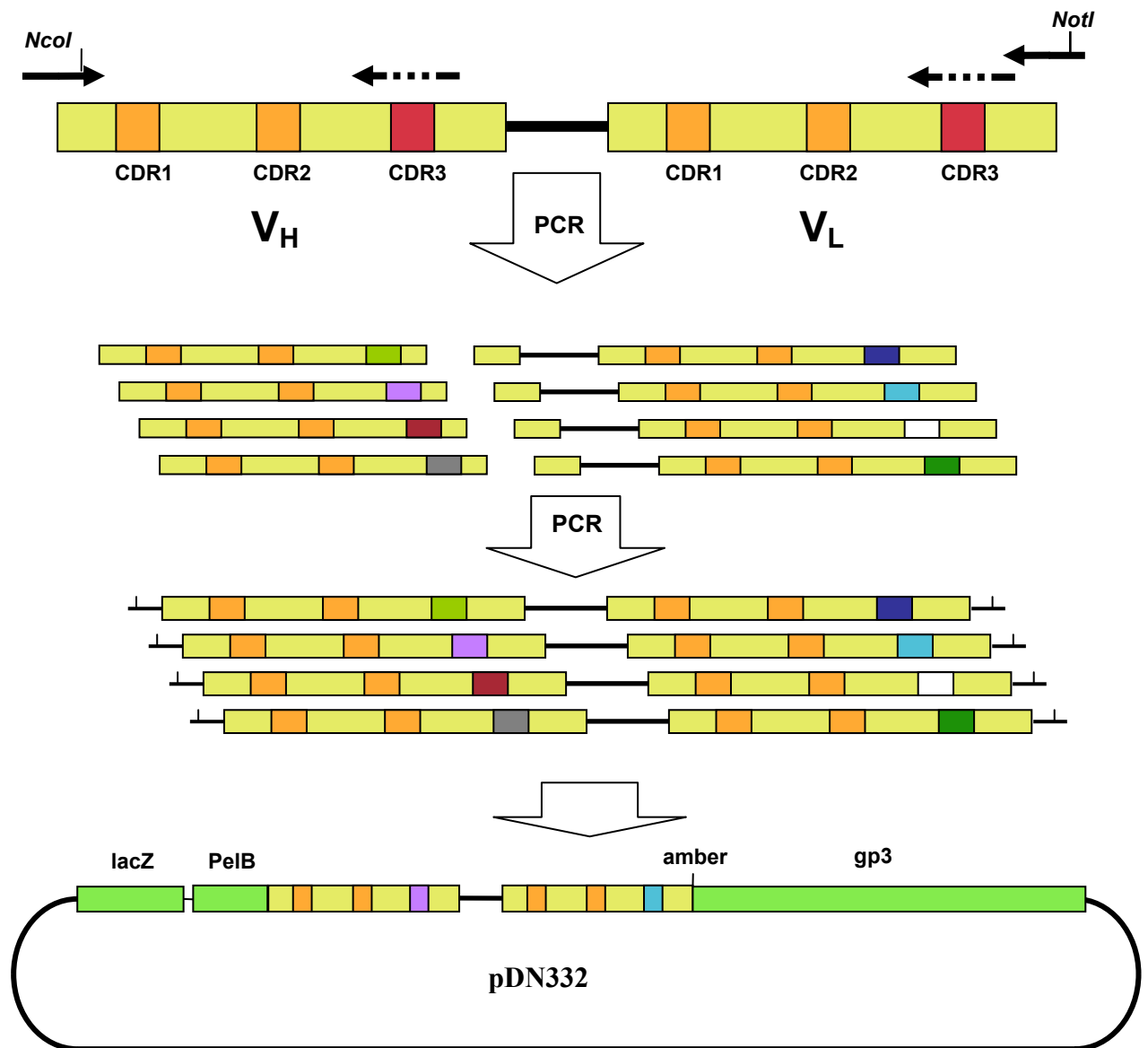
La realizzazione di scFv mutanti con diversi livelli di mutagenizzazione e la loro espressione nel citoplasma di *E. coli* ha permesso di dimostrare che la struttura del scFv(F8) è in grado di sopportare modifiche strutturali anche estese (tutte le 6 CDR e numerosi residui delle FR) mantenendo inalterate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

scFv(F8), ottenendo mutanti con affinità per il lisozima del tutto confrontabili all'anticorpo "donatore", il scFv(D1.3). Questi risultati hanno aperto la strada ad una serie di applicazioni che permettono di utilizzare la struttura del scFv(F8) per ottenere "intrabody".

1.5.3 Disegno e costruzione del repertorio di anticorpi basato sul scFv(F8)

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

Come punto di partenza per la costruzione di questo repertorio è stato utilizzato un derivato dell'anticorpo scFv(F8), caratterizzato da una parziale riduzione di alcune CDR individuata in modo da ottenere anse di lunghezza media tra le strutture canoniche degli anticorpi finora caratterizzati. In particolare è stata scorciata di 4 aminoacidi (portandola da 15 a 11 residui), e parzialmente modificata, la CDR₁ del dominio V_L e sono stati rimossi 9 residui aminoacidici della lunga ed inconsueta CDR₃ del dominio V_H. Per la costruzione del repertorio di anticorpi è stata introdotta variabilità di sequenza in 4 posizioni aminoacidiche delle CDR₃ sia del dominio V_H che del dominio V_L tramite mutagenesi per PCR. Attraverso oligonucleotidi parzialmente degenerati sono stati modificati casualmente i residui compresi tra 95 e 98 della V_H e quelli tra 91 e 94 della V_L. I prodotti di mutagenesi sono stati clonati in un vettore fagemidico per il montaggio sulla superficie del batteriofago M13 come fusione con la proteina capsidica pIII. Il repertorio ottenuto, chiamato "library F8" è risultato composto di 5×10^7 differenti cloni (Desiderio *et al.*, 2001) (**figura 13**).



Diversità: 5×10^7

Figura 13. L'anticorpo scFv (F8) ha fornito struttura portante su cui costruire la . Modificando casualmente solo quattro dei residui aminoacidici delle CDR₃ sia della V_H che della V_L è stato ottenuto un repertorio molecolare di anticorpi con nuove specificità di legame (5×10^7) e caratteristiche biochimiche simili all'anticorpo di partenza F8.

1.5.4 Selezione di anticorpi con differente specificità

Diverse proteine sono state impiegate come antigeni per selezionare anticorpi scFv dalla “library F8”, tra queste il lisozima dell’uovo di gallina (HEL), il virus vegetale CMV (cucumber mosaic virus) e la GST (glutathione-S-transferasi) .

Il numero di cicli di selezione (da 4 a 6) è stato deciso sulla base del progressivo arricchimento in cloni specifici contro i singoli antigeni, che viene valutato come titolo dei fagi policlonali ottenuti dopo ogni ciclo di selezione. Dopo l’ultimo ciclo di “biopanning”, i leganti specifici sono stati individuati mediante saggio ELISA. La percentuale dei cloni positivi è risultata variabile per i differenti antigeni; tra questi solo i cloni che mostravano segnali ELISA forti sono stati scelti per le successive caratterizzazioni. Il sequenziamento di tutti i cloni isolati ha confermato l’introduzione di variabilità di sequenza a livello delle CDR₃, la riduzione della lunghezza della CDR₃ della V_H e l’assenza di mutazioni non previste indotte durante la PCR (Desiderio *et al.*, 2001).

L’assortimento completamente casuale per carica e dimensione degli aminoacidi riscontrati nelle CDR₃ dei cloni caratterizzati indica che questi non influenzano sostanzialmente la struttura portante dell’anticorpo di partenza. La specificità di legame dei cloni scFv isolati per i rispettivi antigeni è stata valutata mediante saggio ELISA su diversi antigeni non correlati. Nessun anticorpo ha mostrato cross-reattività aspecifica. Tra i cloni positivi contro il lisozima ne è stato caratterizzato in dettaglio uno, chiamato scFv(HEL-11E), la cui affinità per il lisozima è stata valutata tramite risonanza plasmonica di superficie (tecnologia BIAcore) ($K_d=1,05 \times 10^{-7} M$). L’affinità per l’antigene HEL è risultata confrontabile con quella del ben caratterizzato scFv(D1.3) derivato da un anticorpo monoclonale diretto contro lo stesso antigene (Desiderio *et al.*, 2001).

1.5.6 Proprietà di ripiegamento *in vitro*

I frammenti scFv selezionati dalla “library F8” sono stati analizzati per dicroismo circolare per valutare accuratamente il livello di similarità strutturale con il scFv(F8) precedentemente caratterizzato (Tavladoraki *et al.*, 1999). Lo spettro UV ha rilevato una completa somiglianza della loro struttura terziaria a quella del scFv(F8). Inoltre è stata ripetuta sui cloni isolati un’analisi di denaturazione e rinaturazione all’equilibrio, seguendo le stesse condizioni sperimentali adottate per il scFv(F8) (paragrafo 1.6.1). La transizione dei frammenti dallo stato nativo a quello non ripiegato apparentemente segue un meccanismo a due stadi senza intermedi distinguibili (Desiderio *et al.*, 2001).

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

1.6 SCOPO DELLA TESI

I repertori di anticorpi ricombinanti rappresentano una fonte ricca e di facile impiego di reagenti ad alta specificità. Tra questi la “library F8” è caratterizzata da molecole ad alta stabilità termodinamica. Oltre alla dimostrata possibilità di selezionare da questo repertorio anticorpi ad alta specificità ed affinità di legame, analisi di ripiegamento *in vitro* hanno attestato una eccezionale stabilità molecolare di tutti i cloni analizzati.

Al fine di completare il quadro di caratterizzazione del repertorio, il presente lavoro di tesi si è proposto di dimostrare che i frammenti anticorpali che compongono la “library F8”, oltre ad essere altamente stabili, sono anche in grado di mantenere funzionalità nel citoplasma cellulare. Questo requisito risulta indispensabile per qualsiasi applicazione che richieda il riconoscimento di antigeni nel compartimento citoplasmatico, dove le condizioni riducenti impediscono la formazione dei ponti disolfuro necessari al corretto ripiegamento della maggior parte degli anticorpi.

Per ottenere la dimostrazione definitiva della funzionalità citoplasmatica della “library F8” è stata condotta un’analisi cinetica, mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR), per confrontare le costanti di affinità antigene-anticorpo, sia nella forma ossidata che nella forma ridotta di frammenti anticorpali selezionati dal repertorio.

Una delle applicazioni più interessanti degli anticorpi citoplasmatici è legata al loro potenziale impiego in studi di genetica funzionale, come strumento molecolare per la modulazione di effetti fenotipici. A tal proposito il presente lavoro si è proposto di investigare la validità degli anticorpi selezionati dalla “library F8” per la preparazione di piante resistenti a patogeni, attraverso un approccio proteomico. L’indagine compiuta ha previsto l’impiego di una tecnologia di marcatura e analisi molecolare avanzata (sistema DIGE, Amersham Biosciences) per il confronto delle mappe proteiche di piante di pomodoro, che esprimono intracellularmente un anticorpo isolato dal repertorio diretto contro il virus CMV, con le corrispondenti piante non geneticamente modificate. Questo modello rappresenta da un lato un ottimo esempio di immunomodulazione di funzioni cellulari, dall’altro ha permesso di investigare l’equivalenza sostanziale tra piante transgeniche e piante non manipolate geneticamente. Gli studi effettuati hanno implicato l’allestimento di un laboratorio attrezzato per l’analisi proteomica e la messa a punto di protocolli specifici per campioni vegetali, che costituiscono la base per lo sviluppo di questa linea di ricerca, mirata ad indagare

ulteriormente e comprendere i meccanismi responsabili della resistenza mediata da anticorpo.

2. MATERIALI E METODI

I materiali utilizzati sono descritti nei paragrafi riguardanti i metodi in cui i singoli reagenti sono richiesti, ad eccezione di reagenti di base che vengono utilizzati per più protocolli e che vengono descritti, qui di seguito. Per i metodi, dove non espressamente specificato, si è fatto riferimento a Sambrook *et al.*, 1989.

2.1 REAGENTI DI BASE E COLTURE BATTERICHE

2.1.1 Soluzioni di base

TAE 50x: Tris Base 2 M, acido acetico 1 M, EDTA 50 mM pH 8,0.

PBS 10x: composizione per litro: NaCl 5,84 g, Na₂HPO₄ 4,72 g, NaH₂PO₄·2H₂O 2,64 g, pH 7,2.

PBST: PBS contenente 0,1% TWEEN-20.

PBSM: PBS contenente 2% (PBSM 2%) o 5% (PBSM 5%) latte in polvere a basso contenuto di grassi.

Tampone di corsa 10x: Tris Base 250 mM, glicina 1,92 M, sodiododecilsolfato (SDS) 1%, H₂O ultrapura fino ad 1L

Tampone di caricamento 2x: 1,25 ml Tris-HCl 1 M pH 6,8, 2 ml glicerolo, 2 ml SDS 20% (p/v), 1 ml 2-β mercaptoetanolo, 0,1 g bromofenoloblu, H₂O fino ad 1 L

Tampone di trasferimento: Tris Base 20 mM, glicina 144 mM, metanolo 20%, H₂O ultra pura fino ad 1 L

Soluzione di fissaggio/stop: Metanolo 50%, acido acetico glaciale 12%, H₂O ultrapura fino ad 1 L

Soluzione di sviluppo: Na₂CO₃ 60 g, H₂O ultrapura fino ad 1L

Soluzione di tiosolfato di sodio per ml: 150 mg Na₂S₂O₃ ·H₂O, H₂O ultrapura

CHAPS lysis buffer: Tris Base 5 mM pH8,0, urea 8 M, magnesio acetato 5 mM, CHAPS 4%

ASB14 lysis buffer: Tris Base 10 mM pH8,0, magnesio acetato 5 mM, urea 8 M, ASB14 2%

CHAPS 2x sample buffer: Urea 8 M, DTT 130 mM, CHAPS 4 %, IPG buffer 2%

ASB14 2x sample buffer: Urea 7 M, tiourea 2 M, DTT 130 mM, ASB14 2%, IPG buffer 2%

Soluzione di reidratazione: Urea 7M, tiourea 2M, DTT 13 mM, IPG buffer 1%

Miscela per gel 12,5%: Tris-HCl 1,5M pH 8,8, arilamide-bisacrilamide (29:1) 30%, SDS 10%, TEMED 5%, APS 10%

Soluzione di coomassie colloidale per litro: Ammonio solfato 170 g, coomassie G250 1g, acido acetico 0,5%, metanolo 34%

2.1.2 Ceppi batterici

Sono stati utilizzati i ceppi *Escherichia coli*; caratterizzati dai seguenti genotipi:

- **HB2151** : (K12Δ (*lac-pro*), *ara*, *nal^r*, *thi/F' pro AB*, *lacIq*, *lacZΔM15*).
- **TG1** : (K12Δ (*lac-pro*), *supE*, *thi*, *hsd 5/F'*, *tarD36*, *pro AB*, *lacIq*, *lacZΔM15*).
- **DH5α** : (*supE44*, *lacU1694*, 80 *lac Z M1577*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gur 96*, *thi-and*, *relA17*).

2.1.3 Terreni di coltura

I terreni di coltura impiegati sono i seguenti;

- Terreno Luria Bertani (**LB**): usato per la crescita e il mantenimento dei ceppi batterici DH5α e HB2151. Composizione per litro: bacto-triptone 10 g, estratto di lievito 5 g, NaCl 10 g.
- Terreno **2xYT**: usato per la crescita dei ceppi batterici TG1 e HB2151. Composizione per litro: bacto-tryptone 17 g, estratto di lievito 10 g, NaCl 5 g.

2.2 SELEZIONE DEL REPERTORIO MOLECOLARE

2.2.1 Selezione sull'antigene immobilizzato: cicli di “biopanning”

L'antigene PVX è stato immobilizzato su immunotubo (Maxisorp, NUNC) in PBS, alla concentrazione di 10 µg/ml, incubando per 16 ore a temperatura ambiente.

Sono stati usati 10^{12} - 10^{13} fagi sia della “library F8” che della “library ETH” in 4 ml di PBSM 2% per ciascun ciclo di selezione, lasciando in incubazione per 2 ore, di cui i primi 30' in leggera agitazione. Dopo 10 lavaggi con PBST e 10 lavaggi con PBS, è stata effettuata l'eluizione con 1 ml di trietilammina 100 mM, immediatamente neutralizzati con 0,5 ml di Tris-HCl 1 M pH 8,0. La sospensione fagica è stata quindi usata per infettare 10 ml di una coltura di *E. coli* ceppo TG1 in crescita esponenziale ($OD_{600} = 0,5 - 0,7$).

2.2.2 Infezione con “Helper-Phage”

Una singola colonia del ceppo TG1, prelevata con una punta sterile, è stata risospesa in 5 ml di mezzo di coltura 2xYT contenente ampicillina (100 ng/µl) e glucosio al 2% (2xYT-AG) e cresciuta per 16 ore a 30°C in agitazione (250rpm).

75 µl della precultura sono stati inoculati in 50 ml di 2xYT-AG e la coltura è stata fatta crescere a 30°C in agitazione (250 rpm) fino ad avere un valore di densità ottica a 600 nm di 0,5. Un'aliquota di 10 ml di coltura è stata trasferita in un tubo sterile da 15 ml ed inoculata con 100 µl di helper-phage VCS-M13 (Stratagene) alla concentrazione di circa 10^{11} tu/ml. Lasciando in bagno senza agitazione a 37°C per 30'. I batteri sono stati poi centrifugati a 4000 xg per 5 minuti, quindi il pellet è stato risospeso in 100 ml di 2xYT + 100 ng/µl ampicillina + 25 ng/µl kanamicina e incubati in agitazione 16 ore a 30°C.

2.2.3 Recupero dei fagi

La coltura cresciuta per 16 ore a 30°C, è stata centrifugata a 6000 xg per 30 minuti ed è stato recuperato il supernatante contenente i fagi, a cui sono stati aggiunti 25 ml di PEG-NaCl (PEG 20%, NaCl 2,5 M), lasciando su ghiaccio per 60 minuti per precipitare i fagi. La sospensione fagica è stata centrifugata per 15 minuti a 10.800 xg e il pellet è stato risospeso in 40 ml di acqua deionizzata sterile pre-raffreddata. Dopo una ulteriore precipitazione ottenuta per aggiunta di 10 ml di PEG-NaCl e incubazione su ghiaccio per 20 minuti, i fagi sono stati sottoposti nuovamente a centrifugazione e risospesi in 400 µl di PBS e glicerolo 15 %. Un ulteriore passaggio in centrifuga a 950 xg per 10 minuti, ha permesso di eliminare i residui batterici; quindi il supernatante è stato utilizzato per il successivo ciclo di “biopanning”.

2.2.4 Analisi dei cloni selezionati

I fagi ottenuti dall'ultimo ciclo di “biopanning” sono stati usati per infettare *E. coli* ceppo HB2151, con le stesse modalità usate per l'infezione del ceppo TG1 (paragrafo 2.2.1). Novanta singole colonie ottenute in seguito al piastamento dei batteri infettati sono state inoculate in 150 µl di 2xYT-AG e lasciate crescere a 30°C in agitazione per 16 ore. Quindi un'aliquota di 10 µl di ciascuna precultura è stata diluita in 150 µl di 2xYT-AG, lasciando crescere per 1-2 ore a 37°C (fino a OD₆₀₀=0,7-0,8). L'espressione dei frammenti scFv, liberati nel mezzo di coltura, è stata ottenuta per aggiunta di IPTG 1 mM, seguita da agitazione a 30°C per 16 ore. Le cellule batteriche sono state centrifugate per 20 minuti a 3000 xg ed i supernatanti (80 µl) di coltura sono stati analizzati tramite saggio ELISA, utilizzando piastre su cui è stato immobilizzato l'antigene PVX nelle stesse condizioni usate per gli immunotubi.

2.3 CLONAGGI IN PLASMIDE

2.3.1 Il vettore pDN332

I clonaggi sono stati effettuati nel plasmide di espressione batterica pDN332 (Pini *et al.* 1998) (**figura 1**), questo deriva dal vettore di tipo “fagemide” pHEN1 (Hoogenboom *et al.*, 1991), contenente l’origine di replicazione sia di *E. coli* che del fago M13. Il “polylinker” è a valle della sequenza segnale *PelB* (derivante dal gene che codifica la pectato liasi di *Erwinia carotovora*) che veicola la proteina espressa nello spazio periplasmatico. I siti di restrizione *NotI* e *SfiI* sono stati utilizzati per il clonaggio di frammenti immunoglobulinici scFv. Il pDN332 permette di inserire all’estremità C-terminale dell’anticorpo ricombinante una sequenza peptidica composta di:

- un sito di fosforilazione D₃SD₃ (Neri *et al.*, 1996).
- una sequenza FLAG-tag (DYD₄K) per la rilevazione dell’anticorpo ricombinante tramite un anticorpo anti-FLAG-tag M2 (Sigma).
- una sequenza “tag” di sei istidine (HIS₆) che permette una rapida purificazione tramite cromatografia nichel-chelante, la rilevazione e l’immobilizzazione con adatti reagenti chelanti del nichel.
- un sito di riconoscimento per endopeptidasi e enterochinasi.

La sequenza di pDN332 compresa tra il sito *NotI* e il codone *amber* che precede il gene III, è riportata di seguito:

Not I	sito di fosforilazione	FLAG-tag
HIS₆-tag		
R A A D D D S D D	<u>D Y K D D D D K</u>	
<u>H H H H H H</u> amber		

5’—**GCG GCC GCA** GAT GCA GAT TCC GAC GAT GAC TAC AAG GAC GAC GAC GAC AAG
CAC CAT CAC CAT CAC CAT **TAG** – 3’

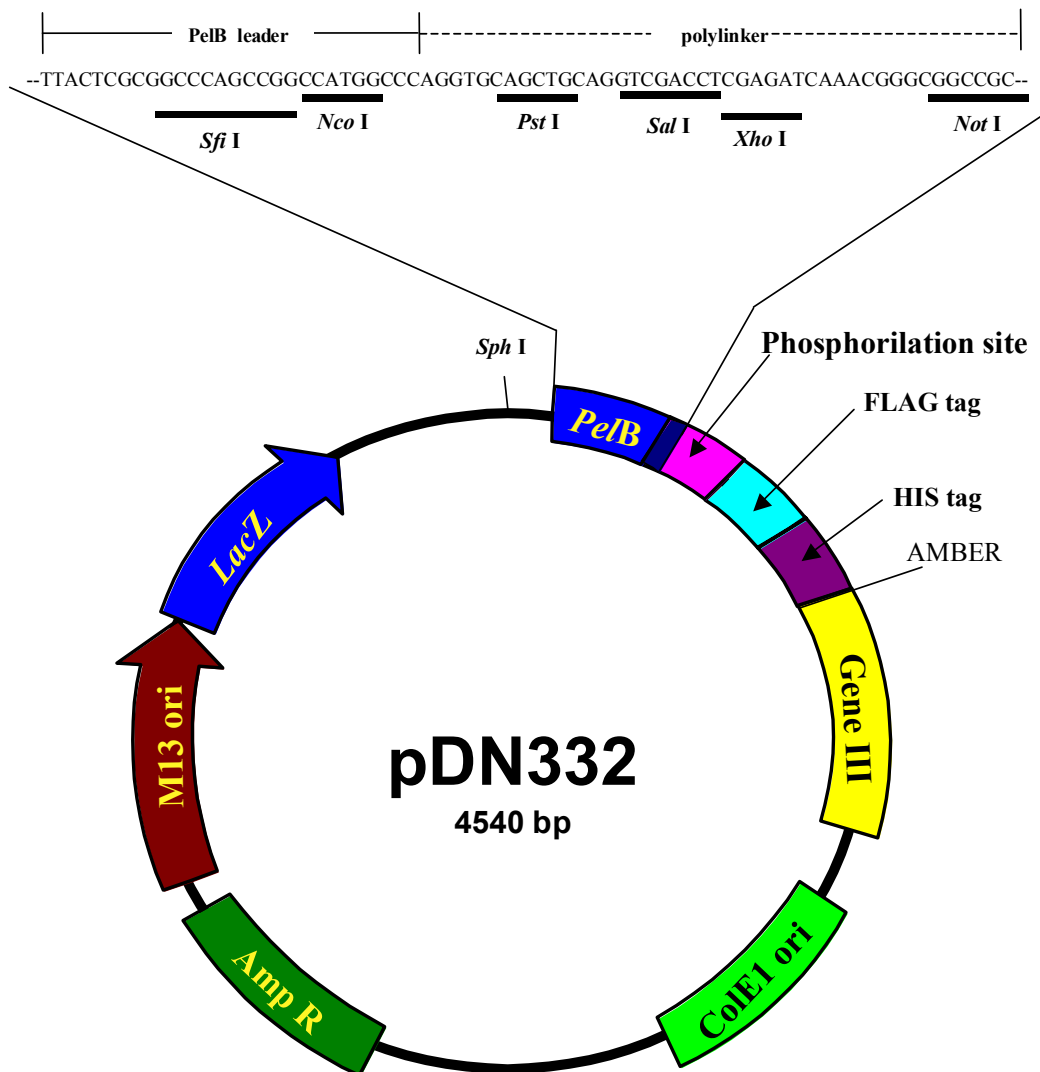


Figura 1. *Plasmide pDN332 utilizzato come vettore di clonaggio derivato dal fagemide pHEN1 (Hoogenboom et al., 1991), in cui la sequenza tra il sito Not I e il codone “AMBER” che precede il gene III è stata sostituita dalla sequenza codificante per il D3SD3-FLAG-HIS6 tag (Pini et al., 1998).*

2.3.2 Digestione del DNA con enzimi di restrizione

Le digestioni sono state condotte secondo le indicazioni fornite dalle case produttrici dei diversi enzimi. Il DNA digerito è stato analizzato mediante separazione dei frammenti per elettroforesi su gel d'agarosio.

2.3.3 Amplificazione di specifici frammenti di DNA tramite PCR

L'amplificazione del DNA è stata ottenuta mediante reazione di polimerizzazione a catena (PCR) che consiste nel susseguirsi di una serie di cicli identici, ciascuno caratterizzato da tre fasi a differente temperatura. Nella prima fase la doppia elica del DNA viene denaturata alla temperatura di 94°C; nella seconda fase gli inneschi oligonucleotidici vengono fatti appaiare al DNA a singolo filamento, ad una temperatura scelta in base al grado di omologia tra gli inneschi e il DNA stampo e alla composizione in basi degli inneschi (in genere compresa tra 52°C e 65°C); nella terza fase l'elica complementare di DNA viene polimerizzata a 72°C a partire dall'innesco appaiato ad opera della *Taq* DNA polimerasi (DNA polimerasi termoresistente, derivata tramite ingegneria genetica, da *Thermophilus aquaticus*). Le tre fasi sono ripetute per numerosi cicli (25-30), per consentire l'amplificazione specifica di una sequenza di DNA compresa tra i 2 inneschi di un fattore 2^n , dove n indica il numero dei cicli (Goodenow *et al.*, 1989).

La miscela di reazione è stata preparata nel modo seguente: H₂O deionizzata sterile per un volume finale di 100 µl, 10 µl di tampone di reazione *Taq* 10 x (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8.3, MgCl₂ 15 mM) (Perkin Elmer), dNTPs ad una concentrazione finale di 200 µM ciascuno, innesco senso e innesco antisenso ad una concentrazione finale di 1 µM ciascuno, 10-100 ng di DNA stampo, 1 U (unità) di AmpliTaq DNA polimerasi (Perkin Elmer). Per l'amplificazione è stato usato un termociclatore della Hybaid.

Le condizioni di reazione generalmente adottate sono le seguenti: un primo ciclo di 5' a 95°C (denaturazione), seguito da 30 cicli di 45" a 95°C (denaturazione), 30" a 55°C (appaiamento) e 30" a 72°C (polimerizzazione), e infine un'incubazione di 7' a 72°C per completare la polimerizzazione.

Gli oligonucleotidi usati come inneschi nelle amplificazioni per PCR e nelle reazioni di sequenza sono stati sintetizzati dalla ditta Genenco, M-Medical.

2.3.4 Elettroforesi su gel d'agarosio

Per l'analisi del DNA sono stati preparati gel d'agarosio all'1% in tampone TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM), a cui è stato aggiunto bromuro d'etidio (concentrazione finale 0,5 µg/ml). Alla soluzione di DNA da analizzare su gel è stato aggiunto tampone di caricamento composto da: glicerolo 6%, blu di bromofenolo 0,02%, SDS 0,02% (concentrazioni finali). L'elettroforesi è stata condotta in tampone TAE, ad un voltaggio costante di circa 10 V/cm (gel 5 x 7,5 cm) o 3 V/cm (gel 15 x 20 cm).

2.3.5 Estrazione e purificazione di DNA da gel d'agarosio

Frammenti specifici di DNA sono stati recuperati da gel d'agarosio e purificati utilizzando il "Gel Extraction Kit" (QIAgen) secondo il protocollo raccomandato dalla casa produttrice. Tale metodo sfrutta la capacità di particelle di silice di trattenere le molecole di DNA (Vogelstein & Gillespie, 1979). I prodotti di purificazione sono stati quantificati tramite elettroforesi su gel di agarosio per confronto con DNA standard a concentrazioni note.

2.3.6 Reazione di defosforilazione

Dopo digestione e purificazione il DNA del vettore è stato defosforilato per evitare la ricircularizzazione del vettore "scarico" in seguito a ligazione. La reazione è stata effettuata in un volume di 30 µl, utilizzando 0,5 U di fosfatasi alcalina di gamberetto (SAP, USB) e incubando a 37°C per 1 ora.

2.3.7 Reazione di ligazione

Il DNA del vettore digerito e defosforilato e il frammento di DNA da clonare sono stati mescolati in un rapporto molare 1:3. La miscela di reazione è stata preparata nel minimo volume possibile (in genere 10 µl) utilizzando 1 U di T4 DNA ligasi (BioLabs). La ligazione è stata effettuata a 16°C per 16 ore.

2.3.8 Trasformazione delle cellule batteriche

Preparazione delle cellule competenti per elettroporazione

400 ml di terreno LB sono stati inoculati con 4 ml di coltura di *E. coli* fatta crescere a 30°C in agitazione a 250 rpm durante la notte. Le cellule sono state incubate nelle stesse condizioni fino al raggiungimento della fase esponenziale di crescita, determinata mediante lettura dell'assorbanza a 600 nm ($OD_{600} = 0,5$).

La crescita è stata bloccata raffreddando la coltura su ghiaccio per 15-30 minuti. Il terreno di coltura è stato rimosso in seguito a centrifugazione 4000 xg per 15 minuti a 4°C. I residui di terreno sono stati eliminati mediante un lavaggio con 400 ml di acqua deionizzata sterile pre-raffreddata su ghiaccio. Dopo una ulteriore centrifugazione e rimozione del supernatante sono stati effettuati altri 2 lavaggi: il primo con 200 ml di acqua deionizzata fredda, il secondo con 10 ml di glicerolo al 10% a 0°C. Dopo l'ultima centrifugazione, le cellule sono state risospese in 1 ml di glicerolo freddo al 10% per ottenere una concentrazione di $1-3 \times 10^3$ cellule/ml. Aliquote da 50 µl sono state congelate rapidamente in azoto liquido e conservate a -80 °C .

Trasformazione per elettroporazione

Ad una aliquota di cellule competenti (50 µl) scongelate su ghiaccio è stato aggiunto il DNA da trasfettare (2-5 ng di plasmide purificato o 1 µl di prodotto di ligazione). Dopo una incubazione su ghiaccio per 10', si è proceduto con l'elettroporazione, utilizzando l'apparato "Gene-Pulser" (Bio-Rad) impostato secondo i seguenti parametri: 960 µF, 2,5 KVolts, 200 Omhs. La trasfezione è stata effettuata in cuvette da 0,2 cm (BioRad). Dopo applicazione dell'impulso elettrico, 1 ml di LB è stato aggiunto immediatamente e la soluzione batterica è stata incubata a 37°C per 30 minuti. 100 µl della sospensione batterica sono stati piastrati su 2xYT-AG, la parte rimanente della coltura è stata

centrifugata a 2500 xg per 5 minuti al fine di raccogliere le cellule che sono state risospese nel volume di terreno residuo dopo l'eliminazione del supernatante per rovesciamento della provetta. La sospensione così ottenuta (circa 200 µl) è stata piastrata come sopra.

2.3.9 Caratterizzazione dei ricombinanti batterici mediante PCR

Per individuare rapidamente le colonie di *E. coli* trasformate con i vettori ricombinanti, è stata sfruttata la tecnica di PCR applicata direttamente alle cellule batteriche (Sandhu *et al.*, 1989).

Per ciascun campione è stata preparata una miscela contenente i seguenti componenti: 1 µl di tampone di reazione 10x (Perkin Elmer), dNTPs fino ad una concentrazione finale 200 µM ciascuno, 10 pmoli di innesco senso e altrettanti di innesco anti senso, 0,4-0,5 unità di AmpliTaq (Perkin Elmer), H₂O deionizzata sterile fino ad un volume di 10 µl. Le cellule, raccolte con punta sterile da una singola colonia cresciuta su terreno solido, sono state risospese nella miscela di reazione, che è stata quindi riscaldata in termociclatore Hybaid a 95°C per 5 minuti per facilitare la rottura della parete batterica. La reazione di amplificazione è stata effettuata di seguito, alle condizioni riportate nel paragrafo 2.3.3.

2.3.10 Mini preparazione di DNA plasmidico ad elevata purezza

Una singola colonia batterica di *E. coli* è stata inoculata in 2 ml di terreno LB, contenente ampicillina alla concentrazione di 100 µg/ml e glucosio 2%, e la coltura è stata incubata a 37°C per 20-22 ore in agitazione a 250 rpm.

La sospensione batterica è stata centrifugata a 20.000 xg per 1 minuto, eliminando accuratamente il supernatante dopo la centrifugazione. Il pellet è stato trattato con il "QIAprep Spin Miniprep Kit" (QIAGEN) secondo il protocollo fornito dalla ditta fornitrice.

La purezza e la concentrazione del DNA plasmidico estratto sono state determinate per elettroforesi su gel d'agarosio, utilizzando DNA standard come riferimento.

2.3.11 Sequenze nucleotidiche

I campioni sono stati sequenziati mediante sequenziatore a capillari Applied Biosystem 3100 e l'elaborazione delle sequenze è stata effettuata con il programma Mac Vector 7.0.

2.4 ANALISI DEI FRAMMENTI ANTICORPALI scFv

2.4.1 Estrazione delle proteine espresse nel periplasma di *E. coli*

Una singola colonia ricombinante di *E. coli* HB2151 è stata inoculata in 5 ml di terreno 2xYT-AG, lasciando in agitazione (250 rpm) per 16 ore a 30°C. Questa pre-coltura è stata poi diluita in 100 ml di terreno 2xYT-AG in modo da ottenere una concentrazione cellulare corrispondente ad una densità ottica a 600 nm pari a 0,05. La coltura è stata fatta crescere a 30°C in agitazione (250 rpm) fino ad avere un valore di densità ottica di 0,5.

L'induzione dell'espressione dei frammenti scFv è stata ottenuta sedimentando le cellule per centrifugazione a 3000 xg per 15 minuti e risospingendole in 100 ml di terreno 2xYT contenente ampicillina 100 ng/μl e IPTG 1 mM (2xYT-AI). Dopo 3 ore di crescita in agitazione a 30°C la coltura è stata nuovamente centrifugata.

L'estrazione delle proteine dal periplasma batterico è stata ottenuta per "shock" osmotico delle cellule batteriche. Il pellet di cellule batteriche è stato risospeso in una soluzione tampone (TES), contenente saccarosio 0,5 M, Tris-HCl 0,2 M pH 8,0, EDTA 0,5 mM ed inibitori di proteasi ("Complete Mini", Boehringer Mannheim); nella proporzione di 1 ml di TES per 100 ml di coltura batterica iniziale.

La sospensione batterica è stata lasciata in ghiaccio per 30 minuti agitando di tanto in tanto ed è stata poi centrifugata a 3000 xg per 15 minuti. Il supernatante corrispondente alla frazione solubile del periplasma è stato analizzato per ELISA.

2.4.2 Estrazione delle proteine espresse nel citoplasma di *E. coli*

Per l'espressione di frammenti scFv nel citoplasma di *E. coli* HB2151, cellule prelevate da una singola colonia ricombinante con una punta sterile, sono state risospese in 5 ml di terreno 2xYT-AG e cresciute per 16 ore a 30°C in agitazione (250 rpm). Tutto il volume della precoltura è stato inoculato in 50 ml di 2xYT-AG e la coltura è stata fatta crescere a 30°C in agitazione (250 rpm) fino ad avere $OD_{600} = 0,5-0,7$. Le cellule sedimentate per centrifugazione a 4°C a 3000 xg per 15 minuti sono state indotte per aggiunta di 50 ml di terreno di coltura 2xYT-AI a 30°C per 3 ore. La coltura è stata quindi centrifugata a 3500 xg per 15 minuti a 4°C per recuperare le cellule.

L'estrazione delle proteine dal citoplasma batterico è stata ottenuta per rottura meccanica delle cellule batteriche mediante congelamento-scongelamento. Il pellet batterico è stato risospeso in 0,25 ml di tampone di PBS 1× contenente inibitori di proteasi ("Complete Mini", Boehringer) congelato in azoto liquido e immediatamente scongelato in acqua a temperatura ambiente.

I campioni sono stati quindi centrifugati a 20.000 xg per 15 minuti a 4°C ed è stato prelevato il supernatante corrispondente alla frazione solubile del citoplasma che è stata analizzata su gel di poliacrilammide.

2.4.3 Purificazione dei frammenti scFv

Gli estratti periplasmatici sono stati purificati per cromatografia di affinità utilizzando la resina Sepharose coniugata con la proteina L, che riconosce la catena leggera delle Ig_k, seguendo il protocollo consigliato dalla casa produttrice (Pierce). I frammenti scFv sono stati eluiti con glicina 0,1 M pH 2,0 e immediatamente neutralizzati in Tris/HCl (1 M pH 8,0). Le frazioni che contenevano gli anticorpi, identificate mediante lettura dell'assorbanza a 280 nm, sono state unite e dializzate contro il tampone PBS.

La purificazione dei frammenti scFv dal citoplasma di *E. coli* è stata realizzata mediante cromatografia a scambio anionico. A questo scopo è stata usata la resina Q-Sepharose (Pharmacia) (800 µl), che è stata equilibrata con tampone Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e DTT 12,5 mM. E' stata eseguita una prima eluizione con tampone PBS pH 7,0 e DTT 12,5 mM ed una seconda eluizione con tampone PBS pH 4,0 e DTT 12,5 mM.

2.4.4 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE)

L'analisi dei frammenti anticorpali è stata effettuata utilizzando il sistema SDS-PAGE secondo Laemmli (1970). 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%. Ai campioni da analizzare sono stati aggiunti (concentrazioni finali): glicerolo 10%, Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, blu di bromo fenolo 0,025%, SDS 2% e β-mercaptoetanolo 5%. Prima del caricamento i campioni proteici sono stati sottoposti a bollitura 5 minuti per favorire la denaturazione. La corsa elettroforetica è stata

effettuata su apparato MiniProtean III (BioRad) ad una differenza di potenziale costante di 150 Volt.

L'analisi dei frammenti anticorpali è stata effettuata anche su gel non riducente in cui sono state mantenute le stesse concentrazioni sopra citate, ma senza aggiungere β -mercaptoetanolo.

2.4.5 Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione delle proteine totali presenti negli estratti è stata determinata secondo il metodo di Bradford (1976), utilizzando il reagente BioRad e la sieralbumina bovina (BSA) come standard.

2.4.6 “Western blotting”

Le proteine separate su SDS-PAGE sono state trasferite elettroforeticamente dal gel denaturante di poliacrilammide su un foglio di PVDF (polyvinylidene fluoride, Immobilon-P, Millipore) per 1 ora a 4°C al voltaggio costante di 100 Volts.

La membrana di PVDF è stata posta in agitazione in una soluzione bloccante di PBSM 5% a 4°C per 16 ore. Dopo 3 lavaggi in PBST per 10 minuti e 1 in PBS per 5 minuti, la membrana è stata incubata in PBSM 2% contenente l'anticorpo monoclonale anti-FLAG BioM2 biotinilato (Sigma) alla concentrazione di 3 μ g/ml, per 2 ore a temperatura ambiente. La membrana è stata nuovamente lavata e posta in incubazione 1 ora a temperatura ambiente in PBSM 2%, contenente una immunoglobulina di pecora diretta contro le IgG murine, coniugata alla biotina (Amersham) alla diluizione 1:5000 in PBSM 2%.

Dopo una nuova serie di lavaggi, la membrana è stata incubata per un'ora a temperatura ambiente in presenza di perossidasi equina (HRP, Amersham) coniugata alla streptavidina e diluita 1:2000 in PBSM 2%.

Infine la membrana è stata lavata e impregnata con 1 ml di soluzione per la rivelazione delle proteine per chemiluminescenza (ECL Plus, Amersham). Tale sistema consiste nell'emissione di luce a seguito dell'ossidazione del luminolo, in presenza di attivatori

chimici, da parte della perossidasi di rafano. Il segnale è stato rivelato in seguito a esposizione della membrana su una lastra fotografica (667, Polaroid).

2.4.7 Saggio ELISA

Il PVX è stato immobilizzato su piastre ELISA (Nunc) alla concentrazione di 10 µg/ml in 150 µl di tampone PBS, incubando a 4°C per 15 ore.

Dopo 3 lavaggi con tampone PBST e 1 lavaggio con PBS le piastre sono state bloccate con una soluzione PBSM 2% per 2 ore a 37°C per ridurre la possibilità di legami aspecifici. Le piastre sono state nuovamente lavate 3 volte con PBST ed una volta con PBS.

A ciascun pozzetto sono stati aggiunti 80 µl di estratto da colture batteriche indotte e l'anticorpo anti-FLAG BioM2 biotinilato (Sigma) alla concentrazione di 10 µg/ml per un volume totale di 100 µl di PBSM 2%. Le piastre sono state incubate 2 ore a 37°C, quindi lavate 3 volte con PBST e 1 volta con PBS. La rivelazione del segnale è stata effettuata tramite un anticorpo di capra anti-IgG di topo (Pierce) coniugato alla perossidasi di rafano (HRP-IgG della K.P.L.) aggiunto in 100 µl di PBSM 2% alla diluizione di 1:10.000.

Dopo incubazione a 37°C per un'ora e una nuova serie di lavaggi, sono stati aggiunti 100 µl di soluzione 1:1 di substrato ABST [acido 2'2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin) sulfonico] della perossidasi e H₂O₂ (K.P.L.).

Le misure di assorbanza sono state effettuate alla lunghezza d'onda di 405 nm, mediante lettore ELISA (LabSystem Multiscan Plus), a vari intervalli di tempo dall'inizio della reazione.

2.5 MISURE DI AFFINITÀ ANTIGENE-ANTICORPO MEDIANTE SPR (RISONANZA PLASMONICA DI SUPERFICIE)

Le costanti di associazione (K_{on}) e di dissociazione (K_{off}) sono state determinate mediante analisi di risonanza plasmonica di superficie (SPR), utilizzando il biosensore Biacore X. Tutte le molecole di analita sono state immobilizzate mediante legami covalenti con la matrice di destrano di ‘sensor chip’ CM5 o CM3 dopo attivazione dei gruppi carbossimetilici della matrice stessa con una miscela di N-idrossi-succinimmide (NHS) e N-etil-N’-(3-dietilamminopropil)-carbodiimmide (EDC).

Tutti i ligandi a differenti concentrazioni sono stati iniettati nella cella di flusso ad una velocità 20 μ l/min. Le interazioni degli anticorpi scFv(CMV-4G), scFv(GST-5G), scFv(HEL-11E), scFv(D1.3) e scFv(F8) con i rispettivi antigeni sono state analizzate secondo le condizioni riportate in **tabella 1**. L’immobilizzazione degli antigeni riportati in tabella è stata realizzata su ‘sensor chip’ CM5 (Biacore).

Antigene	Condizioni di immobi	RU (1) immo	Anticor	Concentrazione di a
CMV	200 ng/ μ l in tampone a mM pH 4,0	5400	scFv(CMV	da 500 nM a 80 nM
GST	20 ng/ μ l in tampone ac pH 3,5	3500	scFv(GST	da 500 nM a 30 nM.
lisozima di bianco d’uc gallina (HEL)	50 ng/ μ l in tampone ac mM pH 5,0	450	scFv(HEL-	da 100 nM a 5 nM
lisozima di bianco d’uc gallina (HEL)	50 ng/ μ l in tampone ac mM pH 5,0	450	scFvD1	da 100 nM a 5 nM
AMCV	50 ng/ μ l in tampone ac pH 3,0	3000	scFvF8	da 500 nM a 30 nM

Tabella 1

(1) RU = unità di risonanza

(2) Concentrazioni valide per l’analisi della forma ossidata e della forma ridotta di ciascun anticorpo, solubilizzate rispettivamente in PBS e PBS contenente DTT 12,5 mM

Per le interazioni scFvPVX-7F/PVX e scFvPVX-7G/PVX è stata seguita una strategia diversa. Su un 'sensor chip' CM3 sono state immobilizzate 3700 RU di anti-FLAG, usato alla concentrazione di 50 ng/μl in tampone acetato 10 mM pH 4,2. Sono stati quindi iniettati indipendentemente gli anticorpi purificati scFvPVX-7F e scFvPVX-7G ed è stato aggiunto il virus PVX in PBS. Per poter calcolare la cinetica di interazione sono state utilizzate diverse concentrazioni, da 180 nM a 40 nM, del frammento scFv, sia nella forma ossidata che nella forma ridotta, rispettivamente in PBS e in PBS con DTT 12,5 mM. E' stata invece mantenuta costante la concentrazione del virus PVX (700 ng/μl).

2.6 ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE

2.6.1 Preparazione del campione

Sono state seguite diverse procedure di estrazione delle proteine da tessuti vegetali, descritte di seguito, al fine di individuare il protocollo più efficace.

Estrazione TCA/acetone con e senza PVPP

Le foglie sono state triturate in mortaio in presenza di azoto liquido, fino ad ottenere una polvere fine. Questa è stata risospesa in una soluzione (quattro volte il volume della polvere) di acido tricloracetico (TCA) 10% in acetone, DTT 2%, inibitori di proteasi (“Complete EDTA-free”, Roche), con e senza polivinilpolipirrolidone 1% (PVPP), e lasciata precipitare per almeno 12 ore a -20°C. La sospensione è stata così centrifugata a 4°C per 60 min a 7400 xg. Il precipitato è stato risospeso in acetone contenente DTT 0,07% e inibitori di proteasi e lasciato per almeno 60 minuti a -20°C. Sono stati quindi eseguiti una serie ripetuta di lavaggi con acetone, DTT 0,07% e inibitori di proteasi, centrifugando a 7400 xg e rimuovendo il supernatante, fino ad ottenere un precipitato biancastro. Sotto flusso laminare, dopo 12 ore, è stato ottenuto un liofilizzato bianco che è stato risospeso nel ‘lysis buffer’, mediante agitazione a temperatura ambiente per circa un’ora. Il supernatante recuperato, dopo centrifugazione a 21.000 xg per 30 minuti, è stato sonicato per migliorare la solubilità delle proteine.

Estrazione con solvente acquoso seguita da precipitazione in TCA/acetone

La polvere fine ottenuta con azoto liquido è stata risospesa nel solvente di estrazione (KCl 0,1M, Tris-HCl 0,5M pH7,5, EDTA 0,5M, inibitori di proteasi, DTT 2%, PVPP 1%). La miscela è stata omogeneizzata in ghiaccio, in camera fredda a 2°C, utilizzando l’omogenizzatore a sonda tipo ‘Ultraturrax’ per 15-30 minuti complessivi, e centrifugata a 7400 xg per 60 minuti. Il supernatante è stato rimosso e le proteine costituenti sono state precipitate per aggiunta di quattro volumi di acetone contenente TCA 10%, PVPP 1%, DTT 2%, per 12 ore a -20°C. Il precipitato, recuperato dopo centrifugazione a 7400 xg per 60 minuti, lavato con metanolo e successivamente con acetone, è stato asciugato sotto flusso laminare. Il liofilizzato ottenuto è stato risospeso nel ‘lysis buffer’.

Estrazione TCA/acetone ed aggiunta di ammonio solfato

Il campione risospeso nel 'lysis buffer' ottenuto dall'estrazione TCA/acetone è stato nuovamente precipitato per aggiunta di ammonio solfato (85% p/v) e conservato per 12 ore a +4°C. Quindi il pellet ottenuto in seguito a centrifugazione a 14.000 xg per 30 minuti è stato nuovamente risospeso nel 'lysis buffer'.

Estrazione fenolo/acetato di ammonio in metanolo

Le foglie sono state triturate in azoto liquido fino ad ottenere una polvere fine, che è stata risospesa in una soluzione TNE (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5). E' stato quindi aggiunto lo stesso volume di fenolo equilibrato in TE (Tris/HCl 100 mM pH 7,8, EDTA 1 mM). La sospensione ottenuta è stata agitata vigorosamente per 1 minuto e posta in ghiaccio per un altro minuto; tale l'operazione è stata ripetuta per 10 minuti complessivi, seguita infine da una centrifuga a 3000 rpm per 10 minuti. La fase superiore acquosa è stata eliminata e sono stati aggiunti due volumi di fenolo equilibrato in TE. Infine sono stati aggiunti cinque volumi di ammonio acetato 0,1 M in metanolo, e la soluzione ottenuta è stata posta a -20°C per 12 ore e successivamente centrifugata a 950 xg per 10 minuti. Il supernatante è stato rimosso ed il precipitato è stato lavato con ammonio acetato 0,1 M in metanolo 80%, centrifugato nuovamente e risospeso in una soluzione di acetone 80%. L'acetone è stato rimosso dopo centrifuga a 7000 xg per 15 minuti ed il pellet ottenuto è stato asciugato sotto flusso laminare.

Estrazione fenolo/SDS

Il liofilizzato (0,1 g) ottenuto dalla precipitazione in TCA/acetone è stato risospeso in 800 µl di una soluzione di fenolo equilibrato in TE pH 8,0 a cui è stata aggiunta una soluzione SDS (800 µl): saccarosio 30%, SDS 2%, 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, DTT 5%. La miscela è stata agitata vigorosamente per trenta secondi e la fase fenolica è stata recuperata centrifugando a 10.000 xg per cinque minuti. Infine sono stati aggiunti cinque volumi di ammonio acetato 0,1 M in metanolo e la miscela è stata conservata a -20°C per trenta minuti. Le proteine precipitate sono state recuperate a 10.000 xg per cinque minuti, lavate due volte con ammonio acetato 0,1 M in metanolo 80% e successivamente con acetone. Il precipitato finale è stato asciugato e risospeso nel 'lysis buffer'.

2.6.2 Purificazione degli estratti proteici

I campioni vegetali provenienti dalle varie metodiche di estrazione sono stati purificati utilizzando il kit “Clean up” (Amersham Biosciences), secondo il protocollo consigliato dalla casa produttrice, e tutti i pellet ottenuti sono stati risospesi in 50µl di ‘lysis buffer’.

2.6.3 Determinazione della concentrazione proteica

E’ stato utilizzato il saggio di quantificazione Biorad DC Assay Kit (Biorad), compatibile con i detergenti presenti nel ‘lysis buffer’, e la sieralbumina bovina (BSA) come standard.

2.6.4 Colorazione con nitrato di argento

Metodo di Blum

Il gel è stato fissato per 30 minuti in 100 ml di soluzione di fissaggio a cui sono stati aggiunti 50 µl di formaldeide, è stato lavato per due volte per 10 minuti in etanolo al 50% e lasciato per 1 minuto nella soluzione di pretrattamento (100 ml di H₂O ultrapura e 200 µl di soluzione stock di tiosolfato). Sono stati eseguiti tre lavaggi in H₂O ultrapura per 20 secondi quindi è stata effettuata la colorazione mediante incubazione per 10 minuti in 100 ml di una soluzione di H₂O ultrapura contenente 200 mg di nitrato d’argento e 50 µl di formaldeide. Lo sviluppo è stato realizzato in 100 ml di soluzione di fissaggio, contenente 7 µl di soluzione stock di tiosolfato e 50 µl di formaldeide, fino ad ottenere l’intensità desiderata. La reazione di sviluppo è stata interrotta mettendo il gel nella soluzione di stop (Blum H. *et al.*, 1997).

Metodo di Shevchenko

Il gel è stato fissato per almeno 30 minuti nella soluzione di fissaggio (metanolo:acido acetico:H₂O nelle proporzioni 45:5:50); lavato per 60 minuti in H₂O ultrapura; sensibilizzato per 10 minuti con una soluzione di sodiotiosolfato 0,02% e lavato per due volte con H₂O ultrapura. Quindi il gel è stato colorato incubandolo per 40 minuti a 4°C in una soluzione di nitrato di argento 1 g/L e sviluppato in Na₂CO₃ 20 g/L, 4gtt NaOH

10 N, formaldeide 0,04 % fino all'intensità desiderata. La reazione di sviluppo è stata interrotta mettendo il gel in acido acetico 1% (Shevchenko A. *et al.*, 1996).

Metodo di Oakley

Il gel è stato fissato per 60 minuti in una soluzione di EtOH 40% e acido acetico 10%, successivamente lasciato per almeno 3 ore, in agitazione, in EtOH 5% e acido acetico 5%. E' stato poi lavato per 10 minuti in H₂O ultrapura, lasciato per 30 minuti a 4°C in CH₃COONa 0,5 M, glutaraldeide 2%, lavato per tre volte in H₂O ultrapura a 4°C e incubato per 60 minuti (due lavaggi da trenta minuti ciascuno) in una soluzione di sodiotiosolfato 0,02%. La colorazione è stata realizzata per incubazione per venti minuti in una soluzione di nitrato d'argento 8 g/L, di NaOH 0,02 N, ammoniaca 13 ml/L, H₂O ultrapura. Dopo quattro lavaggi in H₂O ultrapura il gel è stato sottoposto a sviluppo in una soluzione acido citrico 0,05%, formaldeide 0,037 %, in H₂O ultrapura. La reazione è stata arrestata in acetico 5% (Oakley B.R. *et al.*, 1980).

2.6.5 Marcatura con i fluorofori

Gli estratti proteici (50 µg) sono stati marcati individualmente con 200 pmoli di fluoroforo reattivo (Cy3, Cy5, Cy2), disciolto in dimetil formamide anidra. Ciascun campione è stato incubato con il rispettivo fluoroforo 30 minuti al buio e la reazione è stata bloccata al buio per aggiunta di lisina 10 mM. Ai campioni marcati è stato aggiunto lo stesso volume di '2x sample buffer'. Tutti e tre gli estratti proteici, marcati separatamente con le rispettive cianine, sono stati uniti ed è stato così aggiunto il solvente di reidratazione.

2.6.6 Separazione in prima dimensione: isoelectrofocalizzazione

Le 'strip' pH 3-10 di 18 cm (Amersham Biosciences) sono state reidratate a temperatura ambiente per almeno 12 ore, includendo nel tampone di reidratazione il campione da analizzare. La separazione è stata effettuata a 20°C con l'apparato di elettroforesi IPGPhor (Amersham Biosciences) seguendo i seguenti parametri: 300 V per 3 ore, 1000 V per 6 ore, 8000 V per 5 ore, applicando una corrente massima di 50 µA per strip.

Prima della seconda dimensione le 'strip' sono state equilibrate 15 minuti nel solvente di equilibratura (urea 8M, SDS 1% p/v, glicerolo 30% v/v, Tris 100 mM, pH 6,8, DTT 0.5%) e poi lavate nel tampone di corsa 1x.

2.6.7 Separazione in seconda dimensione: SDS-PAGE

I campioni sono stati separati utilizzando vetri di dimensione 26 x 20 cm (DIGE Ettan DALT gels, Amersham Biosciences). La soluzione di acrilamide-bisacrilamide è stata lasciata polimerizzare per almeno 12 ore. Le 'strip' equilibrate sono state poste sulla sommità di ciascun gel e ricoperte con 2 ml di agarosio 1% contenente bromofenoloblu. Sono stati utilizzati i seguenti parametri di corsa: 30 minuti a 2 W per gel, 4 ore a 20 W per gel, a 15°C.

2.6.8 Scansione delle immagini

I gel ottenuti sono stati scansionati mediante l'analizzatore di immagini Typhoon 9400 (Amersham Biosciences), che ha permesso la rilevazione dei tre fluorocromi attraverso l'eccitazione con tre diverse sorgenti laser, a 488 nm, a 532nm e a 633 nm, che eccitano rispettivamente il Cy3, il Cy2 e il Cy5. Prima della scansione finale ad alta risoluzione (100 μ m), tutte le immagini dei gel sono state prescansionate con una risoluzione di 1000 μ m per scegliere un'intensità di immagine compresa tra 40.000 U e 80.000 U.

2.6.9 Analisi differenziale

Le immagini dei gel sono state opportunamente tagliate, al fine di rimuovere aree estranee a quelle di interesse, utilizzando il programma ImageQuantTools (Amersham Biosciences). Le immagini sono state così analizzate utilizzando il software DeCyder Differential Analysis v5.0 (Amersham Biosciences), in grado di acquisire i dati del segnale fluorescente proveniente dai diversi campioni. Il numero di 'spot' stimati per ogni analisi è stato impostato a 2500. E' stato applicato un filtro di esclusione per rimuovere gli 'spot' con una pendenza ≥ 1 , per rimuovere contaminazioni non

desiderate. In particolare le immagini sono state processate dal modulo 'Batch Processor' (BP) e l'analisi inter-gel delle mappe proteiche standard (marcate con il fluoroforo Cy2) è stata effettuata utilizzando il modulo 'Biological Variation Analysis' (BVA). La valutazione statistica delle variazioni dei livelli di espressione proteica tra i campioni è stata effettuata mediante 'Student's T-test'.

2.6.10 Prelievo degli 'spot' proteici per l'identificazione

Un eccesso di proteine (200 µg) è stato caricato su un gel preparativo per poter individuare e prelevare lo 'spot' differenziale di interesse. Il gel preparativo è stato sottoposto alle stesse identiche condizioni di separazione del gel analitico. E' stato lasciato per 12 ore in soluzione di fissaggio (acido acetico 1% e metanolo 45%) e poi colorato con Coomassie colloidale decolorato in H₂O. Lo 'spot' di interesse è stato prelevato con punta sterile e decolorato in metanolo 50% e acido acetico glaciale 12%, prima della digestione proteolitica e dell'analisi di spettrometria di massa.

2.6.11 Analisi di spettrometria di massa

Lo 'spot' differenziale prelevato da gel è stato inviato al CNR di Napoli per la digestione e l'analisi mediante MALDI-TOF nell'ambito di una collaborazione con il gruppo diretto dal Dr. Andrea Scaloni.

3. RISULTATI

3.1. SELEZIONE DI NUOVI ANTICORPI DAI REPERTORI MOLECOLARI

3.1.1 Isolamento di anticorpi contro il virus PVX

Al fine di disporre di un maggior numero di anticorpi dalla “library F8”, oltre a quelli già selezionati e caratterizzati in precedenza, scFv(CMV-4G), scFv(HEL-11E), scFv(GST-5G) (Desiderio *et al.*, 2001), sono stati selezionati frammenti scFv specifici per il virus vegetale PVX (potato virus X). Il PVX, appartenente al genere dei Potexvirus, è un virus a RNA monopartito il cui genoma, di 6,4 Kb, è incapsidato in particelle di forma bastoncellare, costituite dall’associazione di 1300 copie della proteina di rivestimento.

Sono stati immobilizzati su immunotubo virioni integri di PVX 201 (Chapman *et al.*, 1995) in PBS, pH 7, condizioni che permettono di mantenere l’integrità del virus. Per effettuare analisi comparative è stata utilizzata anche la “library ETH”. Il numero di cicli di selezione da entrambe le library, F8 e ETH, è stato determinato sulla base del progressivo arricchimento in cloni specifici per il virus, dedotto dal titolo dei fagi policlonali dopo ogni ciclo di selezione. In particolare dopo quattro cicli di selezione contro il virus PVX le specificità di legame sono state determinate utilizzando i supernatanti monoclonali.

3.2 CARATTERIZZAZIONE DEI FRAMMENTI scFv SELEZIONATI

3.2.1 Sequenziamento e specificità di legame degli anticorpi

I fagi ottenuti dall'ultimo ciclo di "biopanning" sono stati utilizzati per infettare cellule di *E. coli* HB2151. Questo ha permesso di ottenere l'espressione dei scFv selezionati in forma libera e solubile nel periplasma batterico.

In seguito ad induzione delle colture cellulari è stata effettuata un'analisi di 100 cloni per ciascuna selezione mediante ELISA. La percentuale dei cloni positivi è risultata essere diversa per le due library (**tabella 1**). Sono stati selezionati e sequenziati solamente i cloni che mostravano segnale ELISA di almeno 3 volte superiore rispetto a quella del controllo negativo (**figura 1**). Dalla "library F8" sono state identificate cinque differenti sequenze aminoacidiche nelle CDR₃ dei frammenti variabili della V_H e della V_L, mentre dalla "library ETH" tutti i cloni hanno mostrato la stessa sequenza (**tabella 2**).

Gli estratti periplasmatici dei cloni selezionati per maggiore affinità di legame, sono stati analizzati mediante ELISA con antigeni non correlati al fine di valutarne la specificità di legame. Nessun anticorpo ha mostrato una cross-reattività aspecifica, tranne il clone 4E che è risultato riconoscere anche il virus CMV. I cloni 4D e 5D che hanno, invece, mostrato una bassa specificità di legame, sono stati esclusi dalle successive analisi di caratterizzazione (**figura 2**).

	[PVX]	Tampone di immobilizz.	n.cicli di selezione	Cloni positivi isolati
Library F8	10µg/µl	PBS	4	27/80
Library ETH	10µg/µl	PBS	4	10/80

Tabella 1. Condizioni di ‘biopanning’ adottate per la selezione di anticorpi contro il virus PVX dalla “library ETH” e dalla “library F8”

Library	clone	V _H -CDR ₃	V _L -CDR ₃
F8	3G/8D	CAR- NWRR -FDY	QQ- GASL -PWT
F8	4E/2G	CAR- GRHK -FDY	QQ- YGRR -PWT
F8	7F/2C	CAR- SWRR -FDY	QQ- GRNW -PWT
F8	4D	CAR- DQWR -FDY	QQ- GQLR -PWT
ETH	7G/2G/10D	CAK- SNRTP -FDY	NSS- RPRS -PYV

Tabella 2. Sequenza aminoacidica delle CDR₃ degli anticorpi ricombinanti isolati dalla “library F8” e dalla “library ETH”

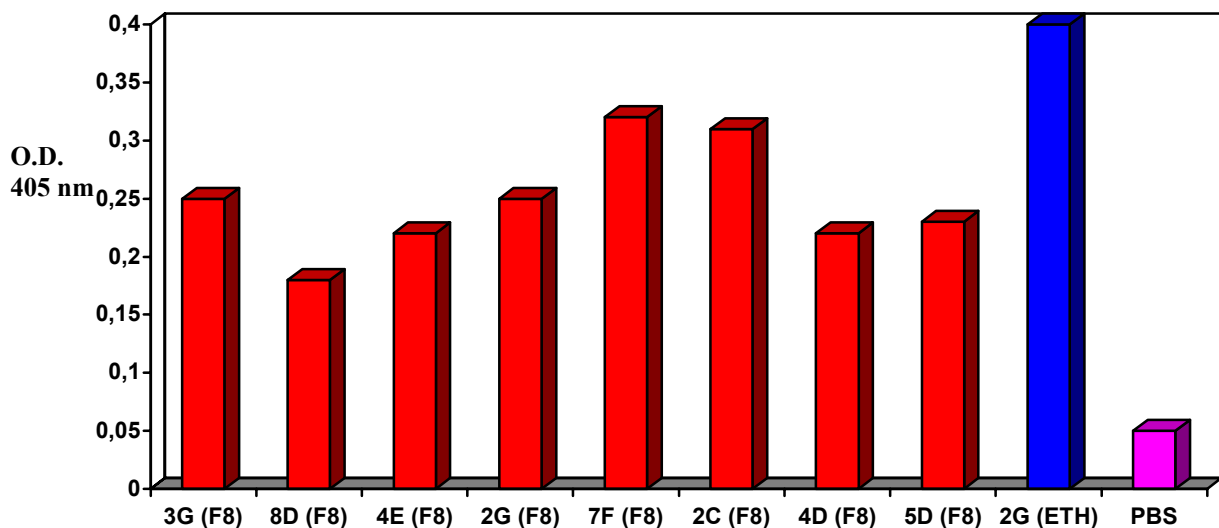


Figura 1. Cloni TG1 positivi provenienti dalle selezioni di ‘biopanning’ che hanno mostrato forti segnali ELISA. In rosso sono riportati i segnali dei cloni selezionati dalla “library F8”, in blu l’unico clone isolato dalla “library ETH”. La colonna in rosa rappresenta il controllo negativo

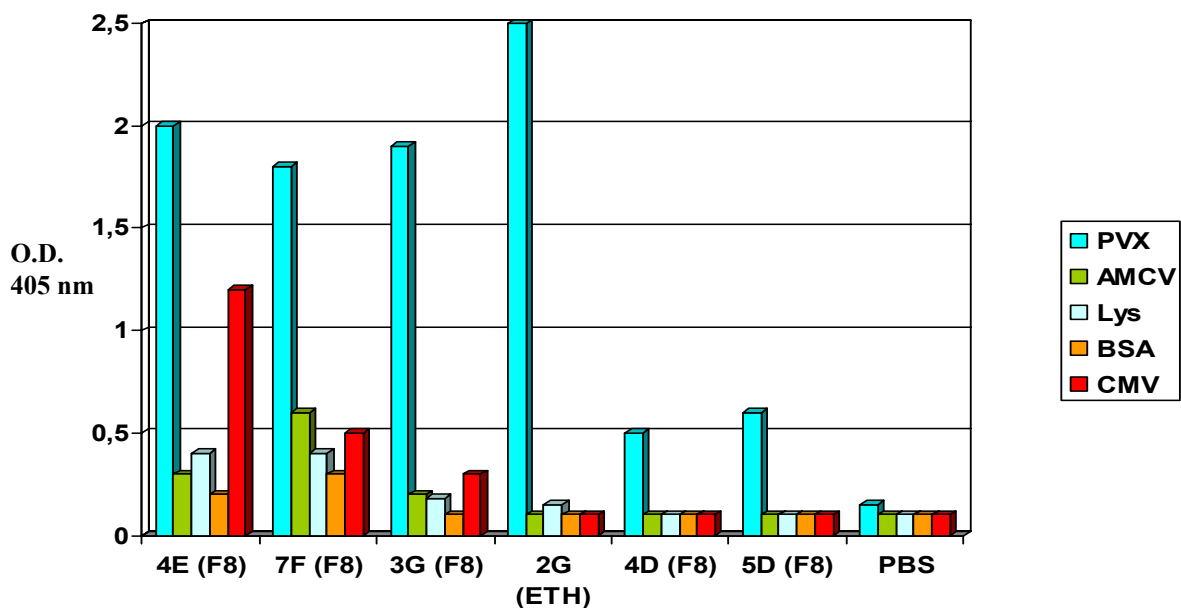


Figura 2. Analisi di cross-reattività mediante test ELISA dei frammenti scFv selezionati dalla “library F8” e dalla “library ETH” ed espressi come proteine solubili nel periplasma di cellule di *E. coli*. Ogni estratto è stato incubato con differenti antigeni non correlati immobilizzati su piastre ELISA: lisozima (Lys), albumina di siero bovino (BSA), virus del mosaico delle cucurbitacee (CMV), virus dell’accartocciamento maculato del carciofo (AMCV) e con il PVX. I segnali riportati sono stati ottenuti dopo un’ora di sviluppo.

3.3 ESPRESSIONE DEGLI ANTICORPI scFv SELEZIONATI NEL PERIPLASMA E NEL CITOPLASMA DI CELLULE BATTERICHE

3.3.1 Analisi dei frammenti scFv espressi nel periplasma di *E. coli*

Per ottenere l'espressione di tutti i prodotti di selezione, scFv(CMV-4G), scFv(HEL-11E), scFv(GST-5G), scFv(PVX-7F) e scFv(PVX-7G), nel periplasma batterico i plasmidi sono stati trasfettati nel ceppo HB2151 di *E. coli* che permette l'espressione di proteine sotto la regolazione del promotore *lacZ* inducibile con IPTG (isopropil-tio-galattosil-piranosio). Dopo l'induzione con IPTG, è stata effettuata l'estrazione delle proteine solubili dal periplasma batterico. Tutti i scFv espressi nel periplasma batterico sono stati estratti per shock osmotico e purificati per cromatografia di affinità sfruttando il legame con la proteina L. L'avvenuta purificazione è stata verificata mediante SDS-PAGE e successiva colorazione in nitrato di argento.

3.3.2 Costrutti per l'espressione dei frammenti scFv nel citoplasma batterico

Per verificare la funzionalità in ambiente citoplasmatico dei scFv selezionati, le sequenze codificanti i frammenti scFv sono state private della sequenza segnale *PelB* mediante clonaggio nel vettore di espressione pDNspe. Questo vettore è stato appositamente costruito a partire dal plasmide pDN332 (Neri *et al.*, 1996) tramite clonaggio nei siti *SphI* e *NcoI* di un frammento di DNA a doppia elica ottenuto per appaiamento di due oligonucleotidi, pHEN-intra-for e pHEN-intra-back, sintetizzati per introdurre un sito *SpeI*.

Le regioni codificanti i scFv sono state amplificate mediante la tecnica della PCR, utilizzando come innesco senso l'oligonucleotide DNspe-back complementare alla regione FR₁ della V_H, che introduce all'estremità 5' la sequenza riconosciuta dall'enzima *SpeI* e il codone ATG di inizio della trascrizione, e come innesco antisenso l'oligonucleotide VLg, complementare alla regione FR₄ della V_L e che contiene all'estremità 5' la sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione *NotI*. I prodotti di amplificazione attesi di 720 pb sono stati purificati, digeriti e clonati nei siti *SpeI* e *NotI* del plasmide pDNspe (**figura 3**).

I prodotti di ligazione, sono stati sequenziati per avere conferma del corretto clonaggio, utilizzando gli inneschi pHEN-back nell'orientamento senso e pHEN-for nell'orientamento anti-senso.

Strategia di clonaggio dei costrutti 'intra'

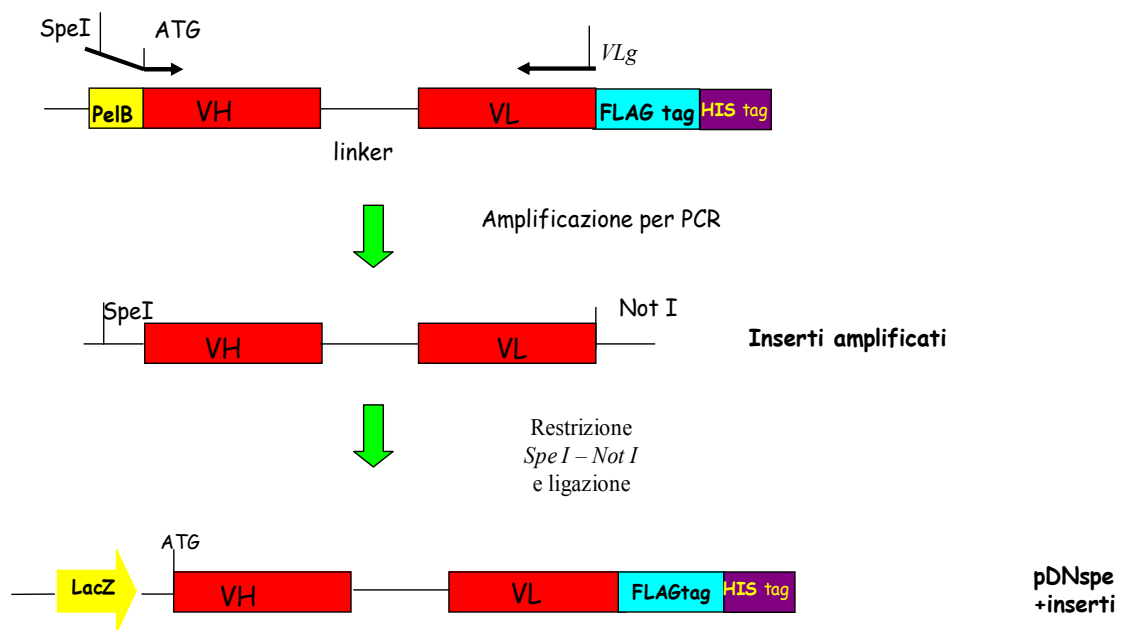


Figura 3. Schema di clonaggio delle sequenze codificanti i frammenti scFv privi della sequenza segnale PelB nel vettore di espressione batterica pDNspe. Il prodotto di amplificazione di 720 pb è stato clonato nel pDNspe attraverso restrizione e ligazione nei siti Spe I e Not I.

3.3.3 Studio delle condizioni riducenti

Dai dati in letteratura risulta che la quantità di agente riducente, il ditionitritolo (DTT), necessaria a ridurre anticorpi in formato scFv è di 12,5 mM (Martineau *et al.*, 1999). Si è voluto verificare questo dato anche sugli anticorpi in esame per essere certi di mantenere in forma ridotta i frammenti scFv estratti dal citoplasma batterico. A tale scopo tutti i frammenti anticorpali scFv purificati dal periplasma, quindi presenti in forma ossidata, sono stati incubati 10 minuti a temperatura ambiente con DTT a differenti concentrazioni (0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM, 12,5 mM). Lo stato ridotto di tutte le proteine è stato verificato in SDS-PAGE in condizioni non riducenti, valutando la diversa mobilità elettroforetica tra forma ossidata e forma ridotta. Tutti i scFv analizzati erano in forma ridotta anche dopo un'incubazione con DTT 1mM, ad eccezione del scFvD1.3, anticorpo anti-lisozima, utilizzato come controllo, che è rimasto in forma ossidata anche dopo un'incubazione con DTT 12,5 mM.

Si è quindi reputato che una concentrazione di 12,5 mM di DTT fosse più che sufficiente ad impedire la formazione dei ponti disolfuro nei frammenti scFv estratti da citoplasma.

3.3.4 Analisi dei frammenti scFv espressi nel citoplasma di *E. coli*

Tutti i costrutti privi della sequenza di secrezione *PelB*, sono stati espressi nel citoplasma di *E. coli*, seguendo la stessa procedura eseguita per l'espressione degli anticorpi nel periplasma batterico. In seguito all'induzione, i batteri sono stati precipitati per centrifugazione e risospesi in tampone PBS contenente DTT 12,5 mM, in modo da prevenire l'ossidazione artificiosa delle proteine citoplasmatiche. E' stata tentata la purificazione dei frammenti scFv espressi nel citoplasma per cromatografia di affinità utilizzando la proteina L, come nel caso degli estratti periplasmatici. In questo caso, però, la quantità di proteina purificata si è rivelata troppo bassa. Rese migliori sono state ottenute mediante cromatografia a scambio ionico, che consentono una purificazione parziale dell'estratto proteico citoplasmatico. Sono state utilizzate due diverse resine a scambio anionico: DEAE-Sepharose e Q-Sepharose. Il grado di purificazione è stato

esaminato su SDS-PAGE, seguita da colorazione con Comassie. L'efficienza di purificazione è stata verificata mediante Western blotting, impiegando per il riconoscimento dei frammenti scFv l'anticorpo anti-FLAG M2 (Sigma) che riconosce una sequenza peptidica 'tag' all'estremità carbossi-terminale di tutti gli anticorpi. Il risultato è riportato nella **figura 4** (purificazione con DEAE-Sepharose) e nella **figura 5** (purificazione con Q-Sepharose). La cromatografia su Q-Sepharose ha permesso di ottenere rese più alte ed è stata quindi adottata per le purificazioni preparative.

Le concentrazioni e la solubilità di tutti i frammenti ricombinanti espressi nel citoplasma e purificati, sono state determinate mediante SDS-PAGE comparando le proteine con standard noti (altri scFv purificati a diverse concentrazioni). La differente mobilità elettroforetica, in condizioni denaturanti ma non riducenti, tra le forme ridotte ed ossidate ha permesso di dimostrare il mantenimento dello stato ridotto degli anticorpi (**figura 6**).

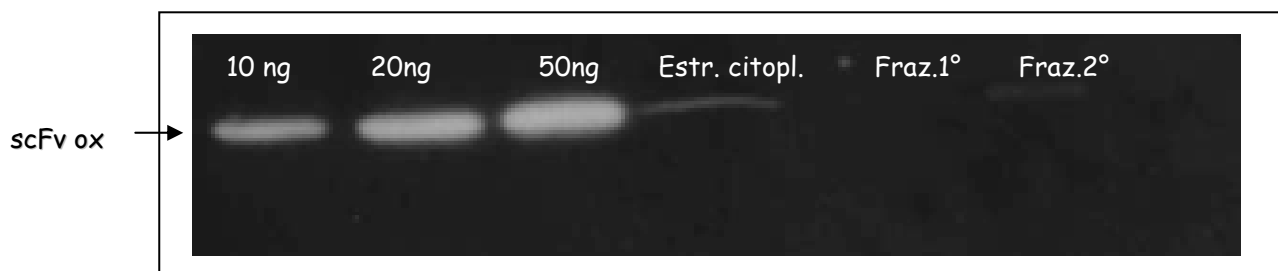


Figura 4. Purificazione di un estratto citoplasmatico con resina DEAE-Sepharose



Figura 5. Purificazione di un estratto citoplasmatico con resina Q-Sepharose

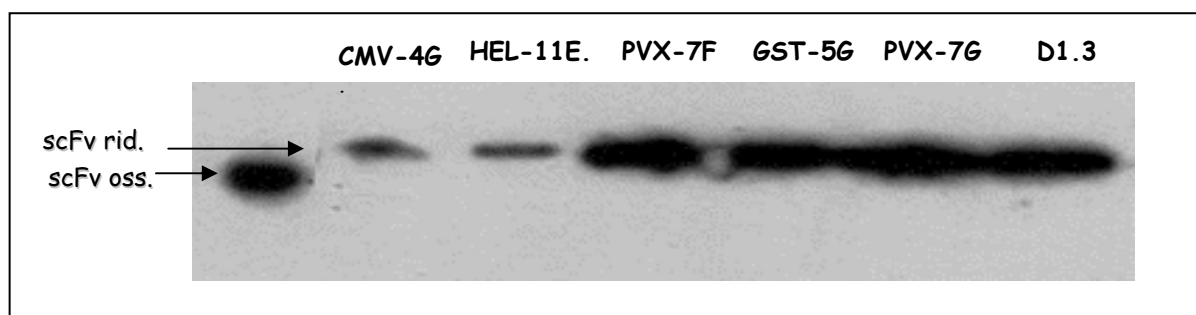


Figura 6. Western blot di tutti i frammenti scFv espressi nel citoplasma batterico. Gli anticorpi sono stati estratti in presenza di DTT e analizzati mediante SDS-PAGE non riducente. La differente mobilità elettroforetica tra la forma estratta dal periplasma e quella estratta dal citoplasma dimostra lo stato ridotto delle proteine citoplasmatiche.

3.4 ANALISI DELLE COSTANTI DI AFFINITÀ ANTIGENE-ANTICORPO

3.4.1 Studio dei parametri cinetici di interazione

Per completare il quadro di caratterizzazione del repertorio F8, si è reputato necessario dimostrare, in modo inequivocabile, mediante analisi di risonanza plasmonica di superficie (SPR), che tutti gli anticorpi selezionati della “library F8” fossero in grado di mantenere la loro funzionalità in ambiente citoplasmatico, quindi in assenza di ponti disolfuro. Le costanti di associazione (K_{on}) e di dissociazione (K_{off}) di tutti i frammenti scFv sono state determinate utilizzando il biosensore Biacore X. L’analisi è stata condotta immobilizzando i ligandi sulla superficie del ‘sensor chip’, che forma la parete di una micro cella, dove viene fatto fluire il campione. L’analita di interesse interagisce con il ligando immobilizzato, tale interazione è direttamente correlata alla concentrazione dell’analita sulla superficie.

Il risultato dell’analisi SPR è un sensorgramma, un grafico che riporta il cambiamento di unità di risonanza (RU) in funzione del tempo permettendo, quindi, di seguire in tempo reale la cinetica di associazione e di dissociazione dell’analita. Nella **figura 7** sono riportati i sensorgrammi ottenuti per i diversi anticorpi alle varie concentrazioni. L’aumento in unità di risonanza (RU) che indica il legame dell’anticorpo all’antigene immobilizzato, rappresenta l’inizio della fase di associazione che termina con una linea di soglia. Questa rappresenta la fine della fase di associazione ed è dovuta alla saturazione dei siti di legame indicando, pertanto, il raggiungimento di un equilibrio dinamico tra associazione e dissociazione. La diminuzione nelle RU dalla linea di soglia, infine, rappresenta la fase di dissociazione del complesso antigene-anticorpo causata dal lavaggio della superficie con il tampone.

Per ogni curva di interazione è stato possibile estrapolare i parametri cinetici. L’affinità di legame di ciascun anticorpo scFv è stata valutata sia nella forma ossidata che nella forma ridotta. Quest’ultima è stata ottenuta sia estraendo in condizioni riducenti l’anticorpo scFv espresso nel citoplasma batterico, sia riducendo chimicamente la forma ossidata prodotta nel periplasma, al fine di disporre di un controllo per l’analisi. Sono state misurate le cinetiche di interazione della forma ossidata e ridotta di ciascun scFv verso i corrispondenti antigeni: il virus AMCV per scFv(F8), il lisozima per scFv(HEL11E) e per scFv(D1.3), il virus CMV per scFv(4G), il virus PVX per scFv(PVX7F) e scFv(PVX7G), la proteina GST per scFv(GST5G). L’anticorpo scFvF8

è stato utilizzato come controllo positivo, in quanto ha fornito la struttura portante su cui è stata costruita la “library F8”. Come controlli negativi sono stati utilizzati gli anticorpi scFv(D1.3), derivato da un anticorpo monoclonale specifico per il lisozima e il frammento scFv, selezionato dalla “library ETH”, specifico per il virus vegetale PVX. La costante di dissociazione (K_D), data dal rapporto tra la K_{off} e la K_{on} , indica i valori di affinità di legame tra antigene-anticorpo.

Come mostrato nella **tabella 3** tutti i frammenti derivati dalla “library F8” nella forma ridotta mostrano valori di affinità per i loro antigeni comparabili con quelli della forma ossidata. I valori della K_D sono dell'ordine di $10^{-7}M$. Al contrario, l'anticorpo scFv(D1.3), purificato dal citoplasma e mantenuto in forma ridotta, non è più in grado di legarsi al lisozima poiché perde la sua funzionalità nell'ambiente citoplasmatico per riduzione dei ponti disolfuro intracatena.

L'anticorpo scFv(PVX7G) selezionato dalla “library ETH”, nella forma ridotta conserva la sua capacità di legare il PVX ma con un'affinità più bassa. In particolare ha mostrato un basso valore della K_{on} , tuttavia compensato da un valore di K_{off} paragonabile a quello della forma ossidata.

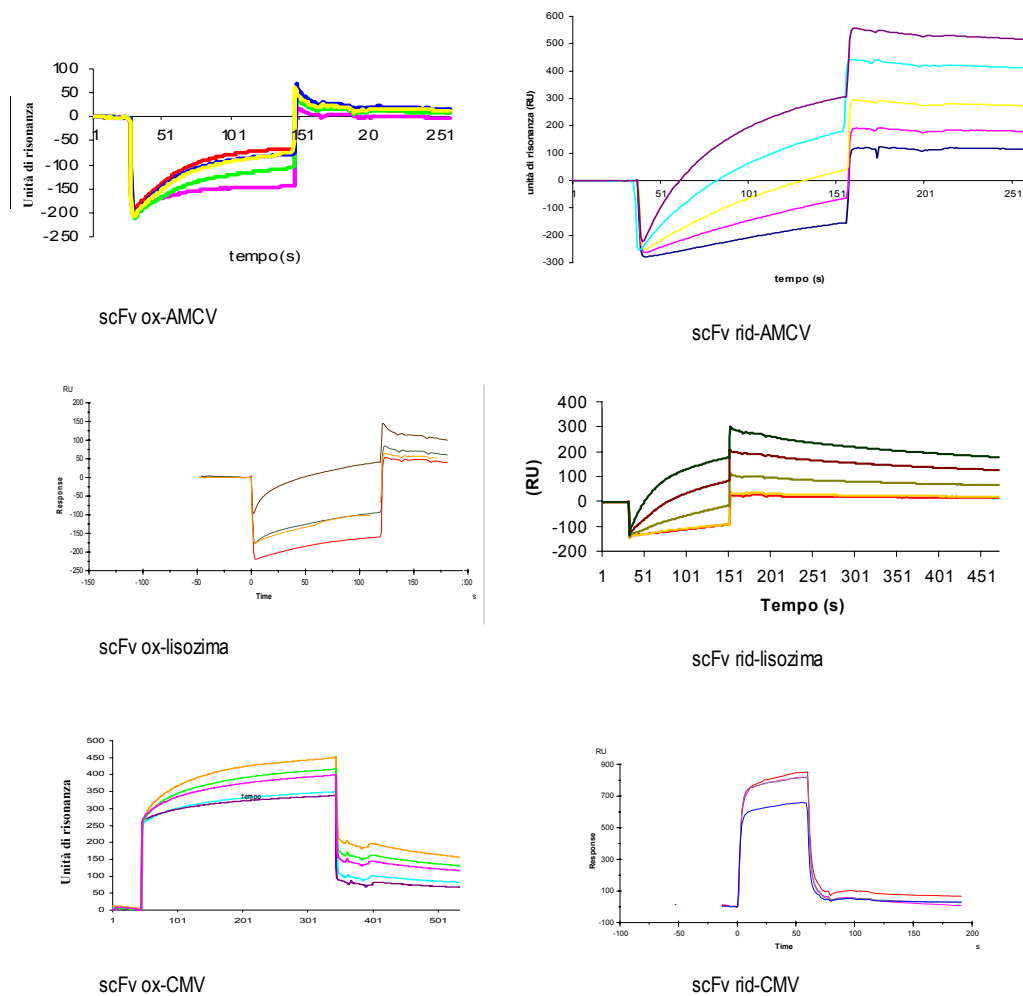
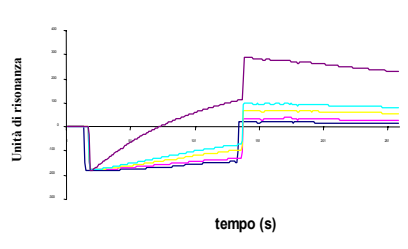
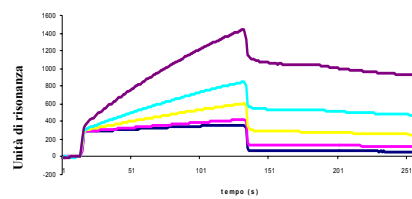


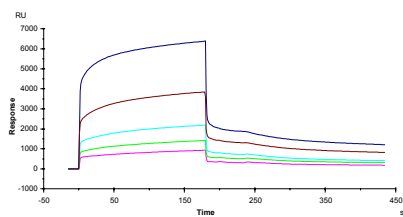
Figura 4. Analisi mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR). Sensorgrammi di curve sovrapposte a concentrazioni crescenti di analita sul chip dove sono stati immobilizzati i vari ligandi. **(continua)**



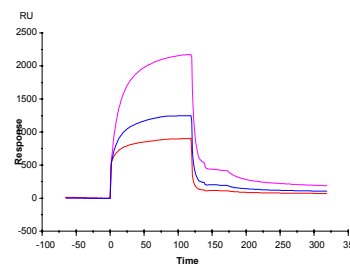
scFv ox (library F8)-PVX



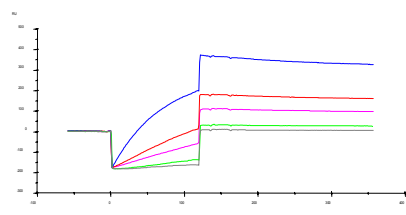
scFv rid.(library F8)-PVX



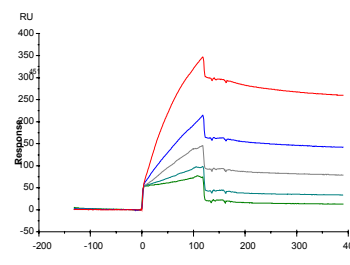
scFv ox (library ETH)-PVX



scFv rid. (library ETH)-PVX



scFv ox -GST



scFv rid -GST

Figura 4. Sensorgrammi di curve sovrapposte a concentrazioni crescenti di analita sul chip dove sono stati immobilizzati i vari ligandi.

	$K_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$K_{off} (s^{-1})$	$K_D (nM)$		
scFv selezionati dalla "library F8"	scFvF8 controllo positivo	8×10^4 $2,4 \times 10^4$ $5,2 \times 10^4$	$6,5 \times 10^{-4}$ $1,5 \times 10^{-4}$ $4,6 \times 10^{-4}$	8 6,3 8,8	ossidato oss.+DTT ridotto
	scFv HEL11E	$2,1 \times 10^4$ $2,6 \times 10^4$ $2,3 \times 10^4$	$2,2 \times 10^{-3}$ $2,4 \times 10^{-3}$ $2,2 \times 10^{-3}$	105 95 93	ossidato oss.+DTT ridotto
	scFvCMV 4G	$6,1 \times 10^3$ $7,2 \times 10^3$ $7,9 \times 10^3$	$1,4 \times 10^{-3}$ $1,4 \times 10^{-3}$ $1,3 \times 10^{-3}$	250 190 160	ossidato oss.+DTT ridotto
	scFvPVX 7F	$3,2 \times 10^4$ $2,6 \times 10^4$	$4,8 \times 10^{-3}$ $4,6 \times 10^{-3}$	150 175	ossidato ridotto
	scFvGST 5G	$8,5 \times 10^3$ $7,9 \times 10^3$	$2,4 \times 10^{-3}$ $2,6 \times 10^{-3}$	270 320	ossidato ridotto
	scFvD1.3 (controllo negativo)	$1,8 \times 10^5$ $1,3 \times 10^5$ N.R.	$2,2 \times 10^{-3}$ $2,2 \times 10^{-3}$ N.R.	11,8 16,1 N.R.	ossidato oss.+DTT ridotto
scFvPVX 7G (library ETH)	$6,2 \times 10^4$ $3,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^{-3}$ $1,7 \times 10^{-3}$	19 480	ossidato ridotto	

Tabella 3. Parametri di affinità antigene-anticorpo. Le costanti di associazione (k_{on}) e di dissociazione (k_{off}) sono state determinate mediante risonanza plasmonica di superficie. La costante di dissociazione all'equilibrio (k_D) è stata calcolata come k_{off}/k_{on}

3.5 ANALISI PROTEOMICA

3.5.1 Preparazione del campione per elettroforesi bidimensionale

La preparazione del campione rappresenta la fase più critica nello studio del proteoma. In questo lavoro di tesi sono state sperimentate differenti metodiche di estrazione su diversi tipi di tessuto (foglia di *Nicotiana benthamiana* e di *Lycopersicon esculentum* e frutto di fragola), al fine di ottenere un'alta rappresentanza proteica, una buona risoluzione ed una riproducibilità del sistema. Sono state valutate quattro metodiche di estrazione: la precipitazione dell'estratto proteico con acido tricloracetico (TCA) 10% in acetone (TCA/A) con e senza PVPP (polivinilpolipirrolidone), la precipitazione con ammonio solfato, il frazionamento proteico nella soluzione di fenolo, con e senza SDS, seguita da precipitazione ed infine la solubilizzazione proteica in un tampone acquoso e successiva precipitazione in TCA e acetone (TCA/B). Le caratteristiche qualitative degli estratti proteici ottenuti sono state valutate osservando separazioni SDS-PAGE sia mono- (**figura 5**) che bi-dimensionali (2-DE).

Le separazioni SDS-PAGE monodimensionali, sono state eseguite su estratti proteici di foglia di *N. benthamiana*. La qualità e la risoluzione delle bande proteiche presumibilmente riflettono le abbondanze relative dei contaminanti. E' evidente, sia nei gel monodimensionali che bidimensionali, come le contaminazioni, che appaiono come 'strisciate', elevato background di colorazione e distorsione delle bande, siano marcate negli estratti proteici ottenuti con il metodo TCA/B, dove sono anche meno presenti le proteine ad alto peso molecolare. La precipitazione con ammonio solfato, invece, pur allontanando gran parte delle contaminazioni ha causato anche una diminuzione della rappresentanza proteica. Gli estratti con il metodo del fenolo, senza l'aggiunta di SDS, ed il metodo TCA/A hanno generato campioni con pattern di bande proteiche simili e qualitativamente migliori rispetto agli altri metodi, con bande ben risolte e 'strisciate' relativamente ridotte.

Pur tuttavia i risultati ottenuti hanno dimostrato che l'uso del TCA 10% con i lavaggi in acetone e del fenolo da soli non sono sufficienti a rimuovere i contaminanti non proteici. La sonicazione seguita dalla purificazione dell'estratto proteico ha permesso di ottenere significativi miglioramenti nella qualità della risoluzione anche negli estratti di foglia da pomodoro, come è evidente dai gel bidimensionali mostrati nella **figura 8**. Nel frutto di fragola ricco di pectine, contaminanti polimerici solubili in fase acquosa che

formano aggregati viscosi, è stata ottenuta con il metodo del fenolo una più alta risoluzione delle proteine basiche e a basso peso molecolare (**figura 7**), mentre con il metodo TCA/A sono risultati maggiormente definiti gli spot ad alto e medio peso molecolare compresi nell'intervallo di pH tra 4 e 6.

L'aggiunta di PVPP agli estratti di foglie di pomodoro, non ha apportato significativi miglioramenti nella qualità dei gel (**figura 9**).

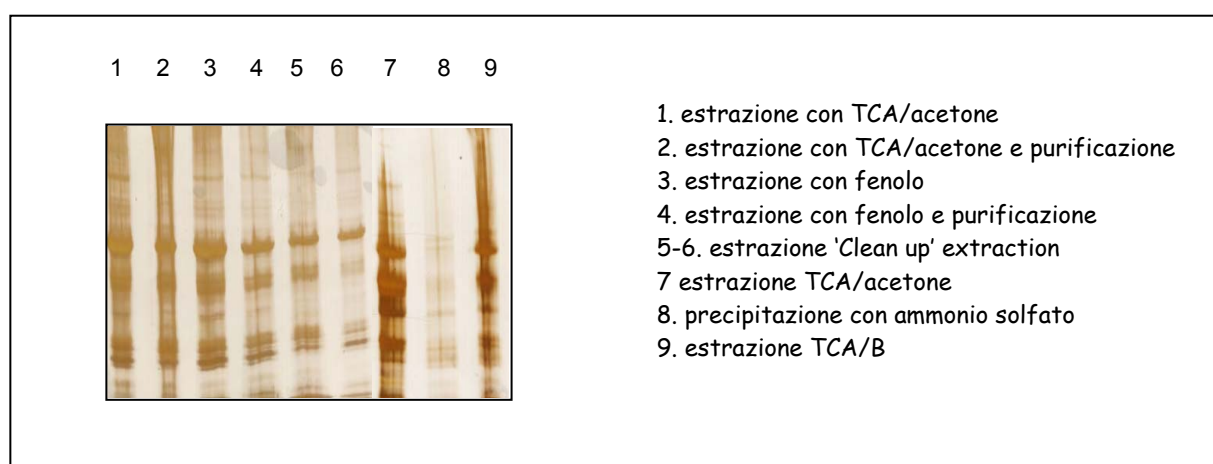


Figura 5. SDS-PAGE mono-dimensionale di estratti proteici da foglia di *N. benthamiana*

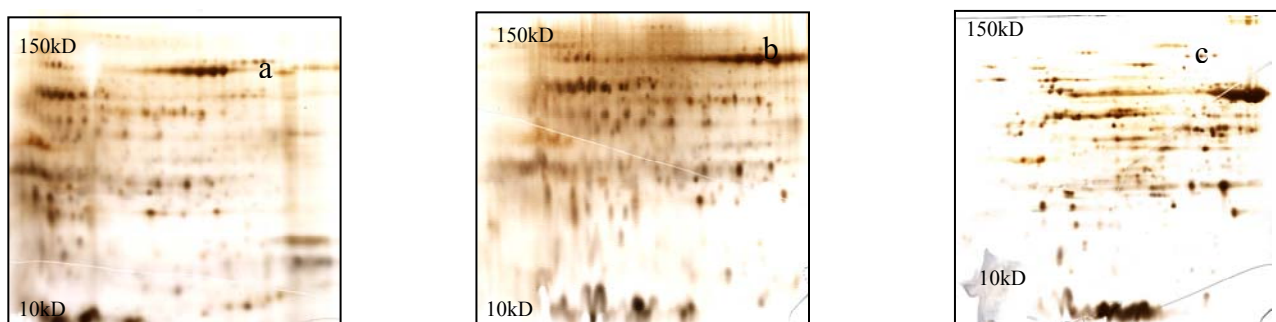


Figura 6. (a) Estrazione con il metodo TCA/acetone da foglie di *N. benthamiana*, strip cm 18 pH 3-10 NL. (b) Estrazione con il metodo TCA/B da foglie di *N. benthamiana*, strip cm 18 pH 4-7. (c) Estrazione con il metodo SDS/fenolo/acetato di ammonio da foglia di *N. benthamiana*, strip cm 18 pH 4-7.



Figura 7. *(a) Estrazione proteica con il metodo TCA/acetone da frutto di fragola. (b) Estrazione proteica con il metodo fenolo/acetato di ammonio da frutto di fragola. La separazione delle proteine (100 μ g), in entrambi i gel, è stata realizzata su strip 18 cm pH 3-10 NL.*

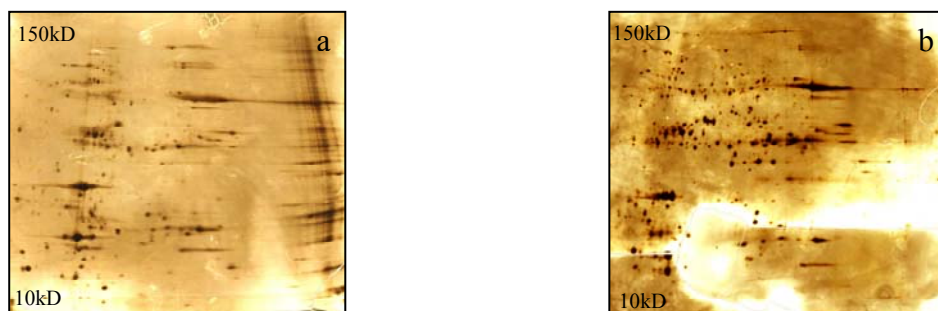


Figura 8. *Confronto degli estratti proteici (100 μ g) da foglia di pomodoro con (b) e senza (a) purificazione mediante il kit “clean up” (Amersham), strip 18 cm pH 3-10 NL.*

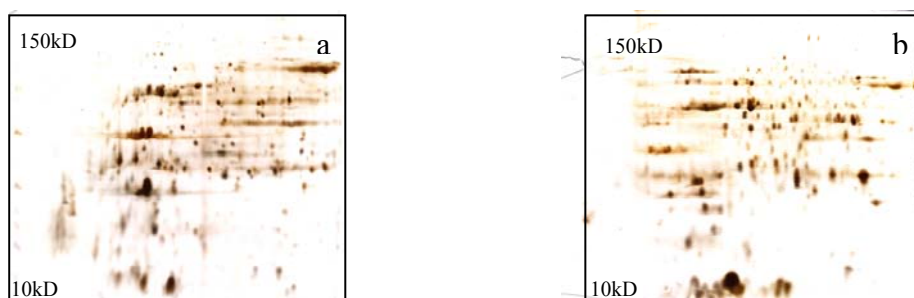


Figura 9. *Estrazione proteica da foglie di pomodoro con il metodo TCA/acetone senza (a) e con (b) PVPP, strip 18 cm pH 4-7.*

3.5.2 Disegno sperimentale per l'analisi DIGE (“two-dimensional difference in gel electrophoresis”)

Mediante un approccio proteomico è stata investigata la validità degli anticorpi selezionati dalla “library F8” per la preparazione di piante resistenti a patogeni.

Il presente lavoro di tesi ha previsto il confronto a livello proteomico tra le piante transgeniche di Micro-Tom (varietà nana di pomodoro) che esprimono il scFv(CMV-4G) e quelle non GM. A differenza dell'analisi 2D classica che prevede una colorazione del gel, generalmente con comassie o nitrato d'argento, successiva alla seconda dimensione, con il sistema DIGE vengono utilizzati marcatori fluorescenti, che legano le proteine prima dell'isoelettrofocalizzazione. A questo scopo si utilizzano tre molecole della famiglia delle cianine (Cy3, Cy2 e Cy5), chimicamente simili ma spettralmente diverse, che si legano al gruppo amminico del carbonio ϵ della lisina.

Il disegno sperimentale, nella tecnologia DIGE, è cruciale per ottenere risultati statisticamente significativi. I campioni che si vogliono comparare tra loro sono stati marcati ognuno con un fluoroforo diverso, caricati in un unico gel, scansionati e successivamente confrontati (**figura 10**). Ciascun campione è stato rappresentato almeno tre volte, e marcato alternativamente con tutti i fluorofori al fine di diminuire l'errore dovuto alle diverse caratteristiche di fluorescenza, particolarmente accentuato per gli ‘spot’ di piccolo volume. In ogni gel due diversi campioni sono stati confrontati tra loro e con uno standard interno (**figura 11**). Quest'ultimo è il risultato della miscela di tutti i campioni presenti nell'esperimento. Lo standard interno permette di distinguere una variazione di espressione biologica da un errore sperimentale, riducendo anche il numero dei gel da analizzare.

La strategia sperimentale, riportata nello schema, ha previsto l'analisi di campioni transgenici e non GM ottenuti da quattro estrazioni indipendenti (1A, 2A, 1B, 2B) e provenienti ciascuno da foglie di quattro differenti piante di Micro-Tom (**tabella 3**).

Gel	Cy3	Cy5	Cy2
Gel 1	Sample 1A replicate 1	Sample 1B replicate 1	Pool
Gel 2	Sample 2A replicate 1	Sample 2B replicate 1	Pool
Gel 3	Sample 1B replicate 2	Sample 2A replicate 2	Pool
Gel 4	Sample 2B replicate 2	Sample 1A replicate 2	Pool
Gel 5	Sample 2A replicate 3	Sample 2B replicate 3	Pool
Gel 6	Sample 1A replicate 3	Sample 1B replicate 3	Pool

Tabella 3. Disegno sperimentale per l'analisi BVA (Biological Variation Analysis)

1A: WT. 2A: WT. 1B: GM. 2B: GM

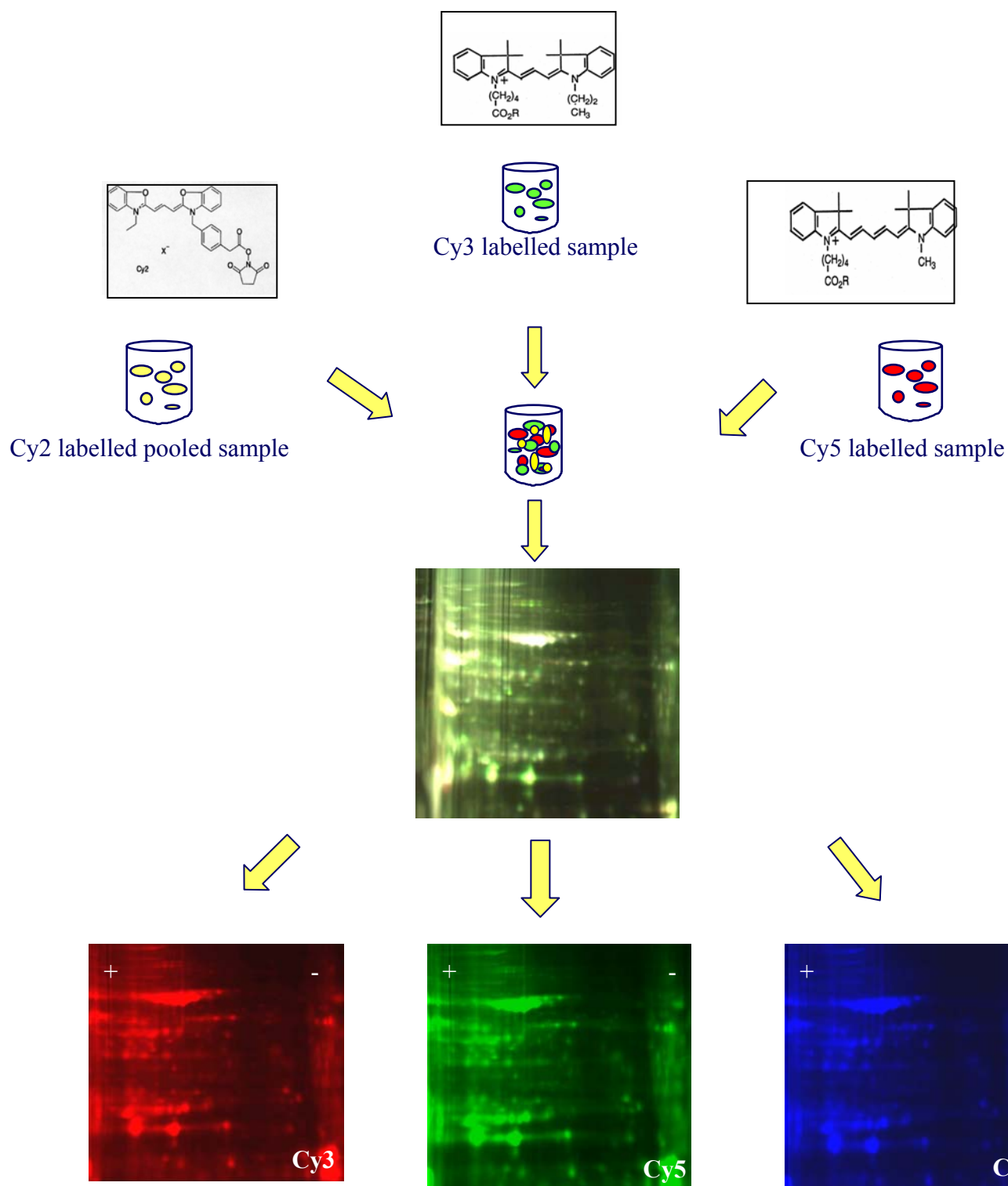


Figura 10. Analisi DIGE applicata ai campioni di foglia di pomodoro, utilizzando strip 18 cm pH 3-10.

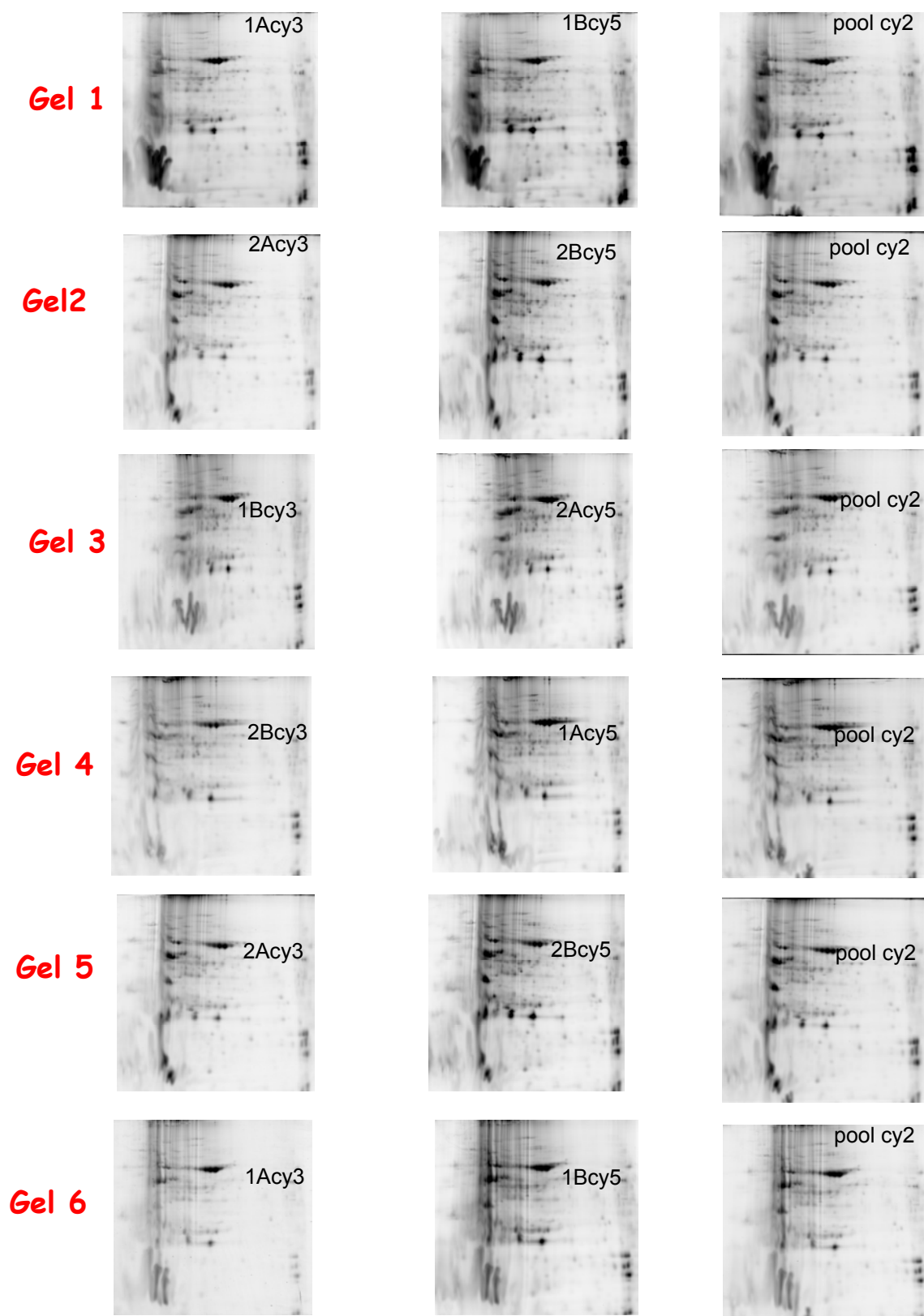


Figura 11. Scansione delle immagini al Typoon. In ogni gel i due campioni di foglia di pomodoro, trangenici e non GM, sono stati confrontati con lo standard interno marcato con il cy2. Ciascun campione è stato rappresentato tre volte e marcato alternativamente con il cy5 e il cy3.

3.5.3 Analisi differenziale

Dopo l'elettroforesi bidimensionale i tre campioni, marcati con i fluorofori Cy2, Cy3 e Cy5, di ciascuno dei sei gel, sono stati individualmente scansionati utilizzando le appropriate lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione. Il software utilizzato (vedi materiali e metodi) attraverso il rilevamento simultaneo dei tre segnali elabora un'analisi precisa, con un'elevata affidabilità statistica, che permette di individuare ed appaiare tutte le proteine presenti nei campioni, mettendo in evidenza anche minime differenze di espressione.

Il confronto automatico effettuato dal modulo BP (Batch Processor) è stato attentamente controllato affinché la stessa proteina fosse confrontata tra i vari gel. Quindi tutte le immagini marcate con il Cy2 sono state confrontate manualmente con il 'master gel', scelto per la migliore risoluzione tra tutte le sei mappe proteiche marcate con il Cy2. Il BVA ha consentito di confermare gli spot corretti e sostituire quelli non corretti.

L'analisi statistica è stata effettuata mediante Student's T-test. Il valore della probabilità statistica per una singola proteina, derivato da tutte le immagini dei gel, è stato considerato significativo per valori di T-test inferiori a 0.01. Inoltre le variazioni statistiche che sono state considerate valide sono quelle per cui sono stati ottenuti dei rapporti tra i campioni analizzati maggiori o minori di 1,5. Criteri come il profilo tridimensionale, il volume dello 'spot' e la presenza dello 'spot' nella maggior parte delle immagini dei gel hanno aiutato a decidere se confermare una proteina differenziale. Sono state evidenziate solamente poche differenze di espressione proteica tra il Micro-Tom transgenico e quello non GM (**figura 12**). Solamente uno spot ha mostrato una significativa variazione statistica, con un valore di rapporto superiore a 4, che molto probabilmente, sulla base del punto isoelettrico e del peso molecolare, corrisponde al frammento scFv espresso per interferire con l'attività virale (**figura 13**).

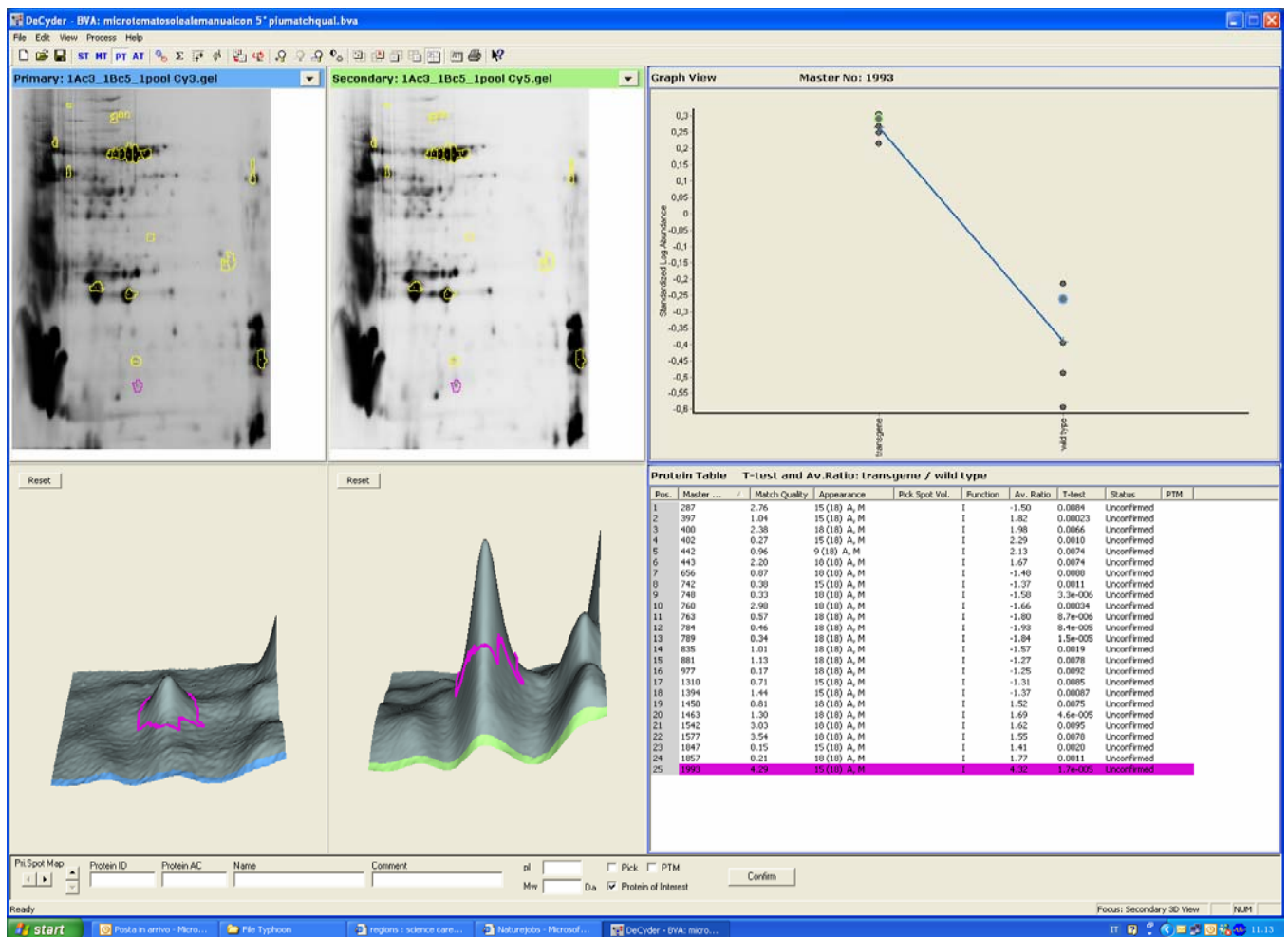


Figura 12. Analisi BVA. I valori statistici sono stati considerati affidabili per valori di Average ratio ≥ 1.5 , T-test ≤ 0.01 , Vol. $\geq 10^5$.

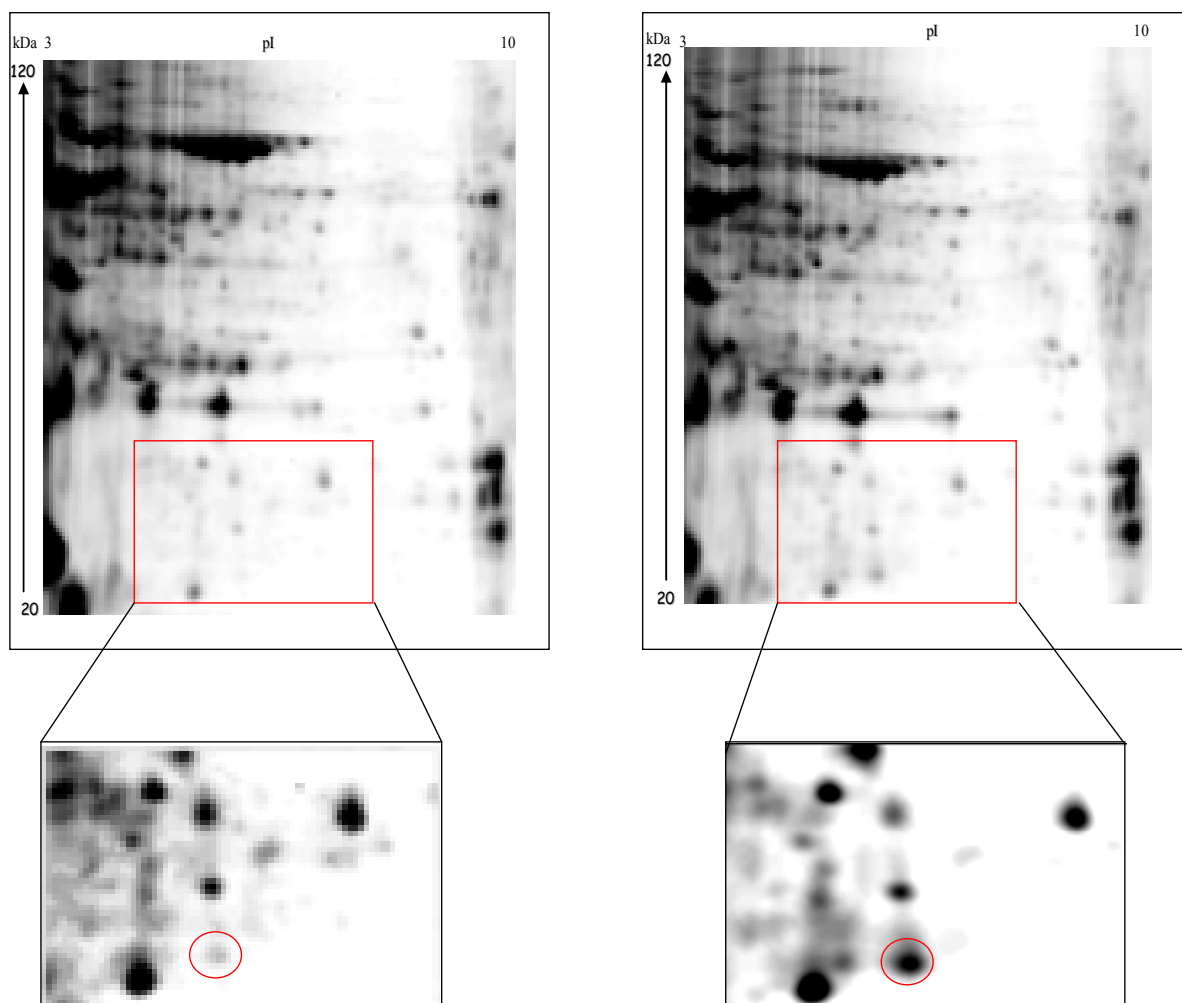


Figura 13. Confronto delle mappe proteiche di foglia di pomodoro 'wild type' (sulla sinistra) e transgene (sulla destra). Evidenziato lo 'spot' che ha mostrato, in seguito ad analisi statistica, una variazione di espressione significativa con un valore di rapporto transgene/'wild type' superiore a quattro.

4. DISCUSSIONE

Per molte applicazioni è necessario disporre di ligandi specifici in grado di interagire con molecole espresse all'interno della cellula, allo scopo di ottenere una interferenza funzionale o per studiare l'espressione e la localizzazione di un bersaglio molecolare d'interesse. Gli anticorpi rappresentano i reagenti di elezione per questo genere di applicazioni, ma il citoplasma, caratterizzato da condizioni riducenti e dall'assenza di proteine che assistono il ripiegamento molecolare, costituisce un ambiente sfavorevole per tutte le molecole naturalmente destinate alla secrezione come gli anticorpi. Questo limite riguarda anche gli anticorpi ricombinanti in formato scFv che nel compartimento citoplasmatico non riescono a costituire i due ponti disolfuro intracatena, uno per ogni dominio, e risultano pertanto non funzionali e soggetti a degradazione.

Solo pochissimi anticorpi, dotati di proprietà termodinamiche intrinseche particolari, hanno la capacità di raggiungere un ripiegamento funzionale anche senza l'ausilio di legami disolfuro. I numerosi studi effettuati al fine di approfondire e risolvere questo problema sembrano indicare che questa capacità dipende dalla struttura primaria della molecola in modo non ancora prevedibile a priori (Proba *et al.*, 1996; Worn & Pluckthun, 1998). Tra questi rari anticorpi vi è il frammento scFv(F8), che è stato isolato e caratterizzato in dettaglio, rivelando una stabilità eccezionalmente alta e un'insolita capacità di ripiegamento funzionale in condizioni riducenti (Tavladoraki *et al.*, 1999).

Le peculiari proprietà di questo anticorpo hanno portato al suo impiego come struttura di base per la costruzione di una collezione di anticorpi con le stesse qualità molecolari, ma con nuove specificità di legame. Questo repertorio, chiamato "library F8", è stato realizzato attraverso mutagenesi combinatoriale della struttura dell'anticorpo scFv(F8) in quattro posizioni definite nelle CDR₃ dei domini V_H e V_L (Desiderio *et al.*, 2001). Tutti gli anticorpi isolati dalla "library F8", per selezione contro diversi antigeni, hanno dimostrato buoni livelli di espressione, ottima stabilità termodinamica (verificata tramite studi di denaturazione e rinaturazione *in vitro*) ed un'eccellente solubilità nel citoplasma di cellule batteriche (Desiderio *et al.*, 2001).

Ciò che restava da dimostrare in maniera definitiva era la capacità degli anticorpi componenti la "library F8" di rimanere funzionali nelle condizioni riducenti del citoplasma. Per chiarire questo aspetto e validare quindi il repertorio come fonte di

anticorpi stabili e funzionali nel citoplasma, si è deciso di studiare le cinetiche di interazione anticorpo-antigene attraverso l'analisi di risonanza plasmonica di superficie (SPR). La finalità di tale studio è stata quella di misurare e confrontare le costanti di affinità della forma ossidata e ridotta di ciascun scFv selezionato, stabilendo così la capacità di questi frammenti anticorpali di riconoscere il corrispondente antigene anche in assenza di ponti disolfuro.

Al fine di rendere l'analisi più accurata e generalizzabile all'intero repertorio si è deciso di incrementare il numero di frammenti scFv a specificità nota derivanti dalla "library F8". Sono stati quindi selezionati e caratterizzati nuovi anticorpi contro il virus vegetale PVX, scelto per la sua importanza agronomica e per la sua attinenza con altri progetti in corso nel gruppo di ricerca. Per disporre di un controllo sono stati selezionati anticorpi scFv specifici per il PVX anche da un repertorio diverso, chiamato "library ETH". La "library ETH" è stata costruita sulla base di sequenze di linee germinali umane, note per la loro stabilità, risultando in una collezione di 6×10^8 cloni differenti (Pini *et al.*, 1998).

Per la selezione dei due repertori sono stati applicati i protocolli 'standard' di 'biopanning'. La percentuale e la reattività dei cloni positivi al termine di ogni selezione è risultata differente per i due repertori. Dalla selezione della "library F8" sono stati isolati quattro diversi cloni caratterizzati da differenti sequenze aminoacidiche a livello delle CDR₃, mentre i cloni ottenuti dalla 'library-ETH' sono risultati tutti con la stessa sequenza. L'unico frammento scFv della 'library-ETH' ha anche evidenziato una affinità per il PVX particolarmente alta, e questo potrebbe spiegare il fatto che durante il processo di selezione questo clone abbia preso il sopravvento sugli altri essendo avvantaggiato nella competizione per il legame con l'antigene rispetto a cloni diversi ma più deboli.

Tra gli anticorpi di nuova selezione sono stati scelti il clone originato dalla 'library-ETH', chiamato scFv(PVX-7G), e il migliore in termini di affinità tra i cloni originati dalla "library F8", chiamato scFv(PVX-7F). I due nuovi anticorpi contro il PVX, insieme ad altri precedentemente selezionati (tre anticorpi con specificità per il virus CMV, il lisozima d'uovo di gallina e la glutatione-S-transferasi rispettivamente) e all'anticorpo scFv(D1.3) anti-lisozima, utilizzato come controllo negativo, sono stati clonati per ottenere l'espressione nel periplasma e nel citoplasma batterico.

Per l'analisi dei frammenti anticorpali espressi nel citoplasma sotto forma ridotta si è posto il problema di mantenere lo stato ridotto durante il processo di estrazione e

purificazione degli anticorpi, prevenendo l'ossidazione spontanea delle molecole che si verifica nel momento in cui il campione viene in contatto con l'ossigeno dell'aria. Per individuare le condizioni sufficienti ad impedire l'ossidazione, gli anticorpi purificati dal periplasma in forma ossidata sono stati incubati con concentrazioni crescenti di un agente riducente, il ditioneitrato (DTT). Questo ha permesso di dimostrare che il DTT a basse concentrazioni (1 mM) è già in grado di ridurre i frammenti scFv provenienti dai repertori. Per impedire l'ossidazione degli anticorpi estratti dal citoplasma in forma ridotta è stata scelta una concentrazione di DTT di 12,5 mM, reputata ragionevolmente più che sufficiente. Un comportamento diverso è stato osservato per il frammento scFv(D1.3), noto per la sua stabilità relativamente bassa rispetto agli anticorpi della "library F8", ma nella media rispetto agli anticorpi riportati in letteratura (Tavladoraki *et al.*, 1999). Non è stato infatti possibile ridurre il scFv(D1.3), anche impiegando concentrazioni elevate di DTT. Questo potrebbe indicare che il ripiegamento di questo anticorpo è particolarmente compatto, impedendo l'accesso all'agente riducente che non ha quindi la possibilità di aprire i ponti disolfuro.

Tutti gli anticorpi sono stati espressi nel periplasma e nel citoplasma batterico e sono stati purificati nelle condizioni individuate. Dopo aver verificato per mobilità elettroforetica le condizioni redox dei frammenti scFv ottenuti, le forme ossidate e ridotte di ciascun clone anticorpale sono state sottoposte ad analisi di risonanza plasmonica di superficie (tecnologia Biacore). Come controllo di analisi sono stati usati gli anticorpi purificati in forma ossidata e ridotti *in vitro* per aggiunta di DTT. Tutti gli anticorpi derivati dalla "library F8" nella forma ridotta (prodotta *in vivo* o *in vitro*) hanno mostrato valori di affinità per i loro antigeni comparabili con quelli della forma ossidata, dimostrando quindi di essere in grado di riconoscere e legare gli antigeni contro cui sono stati selezionati anche in assenza dei legami disolfuro. Al contrario, l'anticorpo scFv(D1.3), purificato e mantenuto in forma ridotta, non è più in grado di legare il lisozima, probabilmente perché, come la maggior parte degli anticorpi, perde funzionalità nell'ambiente citoplasmatico. L'anticorpo selezionato dalla "library ETH", invece, pur conservando nella forma ridotta la sua capacità di legare l'antigene mostra valori di affinità notevolmente più bassi rispetto alla forma ossidata. Questo indica che anche anticorpi derivanti da un repertorio costruito su linee germinali umane molto stabili non raggiungono i livelli di stabilità registrati per tutti gli anticorpi della "library F8".

Pertanto la presente tesi ha permesso di dimostrare in modo inequivocabile che tutti i frammenti scFv della “library F8” sono in grado di ripiegarsi in maniera perfettamente funzionale nelle condizioni riducenti del citoplasma, non richiedendo la presenza dei legami disolfuro per raggiungere la stabilità molecolare. Questa osservazione, unita alla impossibilità di ridurre *in vitro* l’anticorpo scFv(D1.3), considerato un anticorpo dalle caratteristiche “classiche”, suggerisce che gli anticorpi dotati di particolare stabilità siano anche quelli con una insolita flessibilità di struttura, tale da sopportare modifiche conformazionali (quali la riduzione dei legami disolfuro) senza inficiare in modo sostanziale il ripiegamento. In altri termini, queste molecole sono dotate di stabilità termodinamica intrinseca talmente alta da ripiegarsi correttamente anche in condizioni non ottimali. Al contrario, anticorpi come il scFv(D1.3) sono più rigidi e la mancanza di legami interni che stabilizzano la conformazione risulta pesantemente incidente sul ripiegamento e quindi sulla funzionalità.

I risultati ottenuti, insieme all’evidenza che nessun anticorpo selezionato fin ora dalla “library F8” ha mostrato bassa stabilità, dimostrano che questo repertorio può essere utilizzato come fonte di anticorpi dotati di differenti specificità destinati all’espressione nel citoplasma cellulare. Anticorpi con queste caratteristiche, definiti ‘intrabodies’, sono particolarmente utili per identificare e localizzare proteine *in vivo*, o per immunomodulare specifiche funzioni proteiche.

Per fornire una validazione applicativa al repertorio analizzato si è ritenuto opportuno approfondire l’indagine su un esempio di impiego di un anticorpo isolato dalla “library F8” per interferire con il processo di infezione del virus del mosaico delle cucurbitacee (CMV) in pianta. Questo genere di approccio, già tentato con successo (Tavladoraki *et al.*, 1993; Boonrod *et al.*, 2004) prevede l’espressione dell’anticorpo in formato scFv nel citoplasma di cellule vegetali dove ha luogo il processo di scapsidamento e di replicazione del virus. Il frammento scFv contro il CMV, chiamato scFv(CMV-4G), è stato espresso nel citoplasma di piante di pomodoro che sono risultate resistenti al virus (Villani *et al.*, 2005).

Nell’ambito del presente lavoro di tesi si è voluto dimostrare, mediante un approccio proteomico, che l’espressione in pianta di un anticorpo intracellulare non solo è sufficiente a rendere la pianta resistente all’infezione, ma non comporta sostanziali alterazioni dei naturali livelli di espressione del proteoma della pianta, se non per la sintesi del prodotto del transgene. Questa evidenza valida ulteriormente l’impiego di ‘intrabody’ per approcci di immunomodulazione *in vivo*.

Per effettuare l'analisi proteomica è stata adottata la tecnologia DIGE, un sistema di marcatura ed analisi delle proteine particolarmente avanzato, che si avvale dell'elettroforesi bidimensionale come modello sperimentale. A differenza dell'elettroforesi 2D classica che prevede una colorazione del gel, successiva alla seconda dimensione (separazione proteica secondo il peso molecolare), con la tecnologia DIGE vengono utilizzati marcatori fluorescenti che legano covalentemente le proteine prima dell'isoelettrofocalizzazione (separazione proteica in prima dimensione secondo il punto isoelettrico), permettendo di correre nello stesso gel due campioni diversi. La tecnologia DIGE offre vantaggi eccezionali nel superare i vari problemi correlati con l'elettroforesi 2D tradizionale come la variazione sperimentale tra gel e gel, il limitato intervallo dinamico dei sistemi di post-colorazione (es. nitrato di argento), consentendo in ultimo anche una evidente riduzione dei tempi di analisi. E' una tecnologia recente ed ancora poco applicata nel campo vegetale dove potrebbe, invece, permettere analisi sensibili e statisticamente molto affidabili nello studio di proteomi di pianta (Kubis *et al.*, 2003; Rose *et al.*, 2004).

In generale l'analisi proteomica di tessuti vegetali è resa difficoltosa proprio dalla preparazione del campione. Infatti le cellule vegetali sono spesso ricche di proteasi e composti non proteici, principalmente fenoli, polisaccaridi, pigmenti e terpeni, che interferiscono severamente con la stabilità proteica (Gegenheimer *et al.*, 1990; Tsugita *et al.*, 1999). Questi contaminanti comigrano con le proteine durante l'elettroforesi bidimensionale, causando una scarsa risoluzione di separazione. I composti fenolici si possono legare alle proteine sia mediante interazioni reversibili (legame ad idrogeno), sia mediante legami covalenti, in seguito ad ossidazione, causando eterogeneità di carica ed una scarsa qualità dei gel (Carpentier *et al.*, 2005). Anche terpenoidi, pigmenti e lipidi conferiscono eterogeneità di carica che altera la migrazione proteica in prima dimensione. E' noto anche come i carboidrati possono bloccare i pori del gel causando precipitazione proteica ed un aumento dei tempi di isoelettrofocalizzazione. Il processo di estrazione diventa ancora più complicato quando le proteine sono estratte da piante mature dove è più difficile la rottura della spessa parete cellulare e quindi anche la rimozione dei contaminanti non proteici (Nazrul Islam *et al.*, 2004).

Nel tentativo di risolvere queste difficoltà sono state sperimentate e messe a punto diverse metodiche di estrazione e purificazione da differenti tessuti vegetali, al fine di ottenere un'alta solubilizzazione delle proteine ed una riproducibilità del metodo indispensabili per un'analisi bidimensionale valida ed affidabile.

L'estrazione con il fenolo seguita da precipitazione in ammonio acetato (Hurkman *et al.*, 1986) e l'estrazione che prevede direttamente la precipitazione con acido tricloracetico (TCA) in acetone (Santoni *et al.*, 1994), sono sembrate essere le più valide, permettendo la riproducibilità dei risultati e la rimozione di composti contaminanti non proteici. Il metodo TCA/acetone, inoltre, eliminando enzimi proteolitici o in generale di modificazione ha permesso di ottenere alte concentrazioni proteiche. Questa tecnica presenta comunque alcuni svantaggi, come una difficile risolubilizzazione delle proteine ed una bassa qualità dei gel, per la presenza di 'strisciate', soprattutto nella regione acida. L'aggiunta di PVPP, forte accettore di protoni quindi efficace nell'assorbimento di (poli)-fenoli, non ha apportato miglioramenti alla metodica di estrazione con il TCA. L'inefficacia è molto probabilmente dovuta all'alto pH del tampone di lisi, richiesto per la marcatura con i fluorofori, che mantiene i fenoli in forma ionizzata e quindi non assorbibili. La precipitazione con ammonio solfato, pur rimuovendo gran parte dei contaminanti, ha causato una perdita proteica, presumibilmente dovuta al fatto che molte proteine rimangono in soluzione anche ad alte concentrazioni saline. Una tale perdita non è compatibile con l'indagine proteomica, per la quale è indispensabile mantenere la più alta rappresentatività proteica possibile.

Il metodo del fenolo, si è dimostrato particolarmente efficace in campioni ricchi di contaminanti, come per esempio il frutto di fragola, in accordo con molti dati presenti in letteratura (Saravan *et al.*, 2004; Wei Wang *et al.*, 2003). Infatti, l'alto pH della soluzione di estrazione inibisce le più comuni proteasi, assicura che i composti fenolici più abbondanti siano per la maggior parte ionizzati inibendo i legami ad idrogeno con le proteine, ed infine neutralizza gli acidi che sono rilasciati dalla distruzione dei vacuoli. Tuttavia non è privo di svantaggi, quali l'alta tossicità del fenolo e le numerose fasi di esecuzione del protocollo che, prolungando i tempi di preparazione del campione, possono essere causa di artefatti non desiderabili.

Tra le varie metodiche di estrazione sperimentate quella che ha previsto la precipitazione con TCA, nonostante abbia dato profili proteici piuttosto simili a quelli ottenuti con il metodo del fenolo, è risultato essere il metodo più efficace nella preparazione dei campioni di pomodoro. La semplicità e la riproducibilità della metodica ha permesso di ottenere estratti proteici da foglia di pomodoro ben risolti per ampi intervalli di pH e con alte concentrazioni proteiche, necessarie per il successo della marcatura con i fluorofori. Utilizzando quindi il metodo di estrazione con TCA in

combinazione con la tecnologia DIGE, sono stati confrontati i profili proteici di due piante di pomodoro geneticamente modificate (GM) con quelli di due piante non GM cresciute nelle stesse condizioni, al fine di valutare eventuali differenze non previste nei profili di espressione proteica della pianta.

L'analisi statistica effettuata non ha evidenziato differenze di espressione significative tra i campioni di pomodoro transgenici e non GM, ad eccezione di uno 'spot' proteico che ha mostrato una variazione nei livelli di espressione quattro volte superiore nell'estratto transgenico rispetto all'estratto di pianta non trasformata, e che, sulla base del peso molecolare e del punto isoelettrico, dovrebbe corrispondere all'anticorpo scFv prodotto dal gene inserito. Questo 'spot' è stato prelevato e la sua identificazione definitiva è in corso di analisi tramite spettrometria di massa. Le altre variazioni osservate sono risultate comprese tra $\pm 1,2$ e $\pm 2,3$. Tali differenze sembrerebbero non significative, in quanto potrebbero rientrare nelle normali variazioni fisiologiche tra piante diverse. E' in programma l'analisi di altri campioni per verificare se queste differenze, per quanto limitate, sono confermate o se rientrano nella variabilità sperimentale.

Ancora molto pochi sono attualmente gli studi in letteratura che affrontano da un punto di vista proteomico gli effetti della manipolazione genetica sulla naturale espressione proteica nelle piante al fine di investigare l'equivalenza sostanziale tra piante transgeniche e le corrispondenti piante non GM. E' stato dimostrato che l'inserzione di un gene per la resistenza al virus TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus) in pianta di pomodoro non ha causato cambiamenti significativi nell'espressione proteica se comparata alla pianta non geneticamente modificata, evidenziando che l'unica differenza è dovuta al transgene (Corpillo *et al.*, 2004). E' questo il primo caso in cui una pianta transgenica, sia da un punto di vista proteomico che agronomico, può essere considerata sostanzialmente equivalente alla corrispondente pianta 'wild type'. Un'analisi proteomica ancora più dettagliata ha messo in evidenza che sono molte di più le differenze di espressione proteica tra diverse varietà di patata rispetto a quelle riscontrabili tra linee GM e le corrispondenti piante non GM (Lehesranta *et al.*, 2005).

I risultati da me ottenuti, pur necessitando di una ulteriore conferma, risultano in accordo con dati riportati in letteratura, indicando che l'inserzione in pianta del gene codificante per l'anticorpo scFv (CMV-4G) non influenza significativamente l'espressione di tutte le altre proteine normalmente espresse in pianta. Queste evidenze costituiscono il punto di partenza per un'ulteriore indagine volta a investigare le

eventuali differenze proteiche quali-quantitative tra le piante di pomodoro resistenti al CMV e quelle non GM quando sottoposte entrambe ad infezione virale. Questo studio permetterà di comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base della resistenza mediata dall'anticorpo scFv.

Il carattere innovativo dell'indagine proteomica condotta nell'ambito di questo lavoro di tesi è legato alla applicazione della tecnologia DIGE a sistemi vegetali, in particolare allo studio dell'equivalenza sostanziale di piante transgeniche. Questo aspetto della ricerca è di particolare attualità perché è sul principio della equivalenza sostanziale che si basa l'attuale normativa di regolamentazione degli OGM. Dimostrazioni scientifiche ben documentate potrebbero quindi contribuire all'accettabilità della pianta resistente per usi commerciali. Più in generale, studi proteomici, insieme ai metodi per lo studio delle alterazioni nell'espressione genica e dei potenziali cambiamenti nei profili dei metaboliti primari e secondari della pianta, potranno fornire informazioni cruciali per la soluzione scientifica di molti problemi legati alla sicurezza alimentare.

5. BIBLIOGRAFIA

Anderson, N.L., Matheson, A.D. & Steiner, S. (2000). Proteomics: applications in basic and applied biology. *Current Opinion in Biotechnology*. 11: 408-412.

Artsaenko, O., Peisker M., zur Nieden, U., Fiedler, U., Weiler, E.W., Muntz, K., Conrad, U. (1995). Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco. *Plant J*. 8:745-750

Barbas, C.F., Kang, A.S., Lerner, R.A., Benkovic, S.J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 7978-7982.

Benvenuto, E., Ordàs, R., Tavazza, R., Ancora, G., Biocca, S., Cattaneo, A., & Galeffi, P. (1991). 'Phytoantibodies': a general vector for the expression of immunoglobulin domains in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 17: 865-874.

Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M., Pierandrei-Amaldi, P., Cattaneo, A. (1995). Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochondria. *Biotechnology (NY)*. 13(10): 1110-5.

Biocca, S., Pierandrei-Amaldi, P. & Cattaneo, A. (1993). Intracellular expression of anti-p21^{ras} single chain Fv fragments inhibits meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 422-427.

Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., & Whitlow, M. (1988) Single-chain antigen-binding protein. *Science*. 242: 423.

Boonrod, K., Galetzka, D., D Nagy, P., Conrad, U. & Krczal, G. (2004). Single-chain antibodies against a plant viral RNA-dependent RNA polymerase confer virus resistance. *Nature biotechnology*. 22(7): 856-862

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.

Breitling, F., Dubel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I., and Little, M. (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 104(2): 147-153.

Brignole, C., Pastorino, F., Marimpietri, D., Pagnan, G., Pistorio, A., Allen, TM., Pistoia, V., Ponzoni M. (2004). Immune cell- mediated antitumor activities of GD2-targeted liposomal c-myc antisense oligonucleotides containing CpG motifs. *J. Natl. Cancer Inst.* 96: 1171-1180.

Carpentier, S.C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., and Panis, B., (2005). Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*. 5: 2497-2507.

Castellani, P., Viale G., Dorcaratto A., Nicolò G., Kazmarek J., Querce G. and Zardi L. (1991). The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *Int. J. Cancer* 59(5): 612-618.

Chapman, S., Kavanagh, T., and Baulcombe, D.C. (1992). Potato Virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J.* 2:549-557.

Chen, S. Y., Bagley, J., Marasco, W. A., (1994). Intracellular antibodies as a new class of therapeutic molecules for gene therapy. *Hum Gene Ther* 5(5): 595-601.

Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., and Winter, G., (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352: 624-628.

Corpillo, D., Gardini, G., Vaira, A.M., Basso, M., Aime, S., Accotto, G.P., Fasano, M., (2004). Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: The case of a virus-resistant tomato. *Proteomics*. 4:193-200.

Creighton, T. E., (1996). Disulfide bonds as probes of protein folding pathways. *Methods Enzymol.* 131:83-106.

Conrad U., Manteuffel R. (2001). Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plant cells. *TRENDS in Plant Science*. 6 (9): 399-402.

Dente L., Vetriani V., Zucconi A., Pelicci G., Lanfrancone L., Pelicci P.G. and Cesareni G. (1997). Modified phage peptide libraries as a tool to study specificity of phosphorylation and recognition of tyrosine containing peptides. *J. Mol. Biol.* 269: 694-703.

De Jaeger G., de Wilde C., Eeckhout D., Fiers E. and Depicker Ann (2000). The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. *Plant Molecular Biology* 43: 419-428.

Desiderio, A., Franconi, R., Lopez, M., Villani, M. E., Viti, F., Chiaraluce, R., Con salvi, V., Neri, D., Benvenuto, E. (2001). A Semi-synthetic Repertoire of Intrinsically stable antibody fragments derived from a single-framework scaffold. *J Mol Biol* 00,1-13.

Duan, L., Bagasra, O., Laughlin, M.A., Oakes, J.W., & Pomerantz, R.J. (1994). Potent inhibition of HIV-1 replication by an intracellular anti-Rev single-chain antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 5075-5079.

Felici, F., Castagnoli, L., Musacchio, A., Jappelli, R., Cesarini, G. (1991). Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.* 222(2): 301-10.

Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interaction. *Nature*. 340: 245-246.

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M. (1995). Whole genome

random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*. 269: 496-512.

Forsberg, G., Forsgren, M., Jaki M., Norin, M., Sterky, C., Enhorning, A., Larsson, K., Ericsson, M., & Bjork, P. (1997). Identification of framework residues in a secreted recombinant antibody fragment that control production level and localization in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 12430-12436.

Garrard, L. J., Henner, D. J. (1993). Selection of an anti-IGF-1 Fab from a Fab phage library created by mutagenesis of multiple CDR loops. *Gene* 128(1): 103-9.

Garrard, L. J., Yang M., O'Connell, M. P., Kelly, R. F., and Henner, D. J. (1991). Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system. *Bio/Technology*. 9: 1373-1377.

Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. 415:141-147.

Gegenheimer, P. (1990). Preparation of extracts from plants. *Meth. Enzimol.* 182: 174-193.

Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I., Pluckthun, A. (1990). A comparison of Strategies To Stabilize Immunoglobulin Fv-Fragments. *Biochemistry*. 29: 1362-1367.

Glockshuber, R., Schmidt, T., & Plückthun, A. (1992). The disulphide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding *in vitro* and functional expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 31: 1270-1279.

Griffiths, A. D., Malmqvist, M., Marks, J.D., Bye, J.M., Embleton, M.J., Mc Cafferty, J., Baier M., Holliger, K.P., Gorik, B.D., Hughes-Jones, N.C. (1993). Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J.* 12: 725-734.

Griffiths, A. D., *et al.* (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 13: 3245-3260.

Halin, C., Rondini, S., Nilsson, F., Berndt, A., Kasmehl, H., Zardi, L., Neri, D. (2002). Enhancement of the antitumor activity of interleukin-12 by targeted delivery to neovasculature. *Nat. Biotechnol.* 20, 264-269

Harris, J. R., Markl, J. (1999). Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* 30(6): 597-623.

Hasemann, C.A., & Capra, J.D. (1990). High level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3942-3946.

Hawkins, R. E., Russell, S. J., Winter, G. (1992). Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol* 226(3): 889-96.

- Hinck, A. P., Truckses, D. M., Markley, J. L. (1996). Engineered disulfide bonds in staphylococcal nuclease: effects on the stability and conformation of the folded protein. *Biochemistry*. 35(32):10328-38.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*. 415: 180-185.
- Holliger, P., & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* 23, 1126-1134.
- Hoogenboom, H. R., (1997). Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol* 15: 62-70.
- Hoogenboom, H. R., and Winter, G. (1992). By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J. Mol. Biol.* 227: 381-388.
- Hoogenboom, H. R., de Bruine, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J. W., Roovers, R. C. (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4: 1-20.
- Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 19: 4133-4137.
- Horwitz, A.H., Chang, C.P., Better, M., Hellstrom, K.E., & Robinson, R.R. (1988). Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 5873-5879.
- Hufton, S. E., Moerkkerk, P. T., Meulemans, E. V., de Bruine, A., Arends, J. W., Hoogenboom, H. R. (1999). Phage display of cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. *J. Immunol. Methods* 23(1-2): 39-51.
- Hurkman, W.J., Tanaka, C.K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* 81: 802-806.
- Huston, J. S., Levinson D., Mudgett-Hunter M., Tai M., Novotny J., Margolies M. N., Ridge R. J., Brucoleri R., Haber E., Crea R., Oppermann H. (1998). Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5879-5873.
- Huston, J. S., Tai, M., Mudgett-Hunter, M., McCartney, J., Warren, F., Haber, E., Oppermann, H. (1991). Protein engineering of single-chain Fv analogues and fusion proteins. In molecular design and modelling: concepts and applications. *Methods in Enzymology* 203: 46-88.
- Ito, T., Tashiro, K., Muta, S., Ozawa, R., Chiba, T., Nishizawa, M., Yamamoto, K., Kuhara, S. & Sakaki, Y. (2000). Toward a protein-protein interaction map of the

building yeast. A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *PNAS*. 97: 1143-1147.

Jobling, S.A., Jarman, C., The M.M., Holmberg, N., Blake C. and Verhoeven M.E. (2002). Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nature Biotechnology*. 21:77-80.

Kabat, E.A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesmann, K. S. & Foller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office.

Kenanova, V., Olafsen, T., Crow, D.M., Sundaresan, G., Subbarayan, M., Carter, N.H., Ikle, D.N., Yazaki, P.J., Chatziioannou, A.F., Gambhir, S.S., Williams, L.E., Shively, J.E., Colcher, D., Raubitschek, A.A., Wu, A.A. (2005). Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. *Cancer Res*. 65, 622-631.

Koheler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultured of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256: 459-497.

Knappik, A., & Pluckthun, A. (1995). Engineered turns of a recombinant antibody improve its *in vivo* folding. *Protein Eng* 8, 81-89.

Kubis, S., Baldwin, A., Patel, R., Razzaq, A., Dupree, P., Lilley, K., Kurth, J., Leister, D., and Jarvis, P. (2003). The Arabidopsis ppil mutant is specially defective in the expression, chloroplast import and accumulation of photosynthetic proteins. *Plant Cell*. 15: 1859-1871

Lehesranta, S.J., Davies, H.V., Shepherd, V.T., Nunan, N., Mc Nicol, J.W., Auriola, S., Koistinen, K.M., Suomalainen, S., Kokko, H.I., and Karenlampi, S.O. (2005). Comparison of tuber proteomes of potato varieties, Landraces, and genetically modified lines. *Plant Physiol*. 138: 1690-1699.

Lobato, M.N., and Rabbits, T.H. (2004). Intracellular antibodies as specific reagents for functional ablation: future therapeutic molecules. *Current Molecular Medicine*. 4: 519-528.

MacBeath, G. & Schreiber, S.L. (2000). Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*. 289: 1760-1763.

Marasco, W. A. (1995). Intracellular antibodies (intrabodies) as research reagents and therapeutic molecules for gene therapy. *Immunotechnology*. 1(1): 1-19.

Marks, J. D., Griffiths, A. D, Malmquist, M., Clackson, T. P., Bye, J. M., Winter, G. (1992). By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Bio/Technology* 10(7): 779-783.

Marks, J. D., Hoogenboom H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. and Winter G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol*. 222: 581-597.

- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. and Winter, G. (1992). Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *J. Mol. Biol. Chem.* 267: 16007-16010.
- Martineau, P., Betton, J. M. (1999). In vitro folding and thermodynamic stability of an antibody fragment selected in vivo for high expression levels in *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 292: 921-929.
- Martineau, P., Jones, P., Winter, G. (1998). Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *J Mol Biol.* 280(1):117-27.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., and Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348: 552-554
- Mhashilkar, A.M., Bagley, J., Chen, S.Y., Szilvay, A.M., Helland, D.G., & Marasco, W.A. (1995) Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies. *EMBO J.* 14: 1542-1551.
- Muyldermans, S. (2001). Single domain camel antibodies: current status. *J. Biotechnol.* 74(4): 277-302 .
- Nakamura, T., Peng, K.W., Vongpunsawad, S., Harvey, M., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Cattaneo R., Russell, S.J. (2004). Antibody-targeted cell fusion. *Nat. Biotechnol.* 22, 331-336.
- Nakamura, T., Peng, K.W., Harvey, M., Greiner, S., Lorimer, I.A., James, C.D., Russell, S.J. (2005). Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses. *Nat. Biotechnol.* 23, 209-214.
- Nazrul Islam, Lonsdale, M., Upadhyaya, N.M., Higgins, T.J., Hirano, H., and Akhurst R., (2004). Protein extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis. *Proteomics.* 4: 1903-1908.
- Nieba, L., Honegger, A., Krebber C., & Pluckthun, A. (1997). Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved *in vivo* folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein Eng* 10: 435-444.
- Neri, D., Petrucci, H., Light, Y., Britton, H. E., Winter, G. and Creighton, A. M. (1996). Radioactive labeling of recombinant antibody fragments by phosphorylation using human casein kinase II and [γ - ^{32} P]-ATP. *Nature Bio/Technology* 14: 485-390.
- Nissim, A., Hoogenboom, H. R., Tomlinson, I. M., Flynn, G., Midgley C., Lane, D. Winter G., (1994). Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J.* 3: 692-698.
- Pandey, A., & Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 405: 837-846.

- Pini, A., Viti, F., Cantucci, A., Carnemolla, B., Zardi, L., Neri, P., & Neri, D. (1998). Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J. Biol. Chem.* 273, 21769-21776.
- Phizicky, E.M., & Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiology Reviews.* 59: 94-123.
- Plückthun, A. (1991). Antibody engineering: Advances from the use of *Escherichia coli* expression system. *Bio/Technology.* 9: 545.
- Robinson, M.K., Doss, M., Shaller, C., Narayanan, D., Marks, J.D., Adler, L.P., Gonzalez Trotter, D.E., Adams, G.P. (2005). Quantitative immuno-positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. *Cancer Res.* 65, 1471-1478.
- Rose, J.K.C., Bashir, S., Giovannoni, J.J., Jahn, M.M., and Saravanan, R.S. (2004). Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *The Plant J.* 34: 715-733.
- Santoni, V., Bellini, C., Caboche, M. (1994). Use of 2-dimensional protein-pattern analysis for the characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Planta.* 192: 557-566.
- Saravanan, R.S., and Rose, J.K.C. (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics.* 4: 2522-2532.
- Shimada, N., Suzuki Y., Nakajima, M., Conrad, U., Murofushi, N., Yamaguchi, I. (1999). Expression of a functional single-chain antibody against GA_{24/19} in transgenic tobacco. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 779-783.
- Skerra, A., & Plückthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science.* 240: 1038-1041.
- Schnyder, A. & Huwyler J. (2005). Drug transport to brain with targeted liposomes. *NeuroRx.* 2, 99-107.
- Soderlind, E., Vergeles M., Borrebeck, C. A. (1995). Domain libraries: synthetic diversity for de novo design of antibody V-regions. *Gene* 160: 269-72.
- Sternberg, N. & Hoess, R. H. (1995). Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(5):1609-13.
- Tanaka, T., Lobato, M.N. & Rabbits, T.H. (2003). Single domain intracellular antibodies: a minimal fragment for direct in vivo selection of antigen-specific intrabodies. *J. Mol. Biol.* 331, 1109-1120
- Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A., e Galeffi P. (1993). Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* 366: 469- 472.

- Tavladoraki, P., Girotti, A., Donini, M., Arias F. J., Mancini, C., Morea V., Chiaraluce R., Con salvi, V. and Benvenuto, E. (1999). A single-chain antibody fragment is functionally expressed in the cytoplasm of both *E. coli* and transgenic plants. *Eur. J. Biochem.* 262: 617-624.
- Tomlinson, I. M., Walter, G., Jones, P. T., Dear, P. H., Sonnhhammer, E. L., Winter, G. (1996). The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J. Mol. Biol.* 256: 813-7.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T:A.; Judson, R:S.; knight, J:R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 403: 623-627.
- Vaccaro, P., Dente, L., Onofri, F., Zucconi, A., Martinelli, S., Valtorta, F., Greengard, P., Cesareni, G., Benfenati, F. (1997) Anti-synapsin antibodies: epitope mapping and inhibitory effects on phosphorylation and Grb2 binding. *Mol. Brain Res.* 52: 1-16.
- van Broekhoven, C. L., Parish, C.R., Demangel C., Britton, W.J. & Altin, J.C. (2004). Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy. *Cancer Res.* 64, 4357-4365.
- Villani, M. E., Roggero, P., Bitti, O., Benvenuto, E. and Franconi, R., (2005). Immunomodulation of cucumber mosaic virus infection by intrabodies selected *in vitro* from a stable single-framework phage display library. *Plant Molecular Biology.* 58: 305-316.
- Visintin, M., Tse, E., Axelson, H., Rabbitts, T. H., and Cattaneo, A., (1999). Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system. *PNAS* 96: 11723-11728.
- Visintin, M., Meli, G.A., Cannistraci, I., and Cattaneo, A., (2004). Intracellular antibodies for proteomics. *J. Immunol. Meth.* 290: 135-153.
- Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S., Cresti, M., (2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis.* 24:2369-2375.
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., and Hoogenboom, H. R., (1994). Making antibodies by phage display technology *Annu. Rev. Immunol* 12: 433-455.
- Winter, G., & Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature.* 349: 293- 299.
- Worn, A. & Pluckthun, A., (2001). Stability Engineering of Antibody Single-chain Fv Fragments. *J Mol Biol* 305: 989-1010.
- Zhu, H., Bilgin, M., Bidlingmaier, S., Houferk, T. (2001). Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science.* 293: 2101-2105

