

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

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
in
BIOTECNOLOGIE VEGETALI -XX CICLO-

Heat Shock Proteins (HSP) da pianta e loro potenziali applicazioni in vaccinologia

settore scientifico-disciplinare:AGR/07 e BIO/04

Coordinatore: Prof. ssa Stefania Masci

Tutor: Dott. ssa Selene Baschieri
(ENEA C.R. Casaccia)

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

Dottorando: Dott. Giampaolo Buriani

INDICE

INTRODUZIONE.....	1
Produzione di proteine di interesse farmaceutico in sistemi di espressione eterologhi.....	2
Stato dell'arte dei sistemi per l'espressione eterologa.....	2
I sistemi vegetali come sistemi di espressione di nuova generazione.....	4
Caratteristiche dell'espressione in sistemi vegetali	6
Prospettive di sviluppo future	7
I vaccini ed il sistema immunitario.....	9
Definizione di vaccino e brevi cenni sulle risposta immunitaria.....	9
Fattori che influenzano l'efficacia dei vaccini.....	11
Tipologie di adiuvanti.....	12
Vaccini tradizionali.....	13
Vaccini di nuova generazione.....	13
Le proteine da <i>shock</i> termico.....	15
Ruolo immunologico delle HSP.....	16
Relazioni struttura-funzione.....	18
Le HSP vegetali.....	20
SCOPO DELLA TESI.....	22
MATERIALI E METODI.....	24
Colture batteriche.....	25
Tecniche per la manipolazione degli acidi nucleici.....	29
Analisi bioinformatica.....	32
Tecniche per la manipolazione delle proteine.....	34
Tecniche per gli esperimenti di immunologia.....	43
RISULTATI.....	47
Caratterizzazione strutturale delle HSP espresse nei tessuti vegetali mediante l'impiego di strumenti bioinformatici.....	48

Analisi del grado di omologia esistente tra i membri della famiglia delle HSP70 animali e vegetali.....	48
Modellamento strutturale della HSC70 di <i>N. tabacum</i>	49
Analisi dei profili di espressione costitutiva ed indotta delle HSP70 vegetali	51
Analisi dei profili di espressione costitutiva ed indotta da stress abiotico delle HSP70 in piante di <i>N. benthamiana</i>	51
Analisi dei profili di espressione delle HSP70 in piante di <i>N. benthamiana</i> sottoposte a stress biotici	52
Espressione transiente in piante di <i>N. benthamiana</i> della nucleoproteina del virus A dell'influenza	53
Clonaggio del cDNA codificante la nucleoproteina del virus A dell'Influenza nel vettore binario pGR106.....	53
Espressione transiente della proteina NP in piante di <i>N. benthamiana</i> mediante agroinfiltrazione.....	54
Estrazione e purificazione di complessi HSP70-peptide dai tessuti vegetali e loro caratterizzazione mediante spettrometria di massa.....	55
Ottimizzazione del protocollo di estrazione e purificazione di complessi HSP70-peptide dai tessuti vegetali.....	55
Caratterizzazione dei complessi HSP70-peptidi di origine vegetale mediante spettrometria di massa.....	57
Esperimenti immunologici volti a definire le proprietà immunogeniche di complessi HSP70-peptidi estratti da tessuti vegetali che esprimono antigeni di interesse vaccinale.....	58
Immunizzazione dei topi con i complessi HSP70-peptidi estratti da tessuti fogliari in cui era espressa la proteina NP del virus A dell'influenza.....	58
Allestimento del saggio ELISPOT per la determinazione del numero di cellule T CD8+ NP-specifiche attivato dalle immunizzazioni	59
DISCUSSIONE.....	61

TABELLE E FIGURE

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

Produzione di proteine di interesse farmaceutico in sistemi di espressione eterologhi

Stato dell'arte dei sistemi per l'espressione eterologa

Il rapido aumento delle conoscenze nell'ambito della genomica e delle scienze "omiche" (trascrittomica, proteomica e metabolomica) sta contribuendo a concretizzare ulteriormente le potenzialità delle biotecnologie e a rinforzare il concetto della bioeconomia basata sulla conoscenza (*Knowledge Based Bio-Economy*). In modo particolare, negli ultimi anni, grandi progressi sono stati fatti nell'area di ricerca relativa ai sistemi di espressione eterologhi (batteri, lieviti e cellule animali), classicamente utilizzati per produrre proteine ricombinanti di interesse farmaceutico. Ciascuno di questi tipi cellulari presenta infatti, relativamente a questo tipo di applicazione, dei limiti che spesso hanno ricadute anche importanti sulla qualità e sui costi del prodotto. In questo quadro le cellule batteriche sono quelle che hanno risentito meno positivamente dell'avanzamento delle conoscenze. Questo nonostante i notevoli progressi compiuti per facilitare il clonaggio e promuovere la produzione a livelli elevati di proteine eterologhe nella corretta conformazione bioattiva. Per la loro natura procariote, tali cellule hanno infatti il limite fondamentale di essere prive della capacità di apportare modificazioni post-traduzionali, potendo essere utilizzate solo per la produzione di proteine strutturalmente molto semplici. Nonostante ciò i batteri restano il sistema di espressione di più facile ed economico impiego perché, essendo stati utilizzati per lungo tempo come modello, consentono di fare riferimento a protocolli standardizzati di trasformazione, di mantenimento in coltura e di estrazione/purificazione del prodotto di interesse. Inoltre, se paragonati con i sistemi di espressione eucarioti, presentano vantaggi legati al rapido accumulo di biomassa e alla capacità di crescere in presenza di fonti di carbonio a basso costo (Baneyx and Mujacic, 2004).

Per quanto riguarda le cellule eucariotiche (lieviti, cellule di mammifero), per loro natura queste sono in grado di apportare modificazioni post-traduzionali, e sono quindi utilizzate per produrre proteine strutturalmente complesse. Nonostante ciò, la ricerca si sta concentrando sulla ottimizzazione, mediante mirati interventi genetici, delle vie biosintetiche coinvolte in questi processi modificativi. Un esempio in tal senso è l'ottenimento di cellule di *Pichia Pastoris* transgeniche per 14 geni eterologhi, che consentono di ottenere la glicosilazione caratteristica delle cellule umane, e in cui è invece soppressa, mediante *gene-knockout*, l'espressione dei quattro geni responsabili della glicosilazione tipica delle cellule di lievito (Hamilton et al., 2006).

L'emivita, il potere terapeutico, nonché l'immunogenicità, di un farmaco ricombinante sono strettamente dipendenti dalle modificazioni post-traduzionali (Walsh et al., 2006) e la modificazione post-traduzionale più complessa e di maggiore rilevanza funzionale è la glicosilazione (il 50% delle proteine umane è glicosilato) (Wong, 2005). Un diverso *pattern* di sializzazione, mediante la semplice sostituzione dell'acido sialico terminale degli N-glicani con mannosio, N-acetilglucosamina o galattosio, è in grado di modificare significativamente la farmacocinetica e la farmacodinamica e di determinare l'accelerata *clearance* di una proteina terapeutica (Ashwell and Harford, 1982; Stockert et al., 1995). Negli anticorpi ad esempio, una diversa glicosilazione può avere specifici effetti strutturali e modificare funzioni effettrici fisiologicamente rilevanti quali la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente o il legame con l'antigene (Arnold et al., 2007). Differenze nel tipo di glicosilazione sono anche potenzialmente in grado di rendere immunogenico il prodotto causando perdita dell'efficacia, neutralizzazione della controparte naturale o, nei casi peggiori, reazioni allergiche più o meno gravi (Shankar et al., 2006). E' per questa ragione che oggi quasi tutte le glicoproteine ricombinanti di interesse terapeutico approvate per l'uso umano dall' Ente statunitense per la regolamentazione dei farmaci (*Food and Drug Administration*, FDA) sono prodotte utilizzando come ospite le cellule di ovario di *hamster* cinese (*Chinese Hamster Ovary cells*, CHO), le uniche in grado di garantire modificazioni post-traduzionali e, più in particolare, un *pattern* di glicosilazione molto simile a quello delle proteine umane.

Parallelamente al contributo dato al miglioramento delle "biofabbriche" già esistenti, le conoscenze nel campo della biologia e della genetica molecolare hanno consentito di identificarne di nuove. Da una ventina d'anni a questa parte è stata infatti presa in considerazione la possibilità di utilizzare come sistemi di espressione alternativi alle cellule in coltura, organismi multicellulari complessi come animali o piante (*Molecular Farming*) (Larrick and Thomas, 2001).

Se da una parte, per motivi di carattere pratico (efficienza, tempi di produzione e sicurezza del prodotto) ed etico, la realizzazione di animali transgenici sembra non aver trovato grande spazio di applicazione, il settore delle biotecnologie focalizzato sullo studio e la messa a punto di protocolli sperimentali per la produzione di proteine e biomolecole ricombinanti in sistemi di espressione di origine vegetale, sembra aver ottenuto maggior successo. Tappe fondamentali per la nascita e lo sviluppo di questo campo di ricerca sono state la messa a punto delle tecniche del DNA ricombinante applicate alle piante superiori ed il conseguente ottenimento della prima pianta geneticamente modificata (Fraley et al., 1983, Horsch et al., 1984). La prima proteina ricombinante prodotta a fini commerciali utilizzando una pianta è stata l'avidina (Hood et al., 1997). Da allora, diverse proteine sono state prodotte utilizzando sistemi vegetali. Alcune di queste sono in corso di

commercializzazione o in fase di sperimentazione pre-clinica con l'intento di sostituire le medesime proteine prodotte utilizzando sistemi di espressione più tradizionali (Ma et al., 2005).

I sistemi vegetali come sistemi di espressione di nuova generazione

Le strategie che possono essere utilizzate per realizzare piante "biofabbrica" di proteine eterologhe, sono la trasformazione stabile del genoma (nucleare o del cloroplasto) e la trasformazione transiente, mediante infezione con patogeni vegetali (virus o batteri) geneticamente modificati.

La trasformazione stabile comporta l'inserimento del gene eterologo nel genoma nucleare o del cloroplasto di cellule di callo (ammasso di cellule dedifferenziate propagabile *in vitro*) o di espianti fogliari *in vitro*, e la successiva rigenerazione dalle cellule trasformate di piante complete, geneticamente modificate, in grado di trasmettere il transgene alla progenie.

La trasformazione nucleare può essere ottenuta utilizzando il batterio *Agrobacterium tumefaciens* (batterio caratterizzato dalla naturale capacità di trasferire parte dei propri geni nel genoma nucleare delle cellule vegetali), nelle specie suscettibili a questo fitopatogeno, oppure trasferendo meccanicamente nelle cellule vegetali il materiale genetico eterologo (metodo "biolistico"). Questo secondo metodo è quello con cui si effettua anche la trasformazione del cloroplasto (Vain, 2007).

La metodologia di trasformazione mediata da *A. tumefaciens* è stata messa a punto circa 20 anni fa (Graves and Goldman, 1986; Feldmann and Marks, 1987), e prevede che la sequenza di DNA eterologa venga sostituita al T-DNA (DNA trasferito, *transferred DNA*) nel genoma batterico, prima che questo venga utilizzato per la trasformazione *in vitro*.

Il metodo biolistico prevede invece che il DNA di interesse sia utilizzato per rivestire microsferi di oro o tungsteno, che vengono proiettate ad elevata velocità contro il tessuto vegetale da trasformare, in modo da penetrare le cellule mediante un cannone ad aria compressa.

La trasformazione transiente rende la pianta in grado di esprimere la proteina eterologa solo temporaneamente e non la abilita a trasferire l'informazione genetica relativa alla progenie. Il gene codificante la proteina infatti non viene integrato nel genoma delle cellule vegetali ma in quello di un patogeno di natura virale o batterica che lo veicola nei tessuti di una pianta adulta, completamente sviluppata.

La tecnica di espressione transiente basata sull'impiego del batterio *A. tumefaciens* è cosiddetta "agroinfiltrazione" (Kapila et al., 1997). A differenza di quanto avviene per la trasformazione stabile, in questo caso, la sospensione di cellule batteriche geneticamente modificate viene infiltrata, mediante l'ausilio di una siringa privata dell'ago, sulla pagina inferiore delle foglie di una pianta adulta in vaso. Questa metodologia consente di esprimere simultaneamente geni diversi e di

ottenere più proteine contemporaneamente. Originariamente l'impiego di questa tecnica aveva il solo scopo di verificare la funzionalità dei vettori plasmidici destinati alla trasformazione stabile. Solo di recente le sue potenzialità sono state impiegate a scopi di produzione (Fisher et al., 1999).

La trasformazione transiente imperniata sull'uso di virus vegetali fa ricorso generalmente a virus a singolo filamento positivo di RNA, come il Virus del Mosaico del Tabacco (*Tobacco Mosaic Virus*, TMV) o il Virus X della Patata (*Potato Virus X*, PVX) (Canizares et al., 2005) perché di più facile manipolazione. Lo sviluppo di questa tecnologia è stato infatti molto facilitato dalla realizzazione di vettori di espressione contenenti il DNA complementare (cDNA) del genoma virale completo (Pogue et al., 2000). Numerose sono le strategie che possono essere utilizzate per inserire il gene codificante per la proteina di interesse all'interno di tali vettori (inserimento come sequenza aggiuntiva, sostituzione di un gene virale, fusione con una sequenza virale) e variano a seconda delle caratteristiche dell'ospite virale prescelto (Lacomme et al., 1998).

Per quanto riguarda le rese di proteina eterologa, ciascuna delle metodiche di trasformazione sin qui descritte va considerata come un capitolo a se stante.

La trasformazione stabile del genoma nucleare poiché non permette l'inserimento della sequenza eterologa in modo "sito-specifica", è caratterizzata da livelli di espressione variabili. In particolare, i livelli di espressione sono bassi o assenti se l'inserzione avviene in una regione del genoma funzionalmente importante o trascrizionalmente inattiva, o quando si ottiene l'inserimento contemporaneo di più copie del gene eterologo ed il livello di espressione è così alto che si attivano dei meccanismi di silenziamento genico (Metzlaff, 2002).

Da questo punto di vista la trasformazione stabile del cloroplasto è senza dubbio più efficiente perché, essendo ottenuta mediante ricombinazione omologa in una posizione definita del genoma plastidico, non corre il rischio di interrompere sequenze la cui espressione è connessa a funzioni vitali. Nonostante questo tipo di trasformazione sia potenzialmente in grado di assicurare rese molto elevate (fino al 40% delle proteine totali solubili, *Total Soluble Proteins*, TSP) (De Cosa et al., 2001; Daniell, 2002), è necessario ricordare che tali rese si ottengono solo quando tutti i genomi di tutti i cloroplasti di tutte le cellule sono trasformati (omoplasmia) (una condizione sperimentalmente ancora molto difficile da ottenere). Inoltre, la tecnica di trasformazione è efficace solo su un numero molto limitato di specie vegetali e, essendo i cloroplasti organelli di origine procariotica, le proteine qui sintetizzate non subiscono modificazioni post-traduzionali.

La trasformazione transiente offre numerosi vantaggi rispetto alle tecniche di trasformazione stabile. Innanzitutto perché, per la sua realizzazione, occorrono solo poche settimane contro i circa 12 mesi necessari alla realizzazione e alla caratterizzazione di piante transgeniche omozigoti in grado di esprimere livelli soddisfacenti del prodotto di interesse. Successivamente perché la

trasformazione transiente è in grado di garantire rese particolarmente elevate. Anche in questo caso però vi sono delle limitazioni di natura tecnica, quale la necessità di ambienti controllati (come le serre a contenimento) così da evitare la dispersione dei patogeni ricombinanti nell'ambiente; inoltre l'utilizzo della trasformazione transiente non permette di trasferire il gene di interesse alla progenie dell'ospite vegetale scelto (Lorence and Verpoorte, 2004). In ogni caso nelle piante, al pari di altri sistemi utilizzati per l'espressione eterologa, per aumentare le probabilità di ottenere livelli di espressione elevati (indipendentemente dalla metodica di trasformazione adottata) è consigliabile non solo ottimizzare la sequenza da esprimere (mediante l'"armonizzazione" del *codon usage* con quello dell'ospite) ma anche effettuare una scelta oculata delle sequenze che ne controlleranno l'espressione. Di larga applicazione, sono, il promotore 35S del Virus del Mosaico del Cavolfiore (*Cauliflower Mosaic Virus*, CaMV) (O'Dell et al., 1985), mentre per le monocotiledoni, il promotore dell'ubiquitina-1 di mais (Christiansen and Quail, 1989). Per l'espressione, da tenere in considerazione l'impiego di promotori inducibili e quello di promotori tessuto-specifici, grazie ai quali è possibile attivare l'espressione della proteina di interesse in tessuti o organi definiti della pianta (Zuo et al., 2000).

Caratteristiche dell'espressione in sistemi vegetali

Da un punto di vista generale uno dei principali vantaggi derivanti dall'impiego delle piante come sistemi di espressione è la significativa riduzione dei costi di produzione. Questo nonostante la coltivazione in campo aperto sia resa impossibile dalle restrizioni legislative vigenti in numerosi paesi e alla regolamentazione circa le condizioni di produzione di farmaceutici. I materiali (terreno, luce solare, acqua) necessari per l'allevamento sono infatti molto meno costosi di quelli necessari per l'allestimento delle colture cellulari, così come le strutture necessarie per il mantenimento, la raccolta e la conservazione. Le piante, inoltre, offrono la possibilità di effettuare un significativo taglio dei costi di conservazione del prodotto perché è possibile fare in modo che questo venga accumulato in tessuti di riserva, come i semi, e possa pertanto essere conservato a temperatura ambiente senza per questo subire un danneggiamento.

Anche l'aspetto qualitativo del prodotto trae vantaggio dall'impiego delle piante anche se, esattamente come per altri ospiti eucarioti, modificazioni post-traduzionali, quali la glicosilazione, sono in parte diverse da quelle apportate nelle cellule animali. Infatti, se da una parte gli N-glicani ad alto contenuto di mannosio contengono da 5 a 9 residui di mannosio ed hanno la stessa struttura sia nelle glicoproteine vegetali che in quelle di mammifero, gli N-glicani complessi sono

strutturalmente diversi. Più in particolare, nelle piante l' α -mannosio è sostituito da un β -1,2 xilosio bisecante, assente negli N-glicani di mammifero, e la N-acetilglucosamina prossimale del *core* è sostituita da un α -1,3 fucosio, invece che da un α -1,6 fucosio come nei mammiferi (Saint-Jore-Dupas et al., 2007).

Uno degli impedimenti più importanti alla diffusione dell'impiego delle piante superiori come biofabbrica, è legato alle difficoltà che si incontrano nel purificare il prodotto ricombinante dai metaboliti secondari (fenoli, polifenoli e alcaloidi) di cui sono ricche le cellule vegetali. A seconda delle caratteristiche intrinseche della proteina, è comunque possibile semplificare significativamente le fasi di purificazione, semplicemente inserendo adeguate sequenze segnale che indirizzino la proteina verso la via secretoria. In questo modo è possibile ottenere l'accumulo del prodotto di interesse nell'apoplasto o, se la pianta è allevata in coltura idroponica, indurre la rizosecrezione (Drake et al., 2003). In tal senso, si sta anche valutando la possibilità di sostituire alle piante intere, per l'espressione di proteine eterologhe, cellule vegetali in coltura. Tale metodologia, sebbene sia potenzialmente in grado di garantire un taglio dei costi di purificazione, di fatto ha gli stessi svantaggi delle colture di cellule di mammifero in termini di costi di mantenimento e di rischio di contaminazione.

Un discorso completamente diverso vale invece per la sicurezza intrinseca del prodotto. Infatti, quando una proteina viene prodotta in forma ricombinante utilizzando un sistema di espressione vegetale, si trova in un contesto biologicamente privo di patogeni nocivi per l'uomo, ed il prodotto finito è quindi intrinsecamente "sicuro", senza dover ricorrere alle costose procedure di purificazione cui sono sottoposte le proteine prodotte nei sistemi di espressione tradizionali (Commandeur et al., 2003).

Prospettive di sviluppo future

Al fine di ovviare alle problematiche di cui sopra, molti sforzi si stanno concentrando sull'ottimizzazione del processo produttivo in piante più tradizionalmente utilizzate per il *Molecular Farming*, come il tabacco.

Onde evitare i rischi di natura ecologico-ambientale derivanti dalla diffusione di polline transgenico, non solo per il gene eterologo, ma anche per i geni di resistenza ad antibiotici o ad erbicidi (utilizzati per la selezione dei rigeneranti geneticamente modificati), in linea teorica in grado di portare alla selezione di specie infestanti resistenti e di difficile eliminazione, si sta lavorando alla realizzazione di piante maschio sterili, all'identificazione di nuovi marcatori selettivi e alla messa a punto di pratiche agronomiche atte al contenimento del polline. Sono anche in corso

studi volti a ridurre il contenuto in sostanze tossiche, come gli alcaloidi, per migliorare la qualità del prodotto in termini di purezza.

Per migliorare invece le caratteristiche intrinseche delle proteine ricombinanti, studi in corso sono finalizzati alla realizzazione di piante biofabbrica in grado di produrre proteine ricombinanti, in particolare anticorpi, con N-glicani privi di xilosio e di fucosio. Le strategie vanno dalla realizzazione di piante in cui è stata soppressa, mediante silenziamento o *knock-out*, l'espressione dei geni codificanti gli enzimi che catalizzano l'aggiunta di tali zuccheri (Cox et al., 2004) all'espressione di enzimi ibridi pianta-uomo (Bakker et al., 2006).

Anche per quanto riguarda il miglioramento delle rese in termini di livelli di espressione, molti passi avanti in tal senso sono stati ottenuti nella messa a punto delle tecniche di trasformazione transiente. In generale, i sistemi di nuova generazione tendono a combinare l'efficienza di trasformazione di *A. tumefaciens* con la rapidità e gli elevati livelli di espressione caratteristici dei virus vegetali. Nei sistemi più semplici, due ceppi di *A. tumefaciens* vengono utilizzati per agroinfiltrare le piante: nel primo il T-DNA batterico viene sostituito con il genoma virale, sottoforma di cDNA, mentre nel secondo con un gene di origine virale noto per essere in grado di indurre l'inibizione del silenziamento genico (Voinnet et al., 2000). In sistemi più complessi, come quello messo a punto dalla Icon Genetics (<http://icongenetics.com/html/home.htm>; Gelvin, 2005; Marillonnet et al., 2005), il genoma virale (nel caso specifico quello del TMV) dopo essere stato ottimizzato nella sequenza (mediante eliminazione di potenziali siti di *splicing* e inserimento di introni) viene diviso in due moduli, ciascuno sostituito in vettori indipendenti, nel T-DNA batterico: il cosiddetto modulo 5' (comprendente la polimerasi virale e le proteine di movimento) ed il cosiddetto modulo 3' (in cui al gene codificante la proteina di rivestimento viene sostituito il gene di interesse). I due ceppi di *A. tumefaciens*, ciascuno veicolo di uno dei due moduli, vengono quindi utilizzati per co-infiltrare le piante contemporaneamente ad un terzo ceppo in cui al T-DNA è stato sostituito il gene codificante per una ricombinasi. La ricombinasi, riconoscendo siti specifici a monte e a valle dei moduli 5' e 3', ne determina la fusione inducendo in questo modo l'attivazione dell'espressione del gene eterologo. Uno dei vantaggi di questo sistema, oltre a quello di garantire livelli di espressione in alcuni casi estremamente alti (fino all'80% delle TSP; Gleba et al., 2005), è quello che, essendo privo della proteina di rivestimento virale, non può diffondersi in maniera incontrollabile nell'ambiente e che non è influenzato dalle dimensioni del gene eterologo nella sua efficienza perché la strategia di espressione non prevede l'inserzione delle sequenze virali in un capsido virale.

I vaccini ed il sistema immunitario

Definizione di vaccino e brevi cenni sulle risposta immunitaria

I vaccini sono preparati farmaceutici che inducono risposte immuni specifiche in grado di proteggere l'organismo dall'attacco da parte di un agente patogeno (vaccinazione preventiva) oppure di estinguere infezioni già in atto (vaccinazione terapeutica).

La prevenzione di una malattia o la sua cura attraverso la vaccinazione è uno dei traguardi di maggiore importanza ottenuti in ambito biomedico. Nel corso del ventesimo secolo la durata media della vita è cresciuta di circa trent'anni e una significativa porzione di questo aumento è da attribuire alle vaccinazioni (Cooper and O'Reilly, 2002). Attualmente, i vaccini prevengono più di tre milioni di morti ogni anno ed il loro impatto economico è di più di un miliardo di dollari sempre su base annuale (Ulmer et al., 2006).

La vaccinazione può essere di due tipi:

- Passiva, se ottenuta somministrando anticorpi estratti dal siero di soggetti resistenti al patogeno (questo tipo di vaccinazione conferisce protezione di breve durata poiché si esaurisce quando gli anticorpi vengono eliminati dalla circolazione sanguigna).
- Attiva, se ottenuta stimolando nell'individuo risposte immuni protettive, efficaci e protratte nel tempo, somministrando l'agente patogeno o suoi derivati.

La prima forma di risposta immune che l'organismo attiva quando entra in contatto per la prima volta con un patogeno/antigene (componente estraneo all'organismo contro cui si vuole indurre la risposta) è quella innata. L'immunità innata è un meccanismo di difesa molto primitivo, ma nonostante ciò molto efficiente, che coinvolge cellule ad attività fagocitica o citotossica, quali i granulociti polimorfonucleati, i mastociti, le cellule *Natural Killer* (NK), i linfociti B, le cellule dendritiche (DC) e i macrofagi, localizzate in prossimità delle barriere fisico/chimiche dell'organismo (come gli epiteli). I meccanismi dell'immunità innata sono attivati da strutture molecolari comuni a gruppi di patogeni simili (lipopolisaccaride, peptidoglicano, motivi CpG di DNA non metilato, flagellina) ed assenti nei tessuti dell'organismo, e sono mediati da recettori in grado di legare tali strutture (*Toll Like Receptors*, TLR) (Krishnan et al., 2007).

Parallelamente alla risposta innata, che non ha "memoria" dell'incontro con il patogeno, il patogeno/antigene attiva un tipo di risposta immune più direzionato e specifico (immunità adattativa o antigene specifica) perché mediato da cellule in grado di riconoscere in maniera altamente specifica l'antigene e di garantire all'organismo una protezione duratura nel tempo (memoria

immunologica). Tali cellule sono essenzialmente i linfociti T e B e la loro attivazione è mediata da recettori antigene-specifici.

I recettori antigene-specifici dei linfociti B sono le immunoglobuline, o anticorpi, glicoproteine complesse associate alla membrana o circolanti (forma secreta), in grado di riconoscere e di interagire in maniera altamente specifica con porzioni definite (epitopi) dell'antigene (ad esempio le proteine strutturali di un agente patogeno) nella sua forma nativa. L'interazione tra antigene e immunoglobulina determina l'attivazione della cellula B. Questa prolifera e si differenzia in plasmacellula (in grado di sintetizzare e secernere grandi quantità di immunoglobuline con la stessa specificità di quelle espresse sulla membrana) oppure si differenzia in cellula B della memoria (in grado di permanere nel circolo sanguigno e linfoide per un lungo periodo di tempo) che, nel caso di successivi contatti con antigene, si attiva e secerne anticorpi più rapidamente dei linfociti *naive* (linfociti che non hanno mai incontrato l'antigene) (risposta immunitaria secondaria).

Il recettore per l'antigene dei linfociti T (*T cell receptor*, TCR) ha caratteristiche strutturali molto simili a quelle delle immunoglobuline, ma esiste solo nella forma associata alla membrana. Diversamente dalle immunoglobuline, il TCR riconosce l'antigene solo dopo che questo è stato processato da parte da parte di cellule specializzate nella presentazione dell'antigene (*Antigen Presenting Cells*, APC) o di cellule infettate da agenti patogeni. Il TCR riconosce un complesso molecolare, espresso sulla membrana plasmatica di queste cellule, costituito da un epitopo (piccolo frammento di una proteina antigenica costituito da 8-10 aminoacidi) associato ad una molecola del complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Hystocompatibility Complex*, MHC, nel topo; *Human Leukocyte Antigen*, HLA, nell'uomo).

Le APC che hanno la capacità di "catturare" attivamente l'antigene dall'ambiente extracellulare (pertanto definito antigene esogeno), lo processano e ne espongono sulla membrana gli epitopi in associazione all'MHC di classe II. I linfociti T che riconoscono gli epitopi antigenici in associazione all'MHC di classe II sono i linfociti T cooperanti o *helper* caratterizzati fenotipicamente dall'espressione sulla membrana plasmatica del corecettore CD4 e, funzionalmente, dalla capacità di secernere fattori solubili (citochine) con funzioni regolatorie della risposta immune. I linfociti T *helper* possono essere suddivisi in due sottopopolazioni, T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2), a seconda del tipo di citochine che secernono.

Gli epitopi antigenici presentati dalle cellule dell'organismo infettate con un agente patogeno (in questo caso si parla di antigene endogeno perché sintetizzato endogenamente alla cellula, come nel caso delle proteine virali), vengono associati alle molecole MHC di classe I. I linfociti T che riconoscono questi complessi antigene-MHC sono i linfociti T citotossici caratterizzati fenotipicamente dall'espressione sulla membrana plasmatica del corecettore CD8 e,

funzionalmente, dalla capacità di eliminare la cellula infetta mediante il rilascio di fattori con attività citolitica (perforine e granzimi) (Janeway, 2000).

E' noto però che queste due vie non sono così nettamente separate e che il cosiddetto fenomeno della *cross-presentation* consente anche ad antigeni endogeni di stimolare la risposta citotossica (Yewdel et al., 1999; Roy, 2003; Houde et al., 2003).

Fattori che influenzano l'efficacia dei vaccini

L'efficacia della vaccinazione è influenzata da numerosi fattori i più importanti dei quali sono la via di somministrazione e l'immunogenicità dell'antigene somministrato.

Il vaccino "ideale", oltre a garantire protezione di lunga durata, dovrebbe attivare risposte immuni non solo a livello sistemico ma anche a livello mucosale ed è la via di somministrazione del vaccino che determina quali distretti del sistema immunitario vengono attivati (Ryan et al., 2001). L'immunità mucosale è mediata da cellule del sistema immunitario che si organizzano in prossimità delle mucose a formare veri e propri tessuti linfoidei (*Mucosal Associated Lymphoid Tissues*, MALT) (Neutra et al., 1996). Sono infatti le mucose la principale via di accesso dei patogeni all'organismo. La somministrazione per via parenterale, più comunemente utilizzata, induce esclusivamente l'attivazione della risposta immune a livello sistemico favorendo il differenziamento di cellule della memoria. La somministrazione del vaccino per via mucosale (ad esempio per via intranasale), stimola invece l'attivazione sia dell'immunità sistemica che di quella mucosale (Van Ginkel et al., 2000). Le diverse caratteristiche funzionali dei vari distretti mucosali si riflettono sulle caratteristiche dei tessuti linfoidei ad esse associati e fanno sì che la somministrazione di vaccini su mucose diverse abbia una diversa efficacia protettiva. Per esempio, se da una parte l'inoculo di vaccini a livello della mucosa nasale è in grado di generare risposte sistemiche di forte intensità e di attivare l'immunità mucosale associata a tutti i distretti corporei, la somministrazione di vaccini per via orale è meno efficace nell'attivare risposte a livello degli altri distretti mucosali e pone una serie di problematiche che vanno considerate al fine di formulare vaccini orali (Mowat, 2003).

Per quanto riguarda invece l'immunogenicità del principio attivo, sono le caratteristiche dell'antigene (dimensioni, natura) quelle che incidono sensibilmente sull'attivazione di risposte specifiche del sistema immunitario e sulla produzione dei fattori solubili (citochine) che promuovono la maturazione dell'affinità anticorpale e la formazione di cellule memoria. Per esempio, un antigene di grandi dimensioni presenta un numero di epitopi potenzialmente riconoscibili dai recettori espressi dai linfociti T e B maggiore di un antigene di piccole dimensioni ed è pertanto in grado di attivare una risposta più complessa e completa.

Per incrementare l'immunogenicità di un antigene è possibile associarlo ad una molecola *carrier* (solitamente una proteina) oppure somministrarlo insieme a sostanze adiuvanti. Gli adiuvanti infatti sono sostanze che stimolano il rilascio di fattori infiammatori da parte delle cellule dell'immunità fornendo il co-stimolo necessario all'attivazione dei linfociti. Una delle funzioni fondamentali degli adiuvanti ad oggi utilizzati nelle preparazioni vaccinali è l'attivazione dell'immunità innata.

Tipologie di adiuvanti

L'efficacia dei vaccini, in particolare quella dei vaccini intrinsecamente più sicuri, è strettamente dipendente dagli adiuvanti. Nell'accezione moderna vengono definite adiuvanti sia sostanze immunostimolanti in grado di agire direttamente sul sistema immunitario inducendone l'attivazione, sia sostanze che agiscono sul rilascio dell'antigene o sul suo indirizzamento (*targeting*) verso determinate cellule bersaglio (Gupta et al., 1987; Pashine et al., 2005).

Gli adiuvanti ad oggi approvati per uso umano, e presenti sul mercato come parte di formulazioni vaccinali, sono pochi ed efficaci soprattutto nel potenziare risposte di tipo anticorpale (Krieg, 2003). Si tratta in particolare di sali di alluminio (efficaci nell'indurre la secrezione di anticorpi e una risposta di tipo Th2) e di emulsioni di sostanze sulfattanti in soluzione acquosa (MF59) (e che come i sali di alluminio funzionano da deposito dell'antigene determinandone il rilascio lento e prolungato nel tempo) (Del Giudice et al., 2006).

Solo di recente la ricerca sta cercando di capire in maniera sempre più approfondita i meccanismi che regolano la risposta immune al fine di identificare adiuvanti non nocivi per l'uomo e in grado di attivare le risposte immunitarie di tipo cellulo-mediato. In particolare, gli sforzi mirano a delucidare le modalità di attivazione della risposta innata tramite i TLR, i meccanismi di attivazione e presentazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche, l'importanza della risposta mediata dalle cellule T cooperanti nel corso delle infezioni (Pashine et al., 2005).

La difficoltà nell'ottenere un efficace preparato adiuvante sta nel trovare il giusto bilanciamento tra gli effetti di sinergia e quelli di anergia, se non di antagonismo, tra i suoi componenti. Ad oggi sono in corso di caratterizzazione le proprietà adiuvanti di vari *carrier* con proprietà immunostimolatorie e di *targeting* (come liposomi, endosomi e virosomi) da utilizzare per incapsulare e/o veicolare l'antigene sulla loro superficie (Sanders et al., 2005), e di macromolecole biologiche come le proteine da *shock* termico (*Heat Shock Proteins*, HSP) e i ligandi dei TLR (Srivastava, 2002a; Aguilar and Rodriguez, 2007).

Vaccini tradizionali

Le tipologie di vaccini autorizzati per l'utilizzo sull'uomo prevedono l'impiego sia di organismi uccisi o inattivati che quello di organismi vivi attenuati.

I vaccini inattivati sono preparati utilizzando l'agente patogeno contro cui si vuole ottenere l'attivazione della risposta immunitaria ucciso in formalina, con il calore o con soluzioni a pH nocivo. Pur essendo una delle formulazioni più sicure per la salute umana, questa tipologia di vaccini è scarsamente efficace poiché non essendo i patogeni più in grado di infettare/accedere alle cellule bersaglio, subiscono lo stesso tipo di processamento degli antigeni esogeni e sono pertanto in grado di indurre solo l'attivazione di risposte immuni di tipo umorale, mediate cioè da anticorpi. I vaccini inattivati possono essere resi più efficaci mediante somministrazioni ripetute nel tempo (richiami) in associazione ad adiuvanti.

I vaccini attenuati sono preparati utilizzando patogeni vivi che, a seguito di un processo di mutagenesi casuale ottenuto mediante l'impiego di agenti chimici o crescita in condizioni non ottimali, abbiano in parte perso il loro potenziale patogenico mantenendo però inalterate la capacità di replicarsi *in vivo* e l'identità antigenica. Questo tipo di vaccini pur essendo altamente efficiente, perché in grado di mimare perfettamente il meccanismo di infezione naturale, è scarsamente affidabile dal punto di vista della sicurezza poiché il microrganismo dopo la somministrazione può, per effetto di una retromutazione, riacquistare a pieno la virulenza e quindi la patogenicità.

I vaccini a subunità sono preparati utilizzando componenti antigeniche (per es. tossine di natura proteica) estratte e purificate dal patogeno ed eventualmente rese inattive mediante adeguati trattamenti. Si tratta di vaccini molto sicuri ma che al tempo stesso richiedono la somministrazione in associazione a sostanze adiuvanti per essere pienamente efficaci (Hinman et al., 2006).

Vaccini di nuova generazione

Con l'avvento delle tecniche di biologia molecolare, sono state messe a punto nuove strategie per produrre vaccini a subunità e vivi più sicuri ed efficaci. I vaccini a subunità sono stati prodotti su larga scala inserendo l'informazione genetica codificante il prodotto di interesse nel genoma di un organismo "ospite". E' questo il caso ad esempio del vaccino contro l'epatite B attualmente in commercio e il cui componente fondamentale, la proteina S dell'involucro virale, viene prodotto in forma ricombinante in cellule di lievito. Un grande passo avanti nell'ambito dei vaccini a subunità ricombinanti è stato fatto anche grazie alla recente messa a punto della cosiddetta vaccinologia inversa (*reverse vaccinology*) (Kelly and Rappuoli, 2005). Si tratta di un metodo per

l'individuazione di nuovi componenti antigeniche di interesse vaccinale, basato sulla conoscenza della sequenza nucleotidica completa del genoma del patogeno di interesse che permette, grazie a studi di predizione *in silico* effettuati utilizzando programmi di analisi bioinformatica, di identificare nuove proteine con potenziale effetto immunogenico. Questo tipo di approccio consente di identificare direttamente nei genomi le proteine interessanti per le loro caratteristiche come potenziali antigeni, prima ancora che queste vengano identificate come tali, già espresse dal patogeno, con un procedimento ben più lungo e dispendioso.

Oltre ad offrire la possibilità di produrre su larga scala i componenti fondamentali dei vaccini a subunità, le tecnologie del DNA ricombinante hanno permesso di mettere a punto nuove strategie di vaccinazione, ad oggi ancora in fase di sperimentazione, ma che si prospettano come ottimi sistemi per ottenere preparati altamente efficaci.

Accanto alla vaccinazione "a DNA" che prevede l'introduzione, tramite iniezione intramuscolare o "pistola" genica (su cute), di plasmidi codificanti per antigeni del patogeno che ne garantiscano l'espressione nelle cellule dell'ospite, sono stati messi a punto:

- Vaccini vivi ricombinanti, in cui proteine del patogeno di interesse, o epitopi da queste derivati, vengono fatte esprimere da microrganismi non nocivi per la salute umana ma comunque in grado di infettare le cellule e moltiplicandosi di attivare la risposta immunitaria contro l'agente infettivo (microrganismi chimerici).
- Vaccini vivi attenuati, che differiscono da quelli tradizionali perché l'abolizione della virulenza del patogeno viene ottenuta mediante mutazioni mirate e non casuali a carico del genoma.
- Vaccini basati sull'uso di cellule dendritiche incubate con l'antigene di interesse, in modo che esse possano processarlo adeguatamente, o indotte ad esprimere l'antigene endogenamente mediante trasformazione con appropriati vettori. Questo tipo di vaccini induce risposte immunitarie di forte intensità senza richiedere l'impiego di sostanze adiuvanti. (Aguilar and Rodriguez, 2007).
- Vaccini basati sull'impiego di *Virus Like Particles* (VLP) ovvero di strutture macromolecolari, simili a virus, generate dall'auto-assemblaggio delle proteine di rivestimento virali e che, non contenendo acidi nucleici, non sono infettive. Le VLP possono essere prodotte in diversi sistemi per l'espressione eterologa (colture cellulari di mammifero, di lievito, di insetto, batteriche e tessuti vegetali). Con questa tecnologia è stato di recente messo a punto un vaccino contro il virus del papilloma umano (*Human Papilloma Virus*, HPV) (Harper et al., 2006).
- Vaccini peptidici, un sottogruppo dei vaccini a subunità formulati con uno o più peptidi con sequenza corrispondente a quella di epitopi. Sebbene molto sicuri questi vaccini stentano ad affermarsi perché per essere efficaci richiedono l'uso di *carriers* o di adiuvanti, poiché le

piccole dimensioni del principio attivo non sono sufficienti a dare l'attivazione della risposta immunitaria.

Le proteine da *shock* termico

Le HSP sono proteine espresse nelle cellule della maggior parte degli organismi viventi. Nei procarioti sono localizzate solo nel citosol, mentre negli eucarioti sono presenti anche nel nucleo, nel reticolo endoplasmatico, nei mitocondri e nei cloroplasti, in differenti isoforme a seconda del compartimento cellulare e del tessuto (Lindquist and Craig, 1988). I geni che codificano le HSP sono stati identificati per la prima volta in *Drosophila melanogaster* in seguito ad una involontaria esposizione al calore (Ritossa, 1962). Di fatto, è stato osservato che, mentre alcune HSP sono espresse solo quando la cellula viene sottoposta a stress (alte temperature, tossine, condizioni ossidative, mancanza di glucosio, infezione da parte di agenti patogeni) a livelli che possono raggiungere il 15% delle TSP, altre sono costitutivamente espresse (5% TSP) (Srivastava, 2002b). Le forme espresse costitutivamente vengono identificate con l'acronimo HSC che sta per *Heat Shock Cognate* a sottolineare l'affinità con la forma espressa in risposta a stress.

Le HSP sono state suddivise in famiglie in base al peso molecolare (*Low Molecular Weight* (LMW) HSP, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100) (Tab. 1). Ciascuna famiglia comprende da uno a cinque membri con sequenze altamente omologhe sia intra- che interspecie. Questo rende le HSP le proteine filogeneticamente più conservate non solo nell'ambito di una stessa specie ma anche fra specie diverse appartenenti ad uno stesso *phyla* (Feder and Hofmann, 1999). Le HSP appartenenti ad una stessa famiglia differiscono nella loro localizzazione sia a livello tissutale che cellulare e tutte sono contemporaneamente espresse anche se in quantità differenti. Le diverse famiglie invece, quasi tutte rappresentate nei vari organismi viventi (fanno eccezione le LMW HSP che non sono espresse da alcuni organismi eucarioti) con distribuzione caratteristica all'interno di uno stesso organismo e fra organismi diversi, sono tra loro prive di omologia.

La famiglia più studiata, soprattutto dal punto di vista genetico, è quella delle HSP70 codificata da una famiglia multigenica la cui complessità aumenta al crescere della complessità dell'organismo. In *Escherichia coli*, ad esempio, sono stati identificati solamente 3 geni codificanti membri della famiglia HSP70 (Itoh et al, 1999), mentre nei lieviti e nelle cellule di mammifero ne sono stati trovati fino a 12, ciascuno codificante una diversa isoforma (Tavaria et al., 1996). La complessità crescente nelle cellule eucariotiche suggerisce che la pressione evolutiva abbia favorito il

differenziamento funzionale di queste proteine e la loro presenza nei diversi compartimenti cellulari e tissutali.

Alle HSP è stato attribuito, nel corso degli anni, un numero sempre crescente di funzioni. Esse ricoprono un ruolo fondamentale nel ripiegamento e nel catabolismo proteico (*folding* e *unfolding*), partecipano all'assemblaggio di multimeri proteici complessi e al trasporto delle proteine (Gething and Sambrook, 1992). Come conseguenza di queste funzioni contribuiscono alla termotolleranza e in generale alla resistenza agli stress.

Intorno alla seconda metà degli anni '80 è stato ascrivito alle HSP anche un ruolo nella risposta immunitaria. È stato infatti osservato che le HSP isolate dai tessuti tumorali di un topo, a differenza di corrispondenti preparazioni ottenute da tessuti sani, sono in grado di stimolare nello stesso individuo l'attivazione di una risposta immune di tipo cellulo-mediato specifica per la neoplasia (Srivastava et al., 1986). Questi primi risultati ottenuti utilizzando la gp96, sono stati successivamente confermati utilizzando le HSP70, 90, 110 e la grp170.

Ruolo immunologico delle HSP

La capacità delle HSP di attivare una risposta immune specifica contro il tumore, è stata dimostrata dipendere dalla loro capacità di associarsi in maniera non covalente a peptidi prodotti all'interno delle cellule nel corso del catabolismo proteico (Baker-LePain et al., 2003). Tale associazione avviene *in vivo*, non è un artefatto dovuto ai processi di purificazione (Blachere et al., 1997), ed è finemente regolata dal nucleotide adenosina e dall'idrolisi dell'adenosintrifosfato (AdenosinTriPhosphate, ATP) (Goloubinoff and De Los Rios, 2007). I peptidi associati alle HSP rappresenterebbero quindi una sorta di *finger printing* delle proteine espresse da una cellula o da un tessuto in un dato momento, e la capacità delle HSP derivanti da cellule tumorali di attivare la risposta immune deriverebbe dall'associazione con peptidi prodotti dal catabolismo di proteine tumore-specifiche (Srivastava, 2002b).

La teoria più accreditata circa la formazione dei complessi HSP-peptide, ipotizza che a seguito del catabolismo proteico, operato nella cellula dal proteasoma (complesso multiproteico che ha il compito di degradare polipeptidi all'interno delle cellule), i peptidi prodotti vadano ad associarsi a componenti delle famiglie delle HSP90, 70 e 110 che di fatto sono anch'essi parte integrante del proteasoma. Questi avrebbero il ruolo di trasferire i peptidi verso i cosiddetti Trasportatori associati al Processamento dell'Antigene (*Transporter associated with Antigen Processing*, TAP) localizzati a livello della membrana del reticolo endoplasmatico. Tali trasportatori trasferirebbero i peptidi nel *lumen* del reticolo mettendoli a disposizione di altre proteine della famiglia delle HSP (gp96,

Grp170, tapasina e calnexina, BiP (isoforma reticolare della HSP70)) che si suppone ne facilitino il caricamento sulle molecole MHC di classe I (Javid et al., 2007). Tutti i componenti di questo complesso sistema proteico, comprese le proteine TAP, che collegano fisicamente il citosol al reticolo endoplasmatico, vengono indotte da condizioni di stress (Anderson et al., 1994).

L'associazione delle HSP ai peptidi non sembra seguire regole particolari come nel caso dell'MHC di classe I. Infatti, mentre nel caso delle molecole MHC di classe I è noto che ciascun allele è in grado di associarsi solo ai peptidi la cui sequenza è caratterizzata da uno specifico motivo, ossia da residui altamente conservati in posizioni definite, nel caso delle HSP questo tipo di limitazione sembra non sussistere. La stessa HSP è cioè in grado di associarsi ai peptidi noti per essere legati da molecole MHC di classe I di alleli diversi (Gullo and Teoh, 2004). Per questo motivo le HSP rappresenterebbero una sorta di "serbatoio" di riserva di peptidi, dal quale molecole MHC di classe I diverse campionerebbero i peptidi a loro più "adatti".

Le proprietà immunostimolanti delle HSP non sono semplicemente dovute alla loro capacità di veicolare peptidi ed eventualmente di proteggerli dalla degradazione. Prova ne è il fatto che la sieralbumina murina, anch'essa in grado di veicolare peptidi, non ha nessuna proprietà immunostimolatoria (Srivastava, 2002a). Il motivo principale per cui i peptidi se veicolati dalle HSP, anche a basse concentrazioni (Srivastava et al., 2002b), riescono a stimolare una forte e specifica risposta immunitaria, risiede nella capacità delle HSP di interagire in maniera specifica con le APC. Questa interazione è mediata da una serie di recettori di membrana come i TLR ed altri recettori fra i quali quello meglio caratterizzato è la glicoproteina CD91 (Calderwood et al., 2007). La capacità di interagire con tali recettori non è comune a tutte le HSP ma è caratteristica solo di quelle appartenenti alla famiglia delle HSP70, 90 e calreticulina. Inoltre è stato osservato che non tutte le HSP interagiscono con i recettori allo stesso modo e che ogni famiglia di HSP lega i recettori con differente affinità (Segal et al., 2006). L'interazione HSP-recettore determina prima l'internalizzazione del complesso HSP-peptide in un ambiente endosomale non acido, poi il suo trasferimento nel comparto citoplasmatico (Basu et al., 2001). Si ipotizza che a questo punto l'intero complesso, o il solo peptide, vengano trasferiti nel reticolo endoplasmatico con un meccanismo analogo a quello cui sono sottoposti i complessi HSP-peptide prodotti endogenamente dalla cellula e che coinvolge le proteine TAP e determina il trasferimento dei peptidi sulle molecole di MHC di classe I (Gullo and Teoh, 2004).

Dunque il complesso HSP-peptide anche se esogeno, ovvero proveniente dall'ambiente extracellulare, è in grado di indurre l'attivazione di una risposta immunitaria cellulo-mediata peptide-specifica.

Oltre a prendere parte in modo diretto all'immunità adattativa, partecipando al meccanismo di "caricamento" di peptidi sulle molecole MHC di classe I, sono state ascritte alle HSP anche delle funzioni immunomodulanti non direttamente dipendenti dall'antigene, quali: la stimolazione dei macrofagi a secernere alcune citochine tipiche dello stato infiammatorio (fattore di necrosi tumorale, *tumor-necrosis-factor* α , TNF- α ; interleuchina 1 β , IL-1 β ; fattore di stimolazione della formazione di colonie granulocito-macrofagiche, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; GM-CSF) (Basu and Matsutake, 2004) e a produrre l'isoforma inducibile dell'enzima ossido nitrico sintasi (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS); la maturazione delle cellule dendritiche e la loro stimolazione a produrre, insieme ai macrofagi, acido nitrico (Javid et al., 2007). Non è ancora stato chiarito se in questo caso sia implicato esclusivamente il recettore di membrana CD91 oppure anche altri recettori come il CD36, il CD40, il CD14, il TLR2 ed il TLR4 (Panjwani et al., 2001).

Relazioni struttura-funzione

La prima HSP di cui sia stata risolta la struttura cristallina è la DnaK isoforma batterica della HSP70 citosolica (Zhu et al., 1996). Sono stati questi studi ad evidenziare che la proteina è caratterizzata da un esteso dominio ATPasico, una breve sequenza *linker*, un dominio di legame per il substrato ed un dominio con funzione ancora sconosciuta.

A partire da questi studi, nel giro di pochi anni, le conoscenze sulla struttura delle HSP si sono ampliate notevolmente grazie all'ottenimento dei cristalli dei singoli domini (Flaherty et al., 1998; Bukau and Horwich, 1998; Cupp-Vickery et al., 2004) e, più di recente, alla cristallizzazione della HSC70 completa di mammifero (Jiang et al., 2005). Nel complesso sono oggi disponibili dati strutturali su membri delle famiglie delle HSP90, 70 e LMW.

A dispetto delle differenze nella sequenza primaria, evidenti soprattutto tra organismi filogeneticamente molto distanti, la struttura tridimensionale è decisamente conservata. Nella proteina HSP90 sono stati identificati 3 domini funzionali: un dominio C-terminale implicato nel processo di omodimerizzazione (Harris et al., 2004), un dominio intermedio in grado di interagire con diverse proteine bersaglio, e un dominio N-terminale con funzione di legame dei nucleotidi (*Nucleotide Binding Domain*, NBD) responsabile del legame con ATP/ADP (Prodromou et al., 1997) e con i peptidi (Gidalevitz et al., 2004).

Per quanto riguarda invece le HSP70, in linea generale, sono stati identificati 2 domini principali: un dominio C-terminale di legame con il substrato (*Substrate Binding Domain*, SBD) ed un dominio N-terminale di interazione con i nucleotidi (NDB). Il dominio C-terminale, con massa

molecolare di circa 27 KDa, comprende a sua volta il dominio SBD propriamente detto, di massa molecolare di circa 18 KDa, ed un dominio ad α -elica con massa molecolare di circa 10 KDa che, funzionando come un “coperchio”, regola l’accesso al SBD (Rudiger et al., 1997; Facciponte et al., 2006). È stato osservato che, benché simile nella capacità di legare peptidi alle molecole MHC di classe I, il dominio C-terminale delle HSP è caratterizzato da una conformazione decisamente differente. Mentre nelle molecole MHC il peptide si posiziona in una vera e propria tasca formata da una serie di foglietti β anti-parallela e delimitata da due α -eliche, nelle HSP il peptide si posiziona in una fessura formata da una serie di foglietti β anti-paralleli ripiegati su sé stessi a formare un barile- β e chiusa nella parte superiore da un’ α -elica (Fig. 1). Il fatto che la struttura sia differente è comunque in accordo con la differente specificità con cui i peptidi si associano alle due molecole. Mentre ciascuna molecola MHC di classe I è in grado di legare peptidi di ben definite composizione e dimensioni (9 aminoacidi), ciascuna molecola HSP può associarsi a peptidi di composizione e lunghezza variabili (dai 7 ai 26 aminoacidi). La conformazione della fessura è quindi tale da rendere il SBD più permissivo e da non limitare eccessivamente dal punto di vista strutturale la lunghezza del peptide in entrata (Morshauser et al., 1995). Dagli studi sulla DnaK, che nel cristallo presentava associato al SBD il peptide con sequenza aminoacidica NLLLLTG, è evidente che la proteina “abbraccia” il peptide bersaglio, assumendo una caratteristica conformazione “a mandibola”, in cui il peptide risulta bloccato da “denti” idrofobici.

Il dominio NBD, che ha una massa molecolare di circa 44 KDa, è quello cui si associa l’attività ATP-asi. E’ infatti noto che il coinvolgimento della HSP70 nel ripiegamento proteico è regolata da cicli di legame e di rilascio del substrato, controllati dall’ATP. Lo scambio nucleotidico ha un ruolo chiave in questi cicli perché è quello che determina il rilascio del substrato (Brehemer et al., 2001). I dati strutturali suggeriscono un modello di interazione con il peptide basato su cambiamenti allosterici dello *chaperon* promossi dal legame con una molecola di ATP e dalla sua successiva idrolisi in ADP. In particolare, il legame con l’ATP determinerebbe l’apertura dell’ α -elica “coperchio”, all’estremità C-terminale, e renderebbe più accessibile il sito di legame ai peptidi, mentre l’idrolisi di ATP in ADP ne determinerebbe la chiusura producendo un forte rallentamento nella velocità di scambio dei peptidi nel sito di legame (Javid et al., 2007). Nonostante ciò è comunque improprio pensare alla forma con affinità per l’ATP come ad una forma “aperta” e a quella con affinità per l’ADP come ad una forma “chiusa” e questo perché le due forme co-esistono. Quello che cambia è l’affinità più o meno alta per il peptide.

Studi approfonditi sul dominio SBD hanno dimostrato che contribuiscono al legame fra HSP70 e peptidi diversi tipi di interazioni deboli, in particolare legami idrogeno e forze di *Van der Waals* (Zhu et al., 1996), e che le diverse isoforme delle HSP70 sono caratterizzate da diverse specificità

di legame. E' stato osservato ad esempio, che il SBD della proteina DnaK non è in grado di legare peptidi contenenti residui aromatici, al contrario di quanto accade per le corrispondenti isoforme eucariotiche (Javid et al., 2007). Sebbene gli *chaperon* molecolari HSP70 siano evolutivamente molto conservati, i singoli membri della famiglia presentano differenze funzionali che probabilmente sono da attribuirsi alla capacità di legare proteine con caratteristiche diverse (Gragerov and Gottesman, 1994; Fourie et al 1994). E' stato dimostrato che le diverse isoforme non sono intercambiabili *in vivo* nelle loro funzioni. Per esempio, l'isoforma della HSP70 residente nel reticolo endoplasmatico o la DnaK, non possono sostituire l'isoforma citosolica nel legame della sequenza peptidica che porta alla degradazione mediata dal lisosoma della proteina bersaglio (Gething et al., 1995). Da un punto di vista più generale le HSP70 hanno la caratteristica di essere in grado di complessarsi solo con catene peptidiche denaturate e non con le loro controparti correttamente ripiegate. Probabilmente questo è dovuto alla loro particolare affinità per sequenze aminoacidiche che contengono un *core* di cinque residui idrofobici, in particolare residui di leucina, tra residui basici (Gragerov and Gottesman, 1994; Rudiger et al., 1997). Poiché sequenze con queste caratteristiche si incontrano statisticamente, in una proteina, ogni 30-40 residui e nella maggior parte dei casi sono associati a regioni conformazionalmente inaccessibili per via della loro idrofobicità, appare ipotizzabile che le HSP70 si associno a peptidi derivanti dal processamento o dal catabolismo delle proteine (Javid et al., 2007).

Le HSP vegetali

Le HSP sintetizzate dalle piante sono omologhe a quelle degli altri eucarioti e come queste sono componenti ubiquitari, con un ruolo fondamentale nella fisiologia cellulare. In particolare, nella sintesi e nel catabolismo proteico e nella risposta a stress biotici e abiotici. Nonostante ciò, alcune differenze tra il mondo vegetale e quello animale esistono. Le LMW HSP ad esempio, una famiglia di HSP di massa molecolare compresa tra i 17 ed i 27 KDa le cui diverse isoforme sono codificate da una famiglia multigenica, sembrano avere particolare rilevanza nelle piante perché sono in questi organismi particolarmente diverse ed abbondanti. Sebbene in piante cresciute in condizioni ottimali non siano presenti in quantità rilevabili, e quindi non presentino forme costitutivamente espresse, diventano fra le HSP più abbondanti in condizioni di stress (Vierling, 1991). Tuttavia, sebbene si sappia che, come per le altre HSP, hanno un ruolo nel catabolismo proteico (Jakob et al., 1993; Halsbek et al., 2005) e nella risposta a stress (Sun et al., 2002 Halsbeck et al., 2005) una loro funzione esclusiva e peculiare non è stata ancora individuata.

Anche le HSP ad alto peso molecolare (110 KDa) vengono sintetizzate nelle cellule vegetali in maniera strettamente dipendente dagli stress e la componente costitutiva è decisamente minoritaria rispetto a quella indotta (Nagao et al., 1998).

Non è stato chiarito, inoltre, se ci sia un ruolo peculiare delle isoforme di HSP60, 70 e LMW del cloroplasto, peculiarità del mondo vegetale visto che le altre cellule eucariotiche non sono provviste di questo organello.

L'analisi dell'espressione costitutiva delle HSP e della loro induzione in seguito a stress di varia natura nelle cellule vegetali, è stata effettuata su piante in diversi stadi dello sviluppo vegetativo, ed è stato dimostrato che tale espressione così come l'eventuale induzione da stress sono attive in tutte le fasi di sviluppo della pianta a parte in una fase molto precoce dello stadio embrionale (stadio di pre-torpedo) e nella germinazione del polline (Helm et al., 1990; Vierling, 1991). Tra le HSP vegetali, quelle più studiate dal punto di vista fisiologico, oltre alle LMW, sono le HSP70. Per quanto riguarda gli stress abiotici, è noto che a seguito di *shock* termico, dopo un iniziale picco di accumulo dell'RNA messaggero (mRNA) codificante le isoforme inducibili di questa famiglia di HSP della durata di circa 4 ore, si ha la repressione dell'espressione genica, e questo indipendentemente dall'eventuale perdurare dello stress. Un profilo di espressione simile è stato descritto anche nella risposta allo stress da basse temperature (Swendell et al., 2007) e questo permette di concludere che le HSP70 (Dhaubhadel et al., 2002; Krishna et al., 1995) sono fondamentali nella termotolleranza e nei processi di acclimatazione.

Per quanto riguarda invece la risposta agli stress biotici, come le infezioni virali, le HSP70 vengono indotte con un andamento temporale che ricalca quello del progredire dell'infezione, ma anche in questo caso dopo aver raggiunto il picco dopo 4-5 giorni, tendono a diminuire nonostante il perdurare dello stress, probabilmente a causa della perdita di vitalità generale dell'ospite (Aranda et al., 1996). Uno scenario simile è stato descritto anche in esperimenti di agroinfiltrazione (Aparicio et al., 2005), a suffragio dell'ipotesi che la sintesi delle HSP viene promossa da tutte quelle condizioni fisiologiche che sollecitano il metabolismo proteico cellulare.

SCOPO DELLA TESI

Uno degli ambiti di ricerca più attivi in campo vaccinologico mira ad individuare nuove modalità di somministrazione dei vaccini a subunità, che portino all'attivazione non solo risposte di tipo umorale ma anche risposte di tipo innato e cellulo-mediato. Infatti, se da una parte gli anticorpi hanno la capacità di bloccare gli agenti patogeni quando questi accedono all'organismo, prima dello sviluppo dell'infezione, d'altra parte è importante che ci sia l'attivazione di cellule T citotossiche in grado di eliminare eventuali cellule infettate qualora gli anticorpi falliscano nella loro attività neutralizzante.

La prima difficoltà risiede nella constatazione che i vaccini a subunità/peptidici, una volta somministrati, si comportano come antigeni esogeni e subiscono un tipo di processamento che comporta la presentazione in associazione alle molecole MHC di classe II e la conseguente attivazione di linfociti T CD4+. La seconda difficoltà, intrinseca soprattutto ai vaccini peptidici, sta nel fatto che le molecole MHC di classe I, con cui i peptidi si associano per attivare i linfociti T CD8+, sono codificate da un *locus* poligenico (Trowsdale *et al.*, 2004) e che nell'ambito di una stessa popolazione per ciascun gene esistono numerosi alleli diversi. La differenza tra le molecole MHC di classe I codificate dai vari alleli è a carico della tasca che lega i peptidi antigenici. Molecole MHC di classe I diverse nella tasca legano peptidi con sequenza aminoacidica diversa. Questo vuol dire che individui diversi legano peptidi diversi di uno stesso antigene proteico complesso alle loro molecole MHC di classe I. Pertanto, la scelta dei peptidi da utilizzare nella preparazione vaccinale deve essere effettuata in modo che sia garantita la risposta da parte di tutti gli individui di una popolazione e richiede che siano noti i peptidi di un determinato antigene in grado di legarsi ai vari alleli MHC di classe I (mappatura degli epitopi, *epitope mapping*).

Con il presente progetto di dottorato si intende valutare la possibilità di utilizzare le HSP vegetali come veicolo di peptidi di interesse immunologico, per la realizzazione di vaccini a subunità innovativi. È infatti noto che alcune famiglie delle HSP animali (in particolare HSP60, HSP70 e HSP90) sono in grado di associarsi con una grande varietà di peptidi provenienti anche da una stessa proteina e di indurre l'attivazione di risposte immuni specifiche per i peptidi senza che sia necessaria la co-somministrazione di adiuvanti.

Il presente progetto mira quindi a chiarire se sia possibile utilizzare a tale scopo le HSP endogene estratte da tessuti vegetali che esprimono antigeni ricombinanti, e se esista quindi tra le HSP vegetali e quelle animali una "equivalenza sostanziale" non solo in termini di interazione con i peptidi, ma anche nella capacità di attivare il sistema immunitario.

MATERIALI E METODI

Colture batteriche

Ceppi batterici

Per la propagazione dei vettori utilizzati sono state utilizzate cellule di *E. coli* ceppo XL1 Blue dal genotipo recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F proAB lacI. q. ZΔM15 Tn10 (Tet. r.)].

Per le agroinfiltrazioni sono stati utilizzati i ceppi di *A. tumefaciens* LBA4404 e GV3101.

Terreni di coltura

Cellule batteriche in sospensione sono state cresciute in terreno Luria-Bertani (LB) (10 g/l bactotriptide, 5 g/l estratto di lievito, 10 g/l NaCl, pH7.2).

Singole colonie batteriche sono state invece cresciute in piastre di Petri su terreno solido ottenuto tramite aggiunta di agar (1 g/l) all'LB (LB/agar).

Per gli inoculi e la crescita su terreno solido di cellule batteriche trasformate con plasmidi a seconda del tipo di plasmide utilizzato sono stati aggiunti al terreno i seguenti antibiotici:

- 0.1 mg/ml ampicillina (soluzione madre 100 mg/ml acqua bidistillata (bdH₂O)).
- 0.1 mg/ml kanamicina (soluzione madre 100 mg/ml bdH₂O).
- 0.01 mg/ml tetracina (soluzione madre 5 mg/ml etanolo).
- 0.05 mg/ml rifampicina (soluzione madre 50 mg/ml metanolo).

Conservazione dei ceppi batterici

Piccole aliquote (0.8 ml) di cellule batteriche sono state prelevate da inoculi liquidi di 3 ml, aggiunte a provette contenenti 0.2 ml di glicerolo sterile, prontamente congelate in azoto liquido e quindi conservate a -80°C.

Letture spettrofotometriche

Lo spettrofotometro misura la quantità di luce di una data lunghezza d'onda assorbita dal campione analizzato. Molecole differenti assorbono la luce a lunghezze d'onda diverse e l'assorbanza (densità ottica, *optical density*, O.D.) di un campione dipende dalla concentrazione di tali molecole.

La crescita delle colture batteriche è stata misurata trasferendo 1 ml della coltura in cuvette usa e getta di plastica misurando l'assorbanza del campione ad una lunghezza d'onda di 600 nm.

La concentrazione del DNA è stata determinata ad una lunghezza d'onda di 260 e 280 nm, in campioni diluiti in bdH_2O in un volume finale di 500 μl e contenuti in cuvette di quarzo. Per risalire alla concentrazione del campione si applicano le seguenti relazioni: lettura dello strumento a 260 nm x il fattore di conversione x il rapporto di diluizione = $\mu\text{g/ml}$ di acido nucleico. Il fattore di conversione è di 50 per il DNA e di 30 per gli oligonucleotidi.

Preparazione di cellule batteriche elettrocompetenti e elettroporazione

L'elettroporazione è un metodo per la trasformazione delle cellule batteriche in cui il DNA entra nella parete cellulare attraverso dei pori temporanei indotti da una scarica elettrica. Per essere elettroporate le cellule vengono prima accuratamente lavate con acqua al fine di rimuovere i sali presenti nel terreno di coltura. La presenza di sali determina infatti la conduzione di un impulso di intensità tale da uccidere le cellule.

Preparazione di cellule di *E. coli* elettrocompetenti

Giorno 1

Una singola colonia batterica è stata inoculata in una beuta da 200 ml contenente 25-30 ml di terreno LB ed incubata tutta la notte (*overnight*, o.n.) a 37°C, in agitazione costante (250 rotazioni per minuti, rpm).

Giorno 2

Tre ml di inoculo o.n. sono stati trasferiti in una beuta da 2 l contenente 500 ml di LB ed incubati a 37°C, 250 rpm fino a quando la coltura ha raggiunto la fase esponenziale di crescita (equivalente ad un valore di assorbanza di circa 0.5-0.6 O.D.). La coltura è stata raffreddata in ghiaccio, trasferita in tubi di polipropilene tipo *Oak Ridge* da 250 ml e centrifugata a 9000xg per 10' a 4°C. Dopo la centrifugazione il sopranatante è stato scartato ed il *pellet* risospeso in 500ml di bdH_2O sterile fredda. Questa operazione è stata ripetuta per altre due volte risospesendo la prima volta in 25 ml di bdH_2O fredda e la seconda volta in 50 ml. Dopo l'ultima centrifugazione, il *pellet* è stato risospeso in 1.5 ml di una soluzione fredda di glicerolo al 10% in bdH_2O e la sospensione è stata suddivisa in aliquote da 50 μl che sono state velocemente congelate in azoto liquido e conservate a -80°C.

L'efficienza di trasformazione delle cellule elettrocompetenti preparate è stata valutata elettroporando un'aliquota di cellule con 2 ng del plasmide di controllo pBlueScript (Stratagene) comprendente nella sua sequenza il gene per la β -lattamasi, che conferisce resistenza all'antibiotico ampicillina. Le cellule trasformate sono state trasferite in 1 ml di LB ad incubate a 37°C per 1 ora. Dopo l'incubazione 20 e 50 μ l della coltura sono stati distribuiti sulla superficie di piastre Petri contenenti LB/agar/ampicillina. Le piastre sono state incubate per tutta la notte a 37°C. Il giorno successivo, le colonie cresciute sono state contate e l'efficienza di trasformazione è stata calcolata dividendo il numero delle colonie ottenute per il prodotto tra il volume distribuito su ciascuna piastra e la quantità di plasmide utilizzato per la trasformazione.

Efficienza di trasformazione = (n° colonie)/(μ l coltura piastrati/1 ml x ng plasmide/1 μ g).

Preparazione delle cellule di *A. tumefaciens* elettrocompetenti

Giorno 1:

Una singola colonia batterica è stata inoculata in un tubo da 15 ml di polipropilene in 5 ml di LB con antibiotico adeguato al ceppo cellulare in uso (precoltura) e lasciata crescere in agitazione costante 250 rpm, per 6-8 ore a 28°C. Due ml della precoltura sono stati quindi inoculati in 400 ml di LB/antibiotico in una beuta da 2 l e lasciati crescere in agitazione costante 250 rpm a 28°C, o.n.

Giorno 2:

La crescita delle cellule è stata valutata mediante lettura spettrofotometrica di 1 ml della coltura o.n. a 600 nm. Quando il valore delle O.D. ha raggiunto i valori di 0.6-0.7, la crescita è stata interrotta trasferendo la beuta in ghiaccio per 10' e quindi travasando in tubi di polipropilene tipo *Oak Ridge* da 250 ml e centrifugando a 9000xg, 4°C per 9'. Dopo la centrifugazione il soprannatante è stato scartato ed il *pellet* risospeso in 100 ml di bdH₂O fredda per bottiglia e centrifugato a 9000xg, 4°C per 9'. Questa operazione è stata ripetuta per altre due volte risospesendo il *pellet* la prima volta in 50 ml di bdH₂O fredda e la seconda volta in 10 ml. Questi ultimi due passaggi sono stati effettuati in tubi di polipropilene tipo *Oak Ridge* da 35 ml. Dopo l'ultima centrifugazione il *pellet* è stato risospeso in 2 ml di una soluzione fredda di glicerolo al 10% in bdH₂O e la sospensione è stata suddivisa in aliquote da 50 μ l che sono state velocemente congelate in azoto liquido e conservate a -80°C. L'efficienza di trasformazione è stata controllata come descritto precedentemente.

Elettroporazione

Cuvette per elettroporazione da 2 mm (*Gene Pulser Cuvette*, Bio-Rad) sono state raffreddate in ghiaccio avendo cura di avvolgere con parafilm l'estremità degli elettrodi per evitare che su di essi si formasse la condensa. In ciascuna cuvetta è stata trasferita un'aliquota di cellule elettrocompetenti scongelata su ghiaccio ed il DNA da transfettare (2-5 ng di plasmide purificato oppure 7.5 µl del prodotto di una reazione di ligazione). Dopo incubazione a freddo per 10' le cuvette sono state inserite una alla volta nell'apparato di elettroporazione (*Gene-Pulser*, Bio-Rad) e sottoposte all'impulso elettrico (parametri: 25 µF, 2,5 KV, 200 Ω). Immediatamente dopo l'impulso a ciascuna cuvetta è stato aggiunto 1 ml di LB. Le sospensioni cellulari sono state quindi trasferite in provette da inoculo ed incubate a 37°C, 250 rpm per 45' onde consentire alle cellule trasformate di esprimere il gene presente nel plasmide che conferisce la resistenza all'antibiotico. Piccoli volumi delle colture (20-200 µl) sono stati quindi distribuiti sulla superficie di piastre Petri contenenti LB/agar/antibiotico ed incubati a 37°C o.n.

Preparazione della coltura di *A. tumefaciens* per gli esperimenti di agroinfiltrazione

Giorno 1:

Una singola colonia batterica è stata inoculata in una beuta da 2 l in 500 ml di terreno LB contenente gli antibiotici necessari, e lasciata crescere a 28°C, 250 rpm, o.n.

Giorno 2:

La crescita delle cellule è stata valutata mediante lettura allo spettrofotometro di 1 ml della coltura o.n. a 600 nm. Quando il valore delle O.D. ha raggiunto i valori di 0.6-0.7, la crescita è stata interrotta incubando la beuta in ghiaccio per 10' e quindi travasando in tubi di polipropilene tipo *Oak Ridge* da 250 ml e centrifugando a 9000xg, 4°C per 9'. Dopo la centrifugazione il sopranatante è stato scartato ed il *pellet* risospeso ed incubato a temperatura ambiente per 2-3 ore nel tampone di agroinfiltrazione (0.01 M acido 2-(N-morfolino) etansulfonico monoidrato (MES), 0.01 M MgCl₂, 0.13 mM acetosiringone, pH 5.5) prima di essere utilizzato per infiltrare la piante.

Tecniche per la manipolazione degli acidi nucleici

Preparazione su piccola scala di DNA plasmidico

Singole colonie batteriche sono state prelevate dalle piastre di LB/agar/antibiotico ed inoculate in provette contenenti 3 ml di terreno LB/antibiotico. Gli inoculi sono stati incubati a 37°C, 250 rpm, o.n.. Aliquote delle sospensioni batteriche sono state quindi trasferite in provette Eppendorf da 1.5 ml centrifugate a 20000xg, 4°C per 1'. Dopo la centrifugazione il sopranatante è stato rimosso ed il *pellet* processato utilizzando il kit *Plasmid Mini Kit* (Qiagen) secondo il protocollo fornita dalla casa produttrice

Preparazione su larga scala di DNA plasmidico

Singole colonie batteriche sono state prelevate dalle piastre di LB/agar/antibiotico ed inoculate in provette contenenti 3 ml di terreno LB/antibiotico ed incubate per 8 ore a 37°C, 250 rpm (precoltura). Un ml della precoltura è stato inoculato in una beuta da 2 l contenente 500 ml di terreno LB/antibiotico ed incubato a 37°C, 250 rpm, o.n.. Al termine dell'incubazione la coltura è stata trasferita in tubi di polipropilene tipo *Oak Ridge* e centrifugata a 6000xg per 10' a 4°C. Dopo la centrifugazione, il sopranatante è stato rimosso ed il *pellet* è stato processato utilizzando il kit *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) seguendo il protocollo della ditta produttrice.

Sintesi degli oligonucleotidi

Gli oligonucleotidi utilizzati per le reazioni a catena della polimerasi *Taq* e per il sequenziamento sono stati sintetizzati dalla ditta Sigma Genosys.

Digestione di DNA plasmidico con enzimi di restrizione

Le digestioni sono state effettuate seguendo le indicazioni fornite dalle case produttrici dei diversi enzimi di restrizione. Le digestioni preparative sono state effettuate utilizzando 5 µg di DNA plasmidico, mentre le digestioni di *screening* sono state effettuate utilizzando 150 ng di DNA.

Reazione di ligazione

Il DNA plasmidico digerito con enzimi di restrizione ed i frammenti di DNA clonare sono stati mescolati in una provetta Eppendorf da 1.5 ml in un rapporto molare 1:6-1:9. La reazione è stata eseguita utilizzando l'enzima ligasi del fago T4 seguendo le indicazioni della casa produttrice (New England Biolabs). Per verificare la qualità del DNA plasmidico sono state allestite due reazioni di ligazione contenenti DNA plasmidico digerito e ligasi senza l'inserito (per valutare la presenza di plasmide monodigerito nel caso di utilizzo di plasmidi digeriti con due enzimi differenti) o DNA plasmidico digerito senza ligasi né inserito (per valutare la presenza di plasmide non digerito). La reazione di ligazione è stata effettuata a 16°C o.n.

Elettroforesi di DNA su gel di agarosio

Campioni di DNA sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% o al 2% preparati in tampone TAE 1X (TAE 50X: 2 M Trizma Base, 0.05 M EDTANa₂, acido acetico glaciale, pH8.2) e contenenti bromuro di etidio alla concentrazione finale di 0.5 µg/ml. Ai campioni di DNA da analizzare è stato aggiunto tampone di caricamento 5X (25.5% glicerolo, 0.05% blu di bromofenolo (BPB), 0.05 M EDTANa₂ pH8.0). La corsa elettroforetica sono state condotte in tampone TAE 1X, ad un voltaggio costante di circa 10 V/cm (gel 5x7.5 cm) o 6 V/cm (gel 15x20 cm).

Estrazione e purificazione del DNA da gel di agarosio

Frammenti di DNA, o plasmidi digeriti per gli esperimenti di clonaggio, sono stati recuperati da gel e purificati utilizzando il kit Qiagen *Gel Extraction* (Qiagen) seguendo il protocollo consigliato dalla casa produttrice.

Amplificazione di frammenti di DNA mediante reazione a catena della polimerasi

L'amplificazione di specifici frammenti di DNA è stata ottenuta mediante reazione di polimerizzazione a catena (Polymerase Chain Reaction, 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 degli inneschi

oligonucleotidici vengono fatti appaiare al DNA a singolo filamento, ad una temperatura scelta in funzione del grado di omologia tra gli inneschi ed il DNA stampo e alla composizione in basi degli inneschi; nella terza fase l'elica complementare di DNA viene sintetizzata a 72°C a partire dall'innesco appaiato ad opera della DNA polimerasi termoresistente di *Termophilus aquaticus* (*Taq*). Le tre fasi sono ripetute per un numero di cicli (25-30) sufficiente a consentire l'amplificazione specifica della sequenza di DNA compresa tra i 2 inneschi di un fattore 2ⁿ, dove n indica il numero dei cicli. La miscela di reazione è stata preparata nel modo seguente: 3 µl di tampone di reazione *Taq* 10X (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH8.8, 0.1% Tween-20) (Euroclone), 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, innesco senso e innesco antisenso alla concentrazione finale di 6.6 ng/µl ciascuno, 1.6 mM MgCl₂, 15-20 ng di DNA stampo, 1 unità (U) di DNA polimerasi *Taq* (EuroTaq, Euroclone), bdH₂O sterile per un volume finale di 30 µl. Per l'amplificazione è stato usato il termociclatore PCR Express Hybaid. Le condizioni di reazione generalmente adottate sono state le seguenti: un primo ciclo di 2' a 94°C (denaturazione), seguito da 28 cicli di 45" a 94°C (denaturazione), 45" a 54°C (appaiamento) e 1' a 72°C (sintesi), e infine incubazione di 10' a 72°C per completare la sintesi.

La tecnica di PCR è stata utilizzata anche per la rapida individuazione delle colonie di *E. coli* trasformate con i prodotti delle reazioni di ligazione (Sandhu *et al.*, 1989). In breve, una piccola aliquota di cellule batteriche è stata prelevata toccando la colonia con l'estremità di un'ansa sterile. L'ansa è stata quindi immersa in provette da PCR da 0.2 ml, contenenti il tampone di reazione, e poi utilizzata per effettuare uno striscio su piastre di LB/agar contenenti antibiotico. La PCR da colonia è stata effettuata utilizzando inneschi specifici per il vettore plasmidico nelle seguenti condizioni: un primo ciclo di 7' a 94°C per determinare la rottura delle cellule batteriche, seguito da 33 cicli di 45" a 94°C (denaturazione), 45" a 54°C (appaiamento) ed 1' a 72°C (sintesi), ed infine incubazione di 10' a 72°C per completare la sintesi.

Determinazione delle sequenze nucleotidiche

Le reazioni per il sequenziamento di sequenze nucleotidiche è stato effettuato dalla ditta BMR Genomics di Padova. I campioni di DNA da sequenziare miscelati agli inneschi oligonucleotidici specifici, sono stati liofilizzati mediante trattamento al calore (56°C per 10') in provette Eppendorf da 1.5 ml. L'elaborazione dei dati è stata effettuata con i programmi Finch TV 1.4.0 (Geospiza Inc.) per gli elettroferogrammi e Vector NTI 10 Advance (Invitrogen Inc.) per le sequenze nucleotidiche.

Analisi bioinformatica

Banche dati ed algoritmi utilizzati per l'analisi bioinformatica

Per effettuare l'analisi bioinformatica dei dati sono stati utilizzati le seguenti banche dati ed i seguenti algoritmi:

- Genebank del *National Institute of Health* americano, una raccolta annotata di tutte le sequenze di DNA disponibili al pubblico (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).
- *Protein Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTP) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), un algoritmo che consente di identificare proteine con sequenza omologa a quella di una proteina di interesse.
- *Protein Data Bank* (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) del *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB), archivio delle strutture delle macromolecole biologiche determinate sperimentalmente.
- DeepView Swiss PDB Viewer V3.7 (<http://www.expasy.ch/spdbv/>) e Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) dell' ExPASy (Expert Protein Analysis System) *Proteomics Server*, PyMol V0.99 (<http://pymol.sourceforge.net/>), MODWEB (www.salilab.org/modweb), e CPHmodels 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) del *Center for Biological Sequence Analysis* della *Technical University* danese, tutti programmi che consentono la visualizzazione della struttura tridimensionale di macromolecole biologiche e/o la costruzione di modelli strutturali.
- Tm-Score (<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/TM-score/>) e Tm-Align (<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/TM-align/>), programmi in linea per la valutazione dei modelli strutturali.

Tecniche per la manipolazione delle piante

Crescita, mantenimento in coltura delle piante, e modalità di conservazione dei tessuti vegetali

Piante di *Nicotiana benthamiana* sono state seminate e cresciute in una miscela di torba, in condizioni di fotoperiodo standard (16 ore di luce alternate a 8 ore di buio) e temperatura costante di 23°C, all'interno di una serra a contenimento. Dopo il campionamento i tessuti vegetali sono stati rapidamente congelati in azoto liquido e quindi conservati a -80°C.

Stress abiotico delle piante mediante *shock* termico

A 40 giorni dalla germinazione gruppi di 10 piante di *N. benthamiana* sono stati sottoposti a stress da *shock* termico mediante permanenza per 4 ore in una stufa termostata a 42°C, al buio ed in presenza di acqua per evitare la disidratazione. Al termine del trattamento le piante sono state ricollocate nella serra a contenimento in condizioni standard.

Stress abiotico delle piante mediante danno meccanico

A 40 giorni dalla germinazione gruppi di 10 piante di *N. benthamiana* sono stati sottoposti a stress da danno meccanico mediante recisione di una foglia del fitomero superiore ai cotiledoni o di una foglia dal fitomero immediatamente sotto l'apice.

Stress biotico delle piante mediante inoculo con vettori di espressione virale

A 35 giorni dalla germinazione gruppi di 10 piante di *N. benthamiana* sono stati cosparsi sulle due foglie del fitomero superiore ai cotiledoni con silice di carburo (VWR International). Su ciascuna foglia sono stati quindi distribuiti 50 µl di bdH₂O contenenti 20 µg del vettore di espressione virale pPVX201. La superficie delle foglie è stata delicatamente abrasa per favorire l'ingresso del vettore virale nelle cellule del mesofillo fogliare.

Stress biotico delle piante mediante agroinfiltrazione

A 45 giorni dalla germinazione gruppi di 10 piante di *N. benthamiana* sono stati infiltrati con cellule di *A. tumefaciens* in sospensione. In breve, sulla pagina inferiore di due/tre foglie per pianta sono stati praticate delle incisioni nello spazio fra le venature, in corrispondenza delle quali utilizzando una siringa da 2 ml privata dell'ago, sono stati infiltrati 1-2 ml di una sospensione di cellule batteriche.

Alternativamente, negli esperimenti di produzione su grande scala, piante di *N. benthamiana* della medesima età sono state capovolte e le foglie dei palchi più alti immerse nel contenitore in polipropilene di una campana da vuoto (Sigma) contenente la sospensione di *A. tumefaciens*. Una volta sigillata la campana, dopo avere generato il vuoto mediante l'ausilio di un compressore e re-introducendo poi l'aria, la sospensione batterica è stata infiltrata nella quasi totalità dei tessuti delle piante.

Tecniche per la manipolazione delle proteine

Estrazione delle proteine solubili totali dai tessuti vegetali per l'analisi elettroforetica

Estratti proteici totali dei tessuti fogliari sono stati ottenuti in provette Eppendorf da 2 ml omogeneizzando 400 µg di tessuto vegetale (precedentemente congelato in azoto liquido) in PBS 1X (Phosphate Buffered Saline; PBS 10X: 1.5 M NaCl, 0.015 M Na₂HPO₄·H₂O, 0.09M NaH₂PO₄·12H₂O, pH 7.2) freddo addizionato con 0.5 mM fluoruro di fenilmetansulfonile (*PhenylMethaneSulphonylFluoride*, PMSF) utilizzando l'omogeneizzatore automatico Ultraturrax T25 basic IKA-WERKE. L'omogenato è stato quindi centrifugato per due volte a 20000xg, 4°C per 30', recuperando ogni volta il sopranatante che può essere analizzato immediatamente o conservato a -20°C.

Estrazione delle proteine da tessuti vegetali per gli esperimenti immunologici

Preparazione dell'estratto proteico totale

Le foglie di *N. benthamiana* sono state polverizzate con un pestello in un mortaio. La polvere è stata quindi velocemente aggiunta a PBS 1X contenente 0.5 mM PMSF, precedentemente raffreddato in ghiaccio, in un rapporto 1/4 (g tessuto fogliare/ml tampone). La sospensione ottenuta è stata quindi omogeneizzata utilizzando l'omogeneizzatore automatico Ultraturrax T25 basic IKA-WERKE e poi filtrata su doppio strato di carta Miracloth (Calbiochem) per eliminare il particolato.

Precipitazione differenziale dell'estratto proteico mediante aggiunta di ammonio solfato (Salting in/Salting out)

La tecnica si basa sul fatto che la solubilità delle proteine è funzione del loro punto isoelettrico e quindi della forza ionica del tampone in cui si trovano. E' quindi possibile ottenere la precipitazione differenziale delle proteine presenti in un campione variando la forza ionica del tampone ad esempio mediante l'aggiunta di ammonio solfato.

Tutta la procedura è stata effettuata in camera fredda a (4°C).

Giorno 1:

L'estratto proteico totale preparato in PBS 1X, 0.5 mM PMSF è stato centrifugato due volte a 20000xg, 4°C per 30' in tubi di polipropilene tipo *Oak Ridge* da 25 ml, recuperando entrambe le volte il sopranatante. Dopo la seconda centrifugazione il campione è stato portato a 40% di saturazione con ammonio solfato solido, aggiunto lentamente, e lasciato in agitazione per 2 ore. La soluzione è stata quindi centrifugata a 18000xg, 4°C per 35' ed il sopranatante recuperato e portato all'80% di saturazione con ammonio solfato solido, aggiunto lentamente, per essere quindi lasciato in agitazione o.n..

Giorno 2:

La soluzione è stata centrifugata a 18000xg, 4°C per 35'. Il *pellet* è stato quindi risospeso in metà del volume iniziale, in tampone A (50 mM Tris-HCl pH7.8, 1 mM EDTA_{Na2}, 0.1 mM DTT, 1% (v/v) glicerolo). La soluzione, resa 0.9 M ammonio solfato, dopo 30' in agitazione è stata centrifugata a 18000xg, 4°C, per 30'. Il sopranatante è stato quindi portato a 3.0 M ammonio solfato aggiunto lentamente e la soluzione lasciata per un'ora in agitazione. Dopo centrifugazione a

18000xg, 4°C per 30', il *pellet* è stato risospeso in 50 ml di tampone A e lasciato in dialisi contro tampone A o.n.

Rimozione dei sali dal campione proteico e sostituzione del tampone

Questa tecnica cromatografia, basata sull'impiego di resine per gel-filtrazione a piccoli pori, consente di separare soluti ad alto peso molecolare da sali o solventi organici. Infatti mentre le macromolecole vengono eluite con il volume vuoto, i sali a basso peso molecolare vengono trattenuti dalla matrice.

Preparazione della colonna

Cinque gr di Sephadex G25 (destrano) (GE) sono stati idratati nel tampone nel quale si desiderava fosse trasferito il campione (tampone di destinazione) (da questo quantitativo di resina si ottiene una sospensione finale di circa 25 ml), in un tubo da 50 ml (Falcon, BD) mediante gentile agitazione. La resina è stata quindi trasferita in colonne cromatografiche vuote (Bio-Rad), lasciata sedimentare per gravità e quindi lavata per due volte con dieci volumi-colonna (volume della resina idratata e sedimentata nella colonna) di tampone di destinazione e conservata a 4°C con l'aggiunta dell'agente antimicrobico sodio azide allo 0.02%.

Sostituzione del tampone

Nove ml del campione proteico a cui si voleva sostituire il tampone sono stati applicati alla colonna di Sephadex. Dopo aver portato a secco la colonna, sono stati caricati 12.6 ml del tampone di destinazione che sono stati quindi raccolti perché contenenti la miscela proteica. Prima di essere riutilizzata la colonna è stata lavata ed equilibrata nuovamente con 10 ml di tampone destinazione.

Saggio di Bradford per la determinazione della concentrazione delle proteine

La concentrazione delle proteine totali presenti negli estratti vegetali o nelle frazioni eluite dalle colonne cromatografiche è stata determinata con il saggio messo a punto da Bradford (Bradford, 1976) che si basa sulla modificazione del picco massimo di assorbimento della luce visibile del colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* (da 465 nm, rosso, a 595 nm, blu) a seguito del legame con proteine risospese in soluzioni acide. Per il saggio è stato utilizzato il kit Micro Assay (Bio-

Rad). La concentrazione dei campioni è stata determinata facendo riferimento alla curva di titolazione della sieralbumina bovina (*Bovine Serum Albumin*, BSA).

Cromatografia per affinità su resina adenosinadifosfato (adenosindiphosphate, ADP)-agarosio

Questa tecnica consente di purificare una proteina sfruttandone l'affinità per un ligando.

Preparazione della resina

0.4 grammi di resina ADP-agarosio (Sigma) sono stati idratati mediante gentile agitazione in 30 ml di tampone B freddo (20 mM Tris-acetato, 20 mM NaCl, 15 mM β -mercaptoetanolo, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM PMSF, pH7.5) in un tubo da 50 ml (Falcon, BD). La resina è stata quindi lavata per due volte, per rimuovere residui di lattosio, con 30 ml di tampone B lasciando ogni volta sedimentare la matrice e sostituendo il sovrastante tampone. La matrice in sospensione è stata quindi trasferita in una colonna cromatografica vuota (Econo-pack), lasciata sedimentare (volume-colonna: 5 ml) e lavata per due volte con due volumi-colonna di tampone B. Per la conservazione al tampone B sono stati aggiunti 2 g/ml di lattosio e 0,02% sodio azide.

Applicazione del campione alla colonna ed eluizione

Dopo il caricamento sulla colonna dei campioni proteici in tampone B la colonna è stata lavata in sequenza con:

- 10 volumi di tampone B;
- 10 volumi di tampone B contenenti 0.5 M NaCl;
- 10 volumi di tampone B;

Per verificare che alla fine dei lavaggi non fossero presenti proteine residue, un'aliquota dell'eluato dell'ultimo lavaggio è stato analizzata mediante saggio di Bradford.

L'eluizione delle HSP70 è stata quindi effettuata applicando una quantità pari ad 1/3 del volume-colonna di tampone B contenente 3 mM ADP (tampone B/ 3 mM ADP), incubando per 30' a temperatura ambiente la colonna chiusa e quindi raccogliendo le frazioni che fuoriuscivano dalla colonna dopo aver aggiunto sulla matrice 5 volumi-colonna di tampone B/ 3 mM ADP.

Cromatografia per gel filtrazione

Questa tecnica permette di separare i vari componenti di una miscela proteica in base al loro peso molecolare. Una colonna di Superdex 75 10/300 GL (GE) (agarosio covalentemente legato a destano) con un limite di esclusione molecolare per proteine globulari di circa di $1 \times 10^5 M_r$, è stata impiegata accoppiata al sistema automatizzato AKTA design[®] (GE) che governa l'applicazione del campione, i lavaggi ed il recupero dell'eluato. La colonna è stata equilibrata in tampone PBS 1X e conservata in 20% etanolo in bdH_2O . Prima di essere utilizzata la colonna è stata lavata con 2 volumi-colonna di tampone PBS 1X con un flusso costante di 1 ml/min. Il campione è stato preparato e iniettato in colonna secondo le indicazioni del produttore. Le frazioni eluite (500 μ l-1 ml) sono state raccolte da un collettore automatico (FRAC-920, GE) in tubi Eppendorf da 2 ml.

Elettroforesi delle proteine su gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE; metodo di Laemmli)

La separazione elettroforetica delle proteine è stata effettuata utilizzando gel denaturanti di poliacrilammide (metodo di Laemmli, 1970, SDS-PAGE) in cui le proteine vengono separate in funzione del loro peso molecolare. Il gel denaturante discontinuo è costituito da una parte iniziale a "maglie" più larghe (*stacking gel*) che ha la funzione di compattare le proteine prima che queste accedano ad una parte a "maglie" più fitte (*separating gel*) in cui le proteine vengono divise in base al loro peso molecolare. Lo *stacking gel* (4% poliacrilammide (acrilamide/bisacrilammide 29:1), 0.1% Sodio Dodecil Fosfato (SDS), 0.06% Ammonio persolfato (APS), 0.2% TEMED in *stacking buffer* 1X (0.125 M Tris-HCl pH6.8) è stato colato sul *separating gel* (13.5% poliacrilammide, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.1% TEMED in *separating buffer* 1X (0.4 M Tris-HCl pH8.8)) quando questo aveva già polimerizzato. Per la corsa elettroforetica il gel è stato posizionato nell'apparato verticale Mini-Protean 3 (Bio-Rad) ed immerso nel tampone di corsa 1X (*Running buffer* 5X: 0.95 M glicina, 0.1M Trizma Base, 5% SDS, pH8.3).

I campioni sono stati caricati su gel previa aggiunta di tampone di caricamento 3X (24% glicerolo, 0.15M Tris-HCl pH6.8, 0.1% BPB, 1.6% SDS, 3% β -mercaptoetanolo) e denaturazione per 5' in acqua a 100°C. Come riferimento sono stati caricati i marcatori di peso molecolare ColorBurst (10-250KDa; Sigma) e *Pre-stained low-range Protein Ladder* (Roche). La corsa elettroforetica è stata

effettuata ad una differenza di potenziale costante di 130V fino alla fuoriuscita del colorante (circa 60').

Tecniche per la colorazione delle proteine separate elettroforeticamente

Colorazione con il Blue di Coomassie

Dopo la corsa elettroforetica, il gel è stato immerso in una soluzione di colorazione contenente 40% metanolo, 20% acido acetico e 1 mg/ml di *Coomassie Brilliant Blue* R250, preparata in bdH_2O agitando con cura con un magnete e quindi filtrando con carta Whatman 1MM. Dopo circa 1 ora e 30' di incubazione in condizioni di agitazione orbitale, la soluzione di colorazione è stata sostituita con quella di decolorazione contenente 40% metanolo e 20% di acido acetico e l'incubazione protratta, sostituendo di tanto in tanto la soluzione, fino a quando sul gel non fossero evidenti le bande

Colorazione con nitrato d'argento

Tutto il protocollo è stato condotto a temperatura ambiente e le soluzioni impiegate sono state preparate diluendo i componenti in bdH_2O . Per fissare le proteine al gel, il gel è stato incubato in agitazione per 30' immerso in 50 ml di soluzione di fissaggio (50% metanolo, 12% acido acetico, 37% formaldeide). Il gel è stato quindi lavato in agitazione per due volte per 10' in 50 ml di etanolo al 50% e poi immerso per 1' in 50 ml di soluzione di pre-trattamento (200 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Dopo due rapidi risciacqui con bdH_2O il gel è stato quindi immerso dapprima in 50 ml della soluzione di colorazione (2 g/l AgNO_3 , 37% formaldeide), lavato due volte con bdH_2O e poi immerso in 50 ml della soluzione di sviluppo (60 g/l Na_2CO_3 , 37% formaldeide, 200 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) sino a che le bande delle proteine non siano sufficientemente visibili. La reazione di sviluppo è stata bloccata immergendo il gel in 50 ml di una soluzione contenente 50% Metanolo e 12% Acido Acetico. Il gel così colorato è stato lavato con bdH_2O e conservato in 10% di glicerolo.

Analisi Western

Questa tecnica consente di rivelare in maniera specifica la presenza delle proteine di interesse dopo che queste siano state trasferite dal gel di poliacrilammide su una membrana.

Le proteine, separate mediante SDS-PAGE, sono state trasferite elettroforeticamente dal gel su di una membrana di polivinilidene-fluoruro (*polyvildene fluoride*, PVDF; Immobilon-P, Millipore) al voltaggio costante di 100V per 1 ora a +4°C utilizzando l'apparato Mini Trans-Blot *module* (Bio-Rad) ed il tampone di trasferimento costituito da 20mM Trizma Base, 144mM glicina, , 20% metanolo. La membrana è stata quindi immersa per tutta la notte a 4°C in una soluzione 5% latte (SIMILAC formula PLUS, Abbott) in PBS 1X per rivestire i siti su cui non si erano trasferite proteine dal gel (*blocking*). Il giorno successivo la membrana è stata lavata per tre volte per 10' con PBS-T (PBS 1X, 0,1% Tween-20), per 2 volte per 10' con PBS 1X e quindi incubata per 2 ore a temperatura ambiente in 6 ml di PBS 1X contenente 2% di latte ed un anticorpo appropriato (anticorpo primario). In particolare per evidenziare la presenza delle HSP70 è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale murino anti-HSP72/73 (Sigma) (diluizione 1:2500), mentre per evidenziare la presenza della nucleoproteina (NP) del virus dell'influenza è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale di coniglio anti-NP (Imgenex) (diluizione 1:166).

Dopo l'incubazione la membrana è stata lavata come sopra e poi incubata per 1 ora a temperatura ambiente in 6 ml di PBS 1X contenente 2% di latte e, a seconda dell'anticorpo primario utilizzato, un anticorpo policlonale anti-immunoglobuline di topo coniugato con l'enzima perossidasi di rafano (*Horse Radish Peroxidase*, HRP) (anti-*mouse*-HRP, GE; diluizione 1:5000) o un anticorpo policlonale anti-immunoglobuline di coniglio biotilinato (anti-*rabbit* biotilinato, KPL; diluizione 1:5000) e HRP (diluizione 1:2000).

L'enzima HRP catalizza la reazione cromogena che evidenzia il legame con l'anticorpo secondario a quello primario, il quale a sua volta interagisce con le proteine immobilizzate sulla membrana.

La membrana è stata lavata come sopra e bagnata con 1 ml di soluzione per la rivelazione mediante chemiluminescenza delle proteine immobilizzate su membrane (kit ECL, GE). Questa soluzione contiene luminolo ed attivatori chimici in grado di rilevarne l'ossidazione indotta dall'enzima HRP. Il segnale luminoso è stato rilevato mediante esposizione della membrana su lastra fotografica (Polaroid Film 667). Alternativamente, la membrana PVDF trattata con la soluzione per la rivelazione è stata inclusa in un film plastico e rivelata con sistema automatizzato (Typhoon, GE) ottenendo l'immagine digitale del segnale.

Saggio Immunoenzimatico (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA)

Questa tecnica permette di individuare la presenza della proteina di interesse in una miscela, previa adesione delle proteine su plastiche trattate e successiva ibridazione con anticorpi.

Giorno 1:

Nei pozzetti di piastre ELISA (Nunc) sono stati distribuiti in duplicato 100µl di estratto vegetale o di intermedio di purificazione. Come controllo positivo del saggio è stata utilizzata la proteina di interesse nella forma ricombinante o purificata. In particolare sono state utilizzate:

- 200 ng di proteina HSP70 ricombinante prodotta in *E. coli* (Sigma)
- 200 ng di proteina NP ricombinante prodotta in cellule di insetto (Imgenex)
- 300 mg di PVX estratto e purificato da tessuto vegetale.

Come controllo negativo, alcuni pozzetti hanno ricevuto solamente il tampone PBS 1X, o solamente l'anticorpo primario. Le piastre sono state quindi incubate o.n. a 4°C (*coating*) in modo da permettere il legame delle proteine alla superficie di plastica del pozzetto.

Giorno 2:

I pozzetti sono stati lavati 3 volte con PBS-T 1X ed una volta con PBS 1X per poi ricevere 300 µl di in una soluzione 5% latte in PBS 1X la cui funzione è quella di rivestire i siti su cui non si sono adese proteine (*blocking*). Dopo incubazione delle piastre a 37°C per 2 ore, i pozzetti sono stati lavati come sopra ed hanno quindi ricevuto 100µl di PBS 1X contenente 2% di latte e un anticorpo idoneo al riconoscimento della proteina di interesse (anticorpo primario). In particolare sono stati utilizzati:

- per evidenziare le HSP70, l'anticorpo monoclonale murino anti-HSP72/73 (Sigma) alla diluizione di 1:800;
- per evidenziare la NP, l'anticorpo monoclonale di coniglio anti-NP (Imgenex) alla diluizione di 1:166;
- per evidenziare la proteina di rivestimento (*coat protein*, CP) del virus X della patata (Potato virus X, PVX), l' anticorpo policlonale di coniglio ant-PVX (ADGEN) alla diluizione di 1:200.

Dopo incubazione di 2 ore a 37°C i pozzetti sono stati lavati come sopra e poi incubati per 1 ora a 37 °C con 100 µl di PBS 1X contenente 2% latte ed un anticorpo policlonale secondario anti-immunoglobuline di topo o di coniglio a seconda dell'anticorpo primario utilizzato:

- per l'anticorpo primario murino, anti-*mouse*-HRP (GE) alla diluizione 1:5000;
- per l'anticorpo primario di coniglio, anti-*rabbit* biotinilato (KPL) alla diluizione di 1:5000 e HRP alla diluizione di 1:2000.

I pozzetti sono stati quindi lavati come sopra, per poi ricevere 100µl di una soluzione contenente gli attivatori chimici in grado di rilevare l'ossidazione indotta dall'enzima HRP, a sua volta rivelatore dell'eventuale legame anticorpo-anticorpo-antigene. La misura dell'assorbanza è stata effettuata dopo incubazione a temperatura ambiente per 30-45 minuti alla lunghezza d'onda di 405 nm utilizzando il lettore ELISA SUNRISE (Tecan).

Analisi tramite spettrometria di massa delle proteine separate tramite SDS-PAGE

Digestione in-gel delle proteine separate tramite SDS-PAGE-Riduzione e alchilazione

Le bande di interesse vengono asportate dall' SDS_PAGE, precedentemente colorato tramite Blue di Coomassie, tramite una lama sterile e posta in una provetta eppendorf da 1.5 ml. Le particelle di gel sono state lavate con 150 µl di H₂O bd per 5'. Le particelle di gel sono state poi disidratate tramite aggiunta di 120 µl di acetonitrile puro, in seguito riaspirato. Le particelle di gel sono state poi risospese in 150 µl di un tampone che permette di ridurre le proteine (10 mM ditionitrolo, 0.1 M NH₄HCO₃) e lasciate in tale tampone per 30' a 56 °C. Il supernatante è stato rimosso e il gel è stato nuovamente disidratato con aggiunta di 100 µl di aceto nitrile puro. L'acetonitrile viene rimosso e sostituito con 100 µl di un tampone contenente 55 mM iodoacetamide e 0.1 M NH₄HCO₃, il gel viene poi incubato per 20' a temperatura ambiente al riparo dalla luce. Il tampone è stato poi rimosso ed il gel nuovamente disidratato aggiungendo 100 µl di aceto nitrile puro.

Digestione in-gel- tripsinizzazione

Le particelle di gel sono state riidratate in 45 µl di tampone di digestione (50 mM NH₄HCO₃, 5mM CaCl₂, 0.1 µg/µl Tripsina ((Sigma))) ed incubate per 45' a 4°C. Il tampone è stato poi rimosso e sostituito con 25 µl dello stesso tampone; il gel è stato incubato a 37°C o.n.

Estrazione dei peptidi

15 µl di H₂O bd sono stati aggiunti alla reazione di tripsinizzazione e la soluzione così ottenuta è stata incubata per 15' a 37°C. Sono state aggiunti 20 µl di aceto nitrile puro e la sospensione incubata per 15' a 37 °C in agitazione. La sospensione è stata poi centrifugata a 1000 xg per 3' ed il supernatante è stato recuperato. Sono stati aggiunti 45 µl di 5% acido formico e la soluzione è stata incubata per 15' a 37°C. La soluzione è stata centrifugata a 10000xg per 3', il supernatante viene scartato ed è stato aggiunto 40 µl di acetonitrile puro. La soluzione è stata incubata per 15' a 37 °C in agitazione. La soluzione è stata centrifugata a 10000xg per 3' ed il supernatante è stato scartato. Le particelle di gel così trattate sono state sospese in 10 µl di un tampone acquoso contenete 3% acetonitrile e 0,1% acido formico (soluzione di estrazione) in modo da solubilizzare i peptidi.

Analisi spettrofotometrica

La miscela peptidica così ottenuta (peptidi derivante dalla proteolisi mediante trispina delle proteine contenute originariamente nelle bande di gel analizzate) stata separata su chip analitico Agilent a fase inversa (Agilent, G4240-62001; 40 nl enrichment column, 75 µm x 43 mm analytical column. Stationary phase: 5 mm, C-18 SB-ZORBAX, 300A-), usando un gradiente lineare dal 5% al 60% di acetonitrile in 60 minuti, ad una velocità di flusso di 0.30 microlitri/min. gli spettri sono stati acquisiti in un range di m/z che va da 200-2000.i dati sono stati rielaborati utilizzando il software Spectrum Mill MS Proteomics Workbench (G2721A) e NCBIInr come db di riferimento.

Tecniche per gli esperimenti di immunologia

Animali

Sono stati utilizzati topi C57Bl/6 femmine di 5-6 settimane di età (Harlan). I topi sono stati tabulati a temperatura (20°C) ed umidità (60%) costanti, con libero accesso a cibo standard ed acqua acidificata.

Preparazione degli antigeni e dei mitogeni

Il peptide sintetico con sequenza ASNENMETM prodotto dalla ditta Proimmune con grado di purezza >70%, è stato risospeso alla concentrazione di 20 mg/ml in 100% Dimetilsofossido (DMSO)(Sigma) e conservato a -20°C.

La forma ricombinante della nucleoproteina (NP) del virus A dell'influenza, prodotta in cellule di insetto, è stata acquistata presso la ditta Imgenex.

L'acetato miristico del forbolo (Phorbol Myristic Acetate, PMA) (Sigma) e la ionomicina (Sigma) sono stati diluiti in DMSO rispettivamente alla concentrazione di 10 µg/ml e 1 mg/ml e conservati a -20°C.

Immunizzazioni

I topi sono stati immunizzati sottocute alla base della coda per due volte a 7 giorni di intervallo con:

- 50µl di una emulsione acqua in olio ottenuta miscelando 25µl di PBS 1X con 25µl di adiuvante incompleto di Freund (*Incomplete Freund's Adjuvant*, IFA, Sigma);
- 50µl di una emulsione acqua in olio ottenuta miscelando 25µl di PBS 1X contenenti 40µg del peptide sintetico ASNENMETM con 25µl di IFA;
- 50µl di PBS 1X contenenti 40µg di HSP, estratte e purificate da piante di *N. benthamiana* di tipo selvatico;
- 50µl di PBS 1X contenenti 40µg di HSP, estratte e purificate da piante di *N. benthamiana* che esprimevano in maniera transiente la proteina NP del virus dell'influenza.

Il peptide diluito in DMSO è stato scongelato e un'aliquota è stata diluita in PBS 1X alla concentrazione finale di 2 mg/ml.

Per preparare le emulsioni sono state utilizzate coppie di siringhe in vetro da tubercolina collegate da connettori Luer-Lock femmina-femmina (Sigma).

Saggio ELISPOT (*Enzyme-linked immunosorbent spot*)

Questa tecnica permette di enumerare i linfociti T citotossici specifici per un antigene presenti nelle milze di topi immunizzati, mediante l'individuazione in colture *ex-vivo* delle cellule in grado di secernere la citochina interferone- γ (IFN- γ) in seguito a stimolazione con lo stesso antigene utilizzato per le immunizzazioni. La tecnica adotta a tal fine i principi del cosiddetto *sandwich*

ELISA, basato sull'impiego di anticorpi ad alta affinità per la cattura e la rilevazione della citochina di interesse. L'ELISPOT fornisce informazioni sia qualitative (tipo di citochina) che quantitative (numero di cellule che rispondono).

Il saggio ELISPOT è stato effettuato utilizzando il kit *Mouse Interferon-gamma* (e-Bioscience) seguendo le indicazioni della ditta produttrice.

In breve, il giorno prima del sacrificio nei pozzetti di apposite piastre il cui fondo è rivestito di membrana PVDF (96 well PVDF membrane ELISPOT plates) sono stati distribuiti 100 µl dell'anticorpo di cattura della citochina IFN-γ (fornito dal kit), diluito nell'apposito tampone (Coating buffer fornito dal kit) e le piastre sono state quindi incubate a 4°C.

Il giorno successivo i topi sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale. Le milze di ciascun topo, prelevate sterilmente, sono state poste in piastre Petri contenenti 5 ml di terreno di coltura incompleto (RPMI1640, 2mM l-glutamina; 100 µg/ml penicillina G, 100 U/ml streptomicina; Sigma), e dissociate in una sospensione cellulare. Ogni milza è stata delicatamente svuotata con due pinzette su una retina d'acciaio, e gli eventuali agglomerati cellulari sono stati dissociati con pipettamento. La sospensione cellulare così ottenuta, è stata trasferita in una provetta conica e lasciata sedimentare per circa 3 minuti in modo da far depositare i frammenti di tessuto ed i detriti cellulari. Quindi la sospensione è stata trasferita in un'altra provetta conica e centrifugata a 1200 rpm per 10 minuti a 4°C; il sopranatante è stato eliminato per svuotamento ed il sedimento risospeso nel terreno di coltura completo (terreno di coltura incompleto addizionato con 10% siero fetale bovino inattivato al calore (56°C per 30'))(Sigma). Un'aliquota della sospensione è stata prelevata per la stima del numero di cellule nucleate e contata in una camera di Burker. La sospensione cellulare è stata poi portata alla concentrazione desiderata mediante aggiunta di terreno di coltura completo.

Dopo aver lavato per tre volte con terreno di coltura completo i pozzetti delle piastre incubate o.n. con l'anticorpo di cattura, 100 µl di sospensioni cellulari preparate con gli splenociti di ciascun gruppo sperimentale e contenuti 5×10^5 , 2.5×10^5 o 1.25×10^5 sono stati distribuiti in triplicato nei pozzetti. Ai pozzetti sono stati quindi aggiunti 100 µl di: terreno di coltura completo da solo, per la stima del numero di cellule che spontaneamente rilasciano IFN-γ (risposta di fondo delle cellule in coltura) o contenenti l'appropriato stimolo antigenico. Come controllo positivo interno dell'esperimento 100 µl di sospensioni cellulari preparate con gli splenociti di ciascun gruppo sperimentale e contenuti 2×10^4 , 1.0×10^4 o 0.5×10^4 sono stati distribuiti in triplicato e stimolati con 100 µl il terreno di coltura completo contenenti 1ng PMA/0.5 mg Ionomicina/ml (stimolo mitogenico), per verificare la funzionalità delle cellule in coltura (controllo positivo).

Le piastre sono state quindi incubate per 20 ore al buio, a 37°C in presenza di 0.5% CO₂.

Il giorno successivo i pozzetti sono stati lavati per tre volte con 200 μ l di PBS-T 1X per poi essere incubati per 2 ore a temperatura ambiente con l'anticorpo biotinilato per la rivelazione dell'IFN- γ fornito dal kit, diluito nell'apposito tampone (Assay diluent 5X fornito dal kit, diluito 5 volte con H₂O alla concentrazione di utilizzo). Dopo 4 lavaggi con 200 μ l di PBS-T 1X i pozzetti sono stati incubati con avidina-HRP per 45'. Per rivelare la presenza dell'IFN- γ i pozzetti sono stati quindi nuovamente lavati per 3 volte con 200 μ l di PBS-T 1X e per 2 volte con 200 μ l di PBS 1X ed hanno quindi ricevuto 100 μ l del substrato 3-amino-9-etil-carbazolo (AEC) (Sigma) diluito in una soluzione 0.1 M Na acetato pH5.0 addizionata con H₂O₂ (Riedel-DeHaen). La reazione di sviluppo è stata bloccata dopo circa 30' mediante 3 lavaggi con 200 μ l di bdH₂O.

La conta del numero degli *spot* presenti sulle membrane nei pozzetti è stato effettuato dopo completa asciugatura (24 ore a temperatura ambiente al buio) utilizzando il lettore ELISPOT (Eli-expert, A.EL.VIS) in combinazione con il programma dedicato (Eli.Analyse, A.EL.VIS)

RISULTATI

Caratterizzazione strutturale delle HSP espresse nei tessuti vegetali mediante l'impiego di strumenti bioinformatici

Analisi del grado di omologia esistente tra i membri della famiglia delle HSP70 animali e vegetali

Per verificare la possibilità di utilizzare le HSP vegetali come veicolo di peptidi di interesse immunologico, si è in primo luogo valutato il livello di omologia esistente fra le isoforme delle HSP70 vegetali ed animali, partendo dal presupposto che spesso all'elevata omologia strutturale si accompagna anche l'analogia funzionale (Lee et al., 2007).

Nella fase preliminare le sequenze aminoacidiche disponibili nella banca dati genetica GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>; Benson et al., 2007) di proteine riconducibili alla famiglia delle HSP70 umana, e in particolare quelle dell'isoforma citosolica costitutivamente espressa (HSC70, GeneID: 3312; Protein ID: P11142), dell'isoforma citosolica indotta (HSP70, GeneID: 3303; ProteinID: Q5JQI4) e dell'isoforma del reticolo endoplasmatico (GeneID:1143492; ProteinID: CAA61201), sono state analizzate utilizzando il programma *Protein Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTP) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Questo strumento informatico permette di paragonare una sequenza aminoacidica di interesse con quelle depositate nella banca dati genetica, di identificare regioni di similarità locale fra sequenze e di valutare il significato statistico degli appaiamenti risultanti. Questo tipo di analisi ha consentito di stabilire che le sequenze delle proteine vegetali aventi maggiore omologia con quelle umane sono quelle della specie *Nicotiana tabacum* alle quali si è fatto riferimento per le successive analisi (Fig. 2). Questo anche perché la specie *tabacum* è affine alla specie *benthamiana*, oggetto del presente studio, per la quale non sono ancora disponibili nella Genbank tutte le sequenze riconducibili ai geni espressi (*Expressed Sequence Tags*, EST), compresi quelli codificanti le HSP.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che tra le isoforme umane e quelle di *N. tabacum* si ha in media il 79% di identità (per identità si intende identico aminoacido in identica posizione) e l'88% di positività (per positività si intende la presenza di due aminoacidi differenti, ma con uguali proprietà nella medesima posizione; per esempio un residuo di glutammina al posto di uno di asparagina) (Tab. 2).

Nell'analisi è stata valutata anche l'omologia esistente tra le varie isoforme dei componenti della famiglia delle HSP70 umana e l'isoforma delle HSP70 di *E. coli*, DnaK, o la HSC70 bovina, poiché

entrambe sono state caratterizzate strutturalmente nel dettaglio mediante cristallografia a raggi X (PDB accession numbers 1DKZ, 1DKY, 1DKG e PDB accession number: 1YUW, rispettivamente) (Fig. 3).

Modellamento strutturale della HSC70 di *N. tabacum*

L'elevato livello di omologia esistente tra la struttura primaria delle HSP70 vegetali e quella delle corrispondenti isoforme di mammifero, ha consentito di costruire un modello verosimile della loro struttura tridimensionale con il metodo del modellamento per omologia (*homology modelling*) (Ginalski, 2006). Partendo dal principio che se due proteine presentano un elevato grado omologia (>50%) in termini di struttura primaria (sequenza aminoacidica) hanno elevata probabilità di assumere la medesima struttura tridimensionale, l'*homology modelling* consente di costruire il modello tridimensionale di una proteina di interesse (*target*) a partire dal suo allineamento con una o più proteine omologhe (*templates*), la cui struttura sia stata caratterizzata sperimentalmente.

Si è scelto di focalizzare gli esperimenti di modellamento sulle isoforme delle HSP70 citosoliche costitutivamente espresse perché sono quelle meglio descritte a livello strutturale e perché sono ubiquitariamente espresse in diverse condizioni fisiologiche (caratteristica che ne facilita l'individuazione e l'isolamento).

La sequenza della HSC70 di *N. tabacum* è stata quindi allineata con quella dell'HSC70 bovina, unica HSP di mammifero di cui sia stata definita sperimentalmente a livello atomico la struttura completa (78% di identità), e con le strutture risolte a livello atomico dei singoli domini delle HSC70 di ratto e bovina (PDB accession numbers: 1 UDO (79% identità), 2BUP (82% identità), 3HSC (80% identità)) (Flaherty et al. 1990; Cho et al., 2003; Jiang et al., 2005). E' stata inoltre inserita nell'allineamento la sequenza dell'isoforma batterica DnaK (Rudiger et al., 1997; Wang et al., 1998; Tapley et al., 2005) perché è noto che l'inserimento di proteine con minore identità conferisce maggiore solidità statistica al modello (Ginalsky, 2006).

I modelli sono stati ottenuti utilizzando il programma dedicato *Deep View Swiss PDB Viewer* (SPDBV) ver. 3.7 (Guex and Peitsch, 1997) ed i servizi disponibili *on-line*, SwissModel, ModWeb, I-Tasser e PCons, selezionati sulla base dell'elevato punteggio da questi ottenuto nei recenti esperimenti di valutazione critica delle tecniche di predizione della struttura delle proteine (*Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction*, CASP; <http://predictioncenter.org/casp7/>). Tali strumenti permettono di modellare anche le parti in cui la proteina incognita presenta bassa omologia di struttura primaria con i *templates*, facendo

riferimento ad una serie di banche dati di domini e al calcolo dell'energia libera di Gibbs delle diverse conformazioni possibili, individuando in tal modo quella più favorevole.

I modelli sono stati quindi validati mediante l'impiego degli algoritmi *on-line* *TM-align* e *TM-score* (Zhang and Skolnick, 2005), che ne valutano la qualità sia sulla base del confronto con strutture omologhe risolte sperimentalmente, sia sulla base delle caratteristiche energetiche e stereochimiche dei singoli residui nella conformazione spaziale proposta. *TM-align* consente di paragonare due proteine di sequenza differente trovando i migliori residui equivalenti tra le due proteine in base alle similarità di sequenza e generando poi il *TM-score*, che viene valutato con una procedura che attribuisce un valore maggiore alle similitudini migliori. Se un confronto *template*/modello ha un *TM-score* uguale o inferiore a 0.17 su base statistica, questo vuol dire che la predizione non ha nessun significato. In generale, un modellamento cui venga assegnato un *TM-score* < 0.2 indica che non c'è somiglianza tra le due strutture; un *TM-score* > 0.5 vuol dire invece che le due strutture hanno la stessa conformazione.

Sulla base di questo tipo di valutazione, il modello che ha ricevuto il punteggio più alto è stato quello generato dal *server* SwissModel e denominato HSP70-tab MOD (Tab. 3 e Fig. 4).

Il confronto del modello della HSC70 di *N. tabacum* con la struttura della HSC70 di *Bos Taurus*, sembra confermare che all'elevata omologia di sequenza corrisponde anche una elevata omologia della struttura tridimensionale. Sembrano essere parzialmente sovrapponibili anche quelle porzioni della proteina (anse o *loops*) generalmente prive di una struttura secondaria definita e spesso difficili da modellare.

Per quanto riguarda il domino N-terminale, coinvolto nell'interazione con i nucleotidi e provvisto dell'attività ATPasica (*Nucleotide Binding Domain*, NDB), il modello rispetta pienamente la topologia nota, caratterizzata da due lobi, entrambi all'incirca delle stesse dimensioni, separati da una profonda fessura centrale in corrispondenza della quale si posizionano l'ATP/ADP, ed ognuno dei quali può essere a sua volta diviso in due sotto-domini topologicamente distinti, formati da foglietti β antiparalleli con α eliche laterali (Fig. 5). In particolare, risultano conservati sia nella sequenza primaria che nella distribuzione spaziale, i residui Q¹⁷⁹, D²¹² e D¹³ (per quanto riguarda quest'ultimo sono conservati anche i residui circostanti; GIDLGTT) (Fig. 6) ipotizzati essere fondamentali per l'interazione con i nucleotidi (Flaherty et al., 1990).

Anche il dominio di legame al substrato (*Substrate Binding Domain*, SBD) del modello della HSC70 vegetale, analogamente a quello della HSC70 animale, presenta la struttura a barile β costituita da due serie di quattro foglietti β antiparalleli ripiegati l'uno sull'altro a formare la tasca di legame del peptide, chiusa da un lato da un α elica C-terminale. In questo caso è di rilevanza la conservazione nella sequenza primaria e nella distribuzione spaziale dei motivi QVFST (con

particolare riguardo al residuo V⁴³⁷) e QDLLLLDVT, dei quali è stata dimostrata l'essenzialità per l'interazione con i peptidi (Morshauser et al., 1995) (Fig. 7). E' inoltre interessante rilevare la presenza, nell'isoforma di tabacco, di aminoacidi peculiari nella tasca di legame, che comunque, come per tutte le HSP70, è ricca di residui idrofobici.

Le porzioni della proteina più esposte al solvente e quindi potenzialmente maggiormente immunogeniche, presentano un elevato grado di identità (~ 80%) ed inoltre gli aminoacidi differenti non sono in sequenza o raggruppati nella conformazione tridimensionale della proteina, ma piuttosto risultano essere distanti tra di loro (Fig. 4).

Analisi dei profili di espressione costitutiva ed indotta delle HSP70 vegetali

Analisi dei profili di espressione costitutiva ed indotta da stress abiotico delle HSP70 in piante di *N. benthamiana*

La risposta agli stress abiotici in termini di produzione di HSP70 è stata valutata su piante di *N. benthamiana*, a 40 giorni dalla germinazione, sottoposte a *shock* termico (permanenza per 4 ore in una stufa a 42°C al buio ed in presenza di acqua per evitare la disidratazione) (Hamilton and Coleman, 2001) o a danno meccanico (recisione di una foglia del fitomero superiore ai cotiledoni o di una foglia dal fitomero immediatamente sotto l'apice) (Vierling, 1991).

In entrambi i casi gruppi di 10 piante sono stati analizzati a 6 diversi intervalli di tempo (un gruppo di piante per ciascun intervallo di tempo) dall'inizio dello stress (0, 4, 8, 16 e 22 ore) dove il tempo 0 corrisponde a piante non stressate. Per ciascun intervallo temporale, le foglie degli ultimi due fitomeri di ciascuna pianta oppure, nel caso del danno meccanico mediante recisione della foglie sotto l'apice, le foglie immediatamente sotto a quella recisa, sono state prelevate, rapidamente congelate in azoto liquido e quindi conservate a -80°C. Ciascun gruppo di piante è stato campionato una sola volta, in modo che la risposta allo stress, in termini di espressione delle HSP70, non fosse la risultante della sommatoria di stress diversi (per esempio, *shock* termico sommato a danno meccanico).

I livelli di espressione delle HSP70 sono stati valutati su estratti di foglia contenenti le TSP. I campioni ottenuti sono stati analizzati sia mediante analisi Western che mediante saggio immunoenzimatico (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Analysis*, ELISA) quantitativo utilizzando in entrambe i casi per la rivelazione un anticorpo monoclonale murino in grado di riconoscere le

HSP70 di varie specie animali e vegetali. I risultati dell'analisi Western mostrano che l'induzione delle HSP70 indotta dallo *shock* termico è molto più marcata di quella indotta dal danno meccanico e segue nel tempo una distribuzione gaussiana che raggiunge il picco intorno alle 18 ore, per poi tornare gradualmente ai livelli di espressione basali (Fig. 8). Nello stress da danno meccanico, indotto mediante asportazione delle foglie del fitomero più alto, più che l'aumento dei livelli di espressione si osserva la comparsa di nuove specie proteiche con peso molecolare superiore ai 70KDa (Fig. 9). Se lo stress viene invece indotto dall'asportazione del fitomero basso si osserva una blanda induzione delle HSP70 che ricalca, nell'andamento temporale, quella indotta dallo *shock* termico (Fig. 10).

Dai saggi ELISA quantitativi si evince che l'espressione delle HSP70 indotta da *shock* termico raggiunge livelli sino a 5 volte maggiori a quelli basali a 18 ore dallo stress, ma già a 16 ore è possibile apprezzare un incremento dei livelli di espressione di circa 3 volte rispetto al controllo non stressato (Fig. 8). In particolare, il saggio ELISA indica che l'induzione massima, a 18 ore dallo stress, è di circa 2 volte rispetto al controllo.

I risultati ottenuti con le due tecniche sono comunque congruenti, e conferiscono solidità alle conclusioni raggiunte circa le cinetiche di espressione.

Analisi dei profili di espressione delle HSP70 in piante di *N. benthamiana* sottoposte a stress biotici

La risposta a stress biotici in termini di produzione di HSP70 è stata valutata su piante di *N. benthamiana* a 40 giorni dalla germinazione infettate con gli agenti patogeni più comunemente impiegati come veicolo per l'espressione transiente di proteine eterologhe in pianta (Fischer et al., 2004). In particolare, le piante sono state inoculate sulle foglie del secondo fitomero con il vettore di espressione virale pPVX201, comprendente il cDNA corrispondente al genoma completo del Virus X della Patata (*Potato Virus X*, PVX) (Baulcombe et al., 1995) (Fig. 11), oppure sono state infiltrate, sulle foglie del secondo fitomero sotto l'apice, con una sospensione di cellule di *Agrobacterium tumefaciens* (ceppo GV3101+pSOUP) trasformate con il vettore binario pGREEN106 (pGR106; PubMed accession number: AY297843) (Lu et al., 2003). Tale vettore, derivato dal vettore pGREEN per l'espressione transiente in pianta mediata da *A. tumefaciens* (Hellens et al., 2000), comprende fra le sequenze *Right* e *Left Border* la sequenza del genoma del PVX, nella quale è inserito un sito multiplo di clonaggio (Fig. 12 (A)). Questo vettore permette di massimizzare l'espressione della proteina eterologa abbinando l'efficienza di trasformazione di *A. tumefaciens* agli elevati livelli di espressione caratteristici dei sistemi virali.

Gli intervalli temporali scelti per monitorare l'avanzare dell'induzione delle HSP70 sono diversi rispetto a quelli utilizzati per analizzare gli effetti degli stress abiotici, in primo luogo perché è necessario dare all'agente patogeno il tempo di replicarsi e di infettare la pianta e poi anche per non risentire dello stress da danno meccanico prodotto dall'inoculo. Si è pertanto deciso di eseguire, dal momento dell'inoculo dell'agente patogeno, un campionamento al giorno, quindi con intervalli di tempo di 24 ore, per 9-10 giorni. Per i gruppi di piante inoculate con il vettore virale, i campionamenti a 24 e 48 ore dall'inoculo sono state condotti sulle foglie in cui è stato inoculato il vettore, mentre per i campionamenti successivi si è scelto di campionare le foglie dei fitomeri superiori rispetto a quelli inoculati, dove il virus vegetale si muove attraverso i dotti floematici (Verchot-Lubicz and Bamunusinghe, 2007). Per gli altri gruppi di piante, sono state invece sempre e solo campionate le foglie agroinfiltrate. L'analisi Western degli estratti proteici mostra che entrambi gli stress producono una marcata induzione dell'espressione delle HSP70 che segue una distribuzione gaussiana rispetto al tempo, con un picco in entrambi i casi al giorno 7 (Fig. 13 e 14). Tuttavia il profilo di espressione nei due casi risulta differente, visto che nel caso delle piante infettate con il vettore virale, l'induzione, seppure di minore intensità è più protratta nel tempo, laddove in seguito ad agroinfiltrazione il picco di induzione risulta più elevato, per poi decrescere velocemente.

Mediante l'analisi mediante saggio ELISA quantitativo degli stessi campioni, è stato possibile apprezzare che l'induzione maggiore si ottiene in seguito ad infiltrazione con *A. tumefaciens*, procedura mediante la quale i livelli di espressione delle HSP70 sono pari a circa 6 volte quelli dei controlli.

Espressione transiente in piante di *N. benthamiana* della nucleoproteina del virus A dell'influenza

Clonaggio del cDNA codificante la nucleoproteina del virus A dell'Influenza nel vettore binario pGR106

Al fine di valutare le eventuali proprietà immunogeniche di HSP70 vegetali, estratte e purificate da tessuti fogliari che esprimono una proteina di interesse vaccinale, il cDNA di 1565 paia di basi codificante la nucleoproteina (NP) del virus A dell'influenza (ceppo A/Puerto Rico/8/34/Mount

Sinai; H1N1) è stato inserito nel vettore pGR106, in corrispondenza del sito multiplo di clonaggio, per l'espressione transiente in piante di *N. benthamiana* mediata da *A. tumefaciens* (Fig. 12(A)).

A tal fine, la sequenza codificante la proteina NP, è stata prelevata dal vettore pBMSA-NP (gentilmente messo a disposizione dal *Riken Bio Resource Centre*) (Nakamura et al., 1991) (Fig. 15) mediante taglio enzimatico con l'endonucleasi di restrizione XbaI, ottenendo un frammento delle dimensioni attese. Il frammento ottenuto, purificato e quantificato, è stato inserito, mediante reazione di legazione, nel vettore intermedio pBlueScript SK+, precedentemente digerito con l'enzima di restrizione XbaI. Il prodotto della reazione di legazione è stato utilizzato per trasformare mediante elettroporazione cellule di *E. coli* elettrocompetenti. Le colonie ottenute sono state analizzate mediante reazione PCR con gli oligonucleotidi universali T3 e T7 (Tab. 4). Le colonie positive per l'inserito sono state quindi utilizzate per purificare su piccola scala e verificare per sequenza il plasmide ricombinante (pBS-NP REV)

Questo è stato quindi prodotto su larga scala e digerito con gli enzimi di restrizione ClaI e NotI in modo da ottenere il frammento comprendente la sequenza codificante per la proteina NP. Il frammento in oggetto è stato quindi purificato da gel di agarosio ed inserito, mediante reazione di legazione, nel vettore di espressione pGR106, precedentemente digerito con le endonucleasi di restrizione NotI e ClaI. Il prodotto della reazione di legazione è stato utilizzato per trasformare mediante elettroporazione cellule di *E. coli* elettrocompetenti. Le colonie ottenute sono state analizzate mediante reazione PCR con gli oligonucleotidi PVX Back e PVX New (Tab. 4) che si appaiano rispettivamente con la regione terminale della sequenza codificante la proteina P25, nel genoma del PVX, e 212 paia di basi a valle del sito di inizio della traduzione del gene per la proteina di rivestimento virale. Le colonie positive per l'inserito sono state quindi utilizzate per purificare su piccola scala e verificare per sequenza il plasmide ricombinante (pGR106-NP) (Fig. 12 (B)).

Espressione transiente della proteina NP in piante di *N. benthamiana* mediante agroinfiltrazione

Il vettore pGR106-NP è stato utilizzato per trasformare tramite elettroporazione cellule di *A. tumefaciens* elettrocompetenti del ceppo GV3101. L'avvenuta propagazione del vettore è stata verificata mediante PCR sulle colonie ottenute, utilizzando gli oligonucleotidi PVX Back e PVX New. Colture di cellule di *A. tumefaciens* trasformate, cresciute o.n., sono state quindi utilizzate per infiltrare gruppi di 5 piante di *N. benthamiana*. L'agroinfiltrazione delle cellule trasformate con il vettore pGR106-NP, è stata effettuata con o senza cellule di *A. tumefaciens* del ceppo LBA4404,

contenti un vettore per l'espressione della proteina P19 del Virus dell'Arricciamento Maculato del Carciofo (*Artichoke Mottled Crinkle Virus*, AMCV), coinvolta nella soppressione del silenziamento genico e gentilmente messo a disposizione dalla Dott.ssa Carla Marusic (Lindbo, 2007).

I tessuti vegetali dei gruppi di piante agroinfiltrati sono stati campionati a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, e 10 giorni dall'infiltrazione, al fine di valutare in quali condizioni (con o senza co-agroinfiltrazione con le cellule che veicolano la proteina P19) e a quale intervallo di tempo si otteneva l'espressione massima delle proteine NP e HSP70. Le proteine solubili totali sono state estratte dai tessuti campionati e analizzate mediante saggio ELISA quantitativo. I risultati di queste analisi indicano che la proteina NP raggiunge il picco di espressione al giorno 7 (Fig. 16) e che la co-agroinfiltrazione con il ceppo di *A. tumefaciens* che veicola il vettore per l'espressione della P19, non modifica l'andamento nel tempo ma induce un significativo aumento quantitativo della proteina espressa. In particolare, i livelli di espressione in presenza di P19 aumentano in maniera particolarmente marcata soprattutto nell'intervallo di tempo in cui l'espressione è maggiore (tra il giorno 5 e il giorno 7). Al giorno 7, se in assenza di P19 l'espressione di NP è pari allo 0.8% delle TSP, in presenza di P19 la proteina raggiunge l'1.5%.

I risultati del saggio ELISA, finalizzato a quantificare negli stessi campioni le HSP70, mostra che l'espressione di queste proteine ha un andamento parallelo a quello descritto per la proteina NP, con un picco a 7 giorni dall'agroinfiltrazione ed un marcato aumento in caso di presenza di P19 (Fig. 17). Infatti, in assenza di P19, le HSP70 vengono indotte di circa 4 volte rispetto al controllo, raggiungendo il 2.7% delle TSP, in presenza di P19 le HSP70 sono espresse circa 6 volte più che nel controllo, e rappresentano il 5% delle TSP.

In conclusione, la presenza di P19 determina quindi un aumento del 100% dell'espressione di NP ed un aumento del 50% dell'induzione di HSP70.

Estrazione e purificazione di complessi HSP70-peptide dai tessuti vegetali e loro caratterizzazione mediante spettrometria di massa

Ottimizzazione del protocollo di estrazione e purificazione di complessi HSP70-peptide dai tessuti vegetali

Sulla base dei protocolli di purificazione delle HSP animali e vegetali descritti in letteratura (Menoret et al., 2004; Anderson et al., 1994), varie condizioni di estrazione e purificazione sono

stati saggiati con lo scopo di mettere a punto un protocollo ottimizzato per l'ottenimento di complessi HSP70-peptidi.

Per quanto riguarda la fase di estrazione delle TSP dai tessuti fogliari di *N. bethamiana* congelati, due differenti tamponi sono stati inizialmente utilizzati in parallelo: il tampone 1 (T1), più semplice perché costituito tampone fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS (pH7.2)) addizionato allo 0.5 mM con l'inibitore delle proteasi fluoruro di fenilmetansulfonile (*PhenylMethaneSulphonylFluoride*, PMSF), ed il tampone 2 (T2) più complesso (50 mM PIPES (pH6.8), 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.3% Triton-X100, 1% (w/v) PVP40, 1% PVP insolubile, 0.5mM PMSF). I due estratti sono stati preparati aggiungendo il tampone freddo al tessuto fogliare congelato e polverizzato, e quindi omogeneizzando la sospensione con un omogeneizzatore automatico.

Per entrambe le preparazioni è stata sperimentalmente determinata la quantità di ammonio solfato necessaria per ottenere l'arricchimento delle HSP70 mediante precipitazione frazionata, al fine di massimizzare il recupero delle HSP limitando il più possibile la presenza di proteine contaminanti (*salting-in* e *salting-out*). Per il tampone T1 sono state identificate le seguenti condizioni (Fig. 18) :

- Soluzione portata al 10% di ammonio solfato, centrifugata e recuperato il supernatante.
- Supernatante portato al 40% di saturazione di ammonio solfato, centrifugato e recuperato il pellet.

Mentre per il tampone T2:

- Soluzione portata al 40% di saturazione con ammonio solfato, centrifugato e recuperato il supernatante.
- Supernatante portato a 80% di ammonio solfato, centrifugato, recuperato il pellet e risospeso nel tampone T2

- Soluzione portata a 0.9 M ammonio solfato, centrifugata e recuperato il supernatante.
- Supernatante portato a 3.0 M ammonio solfato, centrifugato e recuperato il pellet.

I campioni di tessuto estratti in tampone T1 o in tampone T2 e sottoposti alla precipitazione differenziale, più un campione di tessuto estratto in tampone T1 ma non sottoposto alla precipitazione con ammonio solfato, sono stati trasferiti nel tampone per la purificazione cromatografica per affinità su resina di ADP-agarosio (Tampone B; 20 mM Tris-acetato, 20 mM NaCl, 15 mM β -mercaptoetanololo, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM PMSF, pH7.5). I complessi HSP-peptide presentano infatti una forte affinità sia per il nucleotide adenosindifosfato (*AdenodinDiPhosphate*,

ADP) che per il nucleotide adenosintrifosfato (Adenodintrifosfato, ATP), ma mentre il legame con l'ADP mantiene integro il complesso quello con l'ATP determina un cambiamento conformazionale delle HSP che provoca il rilascio del peptide.

Tutte e tre le preparazioni sono state quindi purificate mediante cromatografia per affinità su resina di ADP-agarosio in cui il distacco dei complessi HSP-peptide dalla resina è stato ottenuto mediante lavaggio con tampone B addizionato con 3 mM ADP.

Aliquote delle frazioni ottenute sono state analizzate su gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE) ed i gel sono stati quindi colorati con Nitrato d'Argento, per definire il grado di purezza ottenuto, o sottoposti ad analisi Western, per verificare l'identità delle proteine estratte mediante l'impiego di un anticorpo monoclonale murino specifico per HSP70 di origine sia animale che vegetale.

I risultati ottenuti dimostrano che la purificazione su colonna è determinante per ottenere la rimozione dal campione delle proteine contaminanti e consente di ottenere preparazioni di HSP70 particolarmente pure senza significative perdite di materiale (Fig. 19). E' inoltre evidente che il grado di purezza è indipendente dal tipo di tampone utilizzato per l'estrazione. Questo è vero anche qualora non venga effettuata la precipitazione differenziale con ammonio solfato.

Successivi esperimenti volti a migliorare il grado di purezza mediante gel filtrazione (AKTA[®], GE Healthcare) hanno dimostrato che sebbene questo grado venga raggiunto (Fig. 20 e 21) questo ulteriore passaggio comporta una drastica riduzione di circa il 40% delle rese.

In base ai risultati ottenuti, si è pertanto stabilito per i successivi esperimenti di immunizzazione, di estrarre il tessuto fogliare in tampone T1 e, senza *salting-in* e *salting-out*, di procedere direttamente con la purificazione mediante cromatografia di affinità.

Caratterizzazione dei complessi HSP70-peptidi di origine vegetale mediante spettrometria di massa

Le frazioni cromatografiche sono state riunite, concentrate e trasferite dal tampone B a PBS 1X. La determinazione della concentrazione delle HSP70 nel campione ottenuto mediante saggio Bradford e confronto con diverse concentrazioni di una proteina nota (Siero Albumina bovina BSA) (Fig. 22) ha indicato che utilizzando il protocollo di purificazione messo a punto è possibile recuperare 15 µg di HSP70 per grammo di foglie prelevate da piante non trasformate/stressate e 22µg di HSP70 per grammo di foglie prelevate da piante trasformate mediante agroinfiltrazione.

L'analisi mediante spettrometria di massa della banda del peso molecolare atteso che è stata evidenziata mediante colorazione con Blu di Coomassie di un SDS-PAGE su cui era stata corsa una

aliquota del campione concentrato, ha confermato che questa conteneva la HSP70 citosolica. L'analisi mediante spettrometria di massa ha altresì confermato che una seconda banda di peso molecolare molecolare, presente sul gel e riconosciuta nell'analisi Western dall'anticorpo monoclonale, conteneva anch'essa la HSP70 (Fig. 22).

Esperimenti immunologici volti a definire le proprietà immunogeniche di complessi HSP70-peptidi estratti da tessuti vegetali che esprimono antigeni di interesse vaccinale

Immunizzazione dei topi con i complessi HSP70-peptidi estratti da tessuti fogliari in cui era espressa la proteina NP del virus A dell'influenza

Per valutare se le HSP70 estratte e purificate da piante di *N. benthamiana* che esprimono la proteina NP del virus A dell'influenza siano in grado di veicolare peptidi derivanti dal catabolismo della proteina e di indurre nei topi l'attivazione di cellule T CD8+ specifiche per NP, topi femmine del ceppo C57BL/6 di 6 settimane, sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali (1 topo/gruppo) ed immunizzati sottocute alla base della coda per due volte a distanza di 7 giorni con:

- Gruppo 1 (controllo negativo): 50µl di una emulsione acqua in olio ottenuta miscelando 25µl di PBS 1X con 25µl di adiuvante incompleto di Freund (*Incomplete Freund's Adjuvant*, IFA, Sigma); questo tipo di trattamento non dovrebbe indurre l'attivazione di cellule T.
- Gruppo 2 (controllo positivo): 50µl di una emulsione acqua in olio ottenuta miscelando 25µl di PBS 1X contenenti 40µg del peptide della proteina NP del virus dell'influenza ASNENMETM (epitopo immunodominante nel ceppo di topi utilizzato) con 25µl di IFA; questo tipo di trattamento dovrebbe indurre l'attivazione di cellule T CD8+ poiché la sequenza del peptide corrisponde a quella dell'epitopo immunodominante della proteina NP nei topi C57Bl/6.
- Gruppo 3 (controllo negativo): 50µl di PBS 1X contenenti 40µg di HSP70 complessate a peptidi, estratte e purificate da piante di *N. benthamiana* di tipo selvatico; questo tipo di trattamento non dovrebbe indurre l'attivazione di cellule T CD8+ specifiche per l'antigene NP poiché le HSP70 provengono da tessuti vegetali che non esprimono la proteina.

- Gruppo 4: 50µl di PBS 1X contenenti 40µg di HSP70 complessate a peptidi, estratte e purificate da piante di *N. benthamiana* che esprimevano in maniera transiente la proteina NP del virus A dell'influenza; questo tipo di trattamento dovrebbe indurre l'attivazione di cellule T CD8+ specifiche per l'antigene NP poiché le HSP70 provengono da tessuti vegetali che esprimono la proteina..

Allestimento del saggio ELISPOT per la determinazione del numero di cellule T CD8+ NP-specifiche attivato dalle immunizzazioni

Una settimana dopo la seconda immunizzazione i topi sono stati sacrificati e le milze prelevate in condizioni di sterilità per preparare sospensioni di cellule mononucleate a diverse concentrazioni. Cento µl di ciascuna sospensione sono stati distribuiti in 3 (sospensioni contenenti 5×10^6 , 2.5×10^6 , 1.25×10^6 cellule/ml di terreno di coltura completo) o 2 (sospensioni contenenti 2×10^5 , 1.0×10^5 e 0.5×10^5 cellule/ml di terreno di coltura completo) triplicati nei pozzetti di piastre da 96 con fondo di membrana PVDF (previamente rivestita con l'anticorpo di cattura specifico per l'interferone- γ (IFN- γ) murino). Ai pozzetti contenenti 5×10^5 , 2.5×10^5 , 1.25×10^5 sono stati quindi aggiunti 100 µl di: peptide ASNENMETM diluito in terreno di coltura completo (4 e 0.4 µg/pozzetto); proteina NP diluita in terreno di coltura completo (2 e 1 µg/ pozzetto); terreno di coltura completo da solo (risposta di fondo delle cellule in coltura). Ai pozzetti contenenti invece 2×10^4 , 1.0×10^4 e 0.5×10^4 cellule sono stati aggiunti 100 µl di: terreno di coltura completo da solo (risposta di fondo) o contenente gli stimoli mitogenici PMA/Ionomicina (Tab. 5). Questo tipo di stimolazione, inducendo la produzione dell'IFN- γ da parte di tutte le cellule T presenti nei pozzetti, indipendentemente dalla loro specificità antigenica e dal loro fenotipo (CD4 o CD8), rappresenta un controllo interno della coltura e da indicazioni circa la vitalità delle cellule distribuite nei pozzetti. Dopo 20 ore di incubazione a 37°C in presenza di 0.5%CO₂, la presenza e l'enumerazione delle cellule, derivanti dai vari gruppi sperimentali, che avevano secreto IFN- γ in risposta ai differenti stimoli è stata rivelata distribuendo nei pozzetti un anticorpo specifico per la citochina biotinilato e rivelandone il legame mediante l'impiego di avidina coniugata ad HRP e del substrato di reazione AEC.

Dopo la lettura delle piastre con un lettore ELISPOT, al numero di *spot* presenti sulle membrane nei pozzetti stimolati con gli antigeni o con i mitogeni è stato sottratto il numero di *spot* che si ottiene nei rispettivi controlli stimolati con terreno completo da solo. Questo tipo di analisi ha messo in evidenza (Fig. 23) che l'immunizzazione con il PBS 1X in adiuvante, così come l'immunizzazione con i complessi HSP70-peptidi estratti e purificati dai tessuti di piante di *N. benthamiana* che non

esprimono la proteina NP del virus dell'influenza A, non sono in grado di indurre l'espansione di linfociti in grado di secernere IFN- γ in risposta al peptide ASNENMETM o alla proteina NP completa,

Viceversa, l'immunizzazione con il peptide in adiuvante o con i complessi HSP70-peptidi estratti e purificati dai tessuti di piante di *N. benthamiana* che esprimono la proteina NP del virus dell'influenza A induce un significativo aumento della frequenza delle cellule peptide-specifiche. E' degno di nota sottolineare che mentre la risposta ai complessi HSP70-peptidi si ottiene senza adiuvante, quella al semplice peptide ne richiede la co-somministrazione.

DISCUSSIONE

Le HSP sono proteine ubiquitarie presenti nelle cellule di tutti gli organismi viventi e sono tra le proteine maggiormente conservate in natura dal punto di vista filogenetico (Lindquist and Craig 1988). Il loro ruolo fisiologico è quello di associarsi alle proteine di neosintesi o a proteine non correttamente ripiegate, e questo mediante il riconoscimento di regioni idrofobiche normalmente non esposte, formando complessi HSP-proteina. Per questo motivo sono altamente espresse in condizioni di stress.

Intorno alla seconda metà degli anni '80 è stato osservato che le HSP isolate dai tessuti tumorali di un individuo sono in grado di stimolare nello stesso individuo una risposta immunitaria specifica contro la neoplasia a differenza di corrispondenti preparazioni ottenute da tessuti sani (Srivastava et al., 1986). Ulteriori approfondimenti hanno dimostrato che queste proprietà immunostimolatorie delle HSP sono dovute alla loro capacità di associarsi genericamente in maniera non-covalente con peptidi che derivano dalle proteine espresse da una cellula, sia essa sana, tumorale o infetta da un agente patogeno (Ishii et al., 1999). Se somministrati ad APC professioniste, come le cellule dendritiche, questi complessi vengono internalizzati per endocitosi mediante l'interazione con recettori specifici, inducendo la maturazione delle APC e portando all'attivazione sia di risposte immuni innate che antigene-specifiche. I complessi HSP-peptide sono in grado in questo modo di evocare sia risposte anticorpali, che di tipo cellulo-mediate (Basu and Matsutake, 2004; Suto and Srivastava, 1995; Arnold et al., 1995). Questi risultati sono stati ottenuti anche utilizzando HSP di organismi distanti filogeneticamente, come i batteri. Queste conoscenze hanno aperto interessanti prospettive in campo vaccino logico, anche perché le proprietà immunostimolatorie delle HSP sono intrinseche e non richiedono la co-somministrazione di sostanze adiuvanti.

Su questa base si è pensato di valutare la possibilità di utilizzare le HSP vegetali, estratte da piante che esprimono in maniera stabile o transiente proteine eterologhe di interesse vaccinale a livelli elevati, come veicolo di peptidi di interesse vaccinologico derivanti dal catabolismo di tali proteine. In particolare, ci si è concentrati sull' isoforma citosolica costitutivamente espressa della famiglia delle HSP70 (HSC70), non solo perché è quella meglio caratterizzata dal punto di vista strutturale e maggiormente studiata per le applicazioni in campo immunologico, ma anche perché è quella maggiormente presa in considerazione negli studi sulla risposta agli stress nelle piante.

Per quanto riguarda l'antigene da esprimere è stata scelta la proteina NP del virus A dell'influenza, perché la risposta immunitaria mediata da linfociti T citotossici che induce in modelli murini, è stata caratterizzata nel dettaglio mediante l'identificazione dell'epitopo immunodominante in ciascuno aplotipo. Si tratta pertanto di un ottimo candidato da esprimere in pianta per valutare l'eventuale

capacità di complessi vegetali HSP70-peptide di attivare risposte specifiche di tipo cellulo-mediato nel topo.

Nella fase preliminare del lavoro, una serie di strumenti bioinformatici sono stati utilizzati con l'intento di mettere a punto il modello strutturale *in silico* di una HSC70 vegetale per valutare quali e quante sono le differenze strutturali tra HSC70 animali e vegetali. Infatti l'approccio più comune e più facilmente accessibile per predire la funzione di una proteina si basa sull'osservazione che spesso proteine simili nella loro sequenza svolgono funzioni simili (Lee et al. 2007). Il primo passo è stato quello di definire, utilizzando il programma *on-line* BLASTP, quale fosse la HSC70 vegetale con identità più alta rispetto a quella umana e a quale specie questa appartenesse. Questo tipo di analisi ha generato un risultato rilevante ai fini del presente studio poiché ha identificato come maggiormente omologa alla HSC70 umana quella della specie vegetale *Nicotiana tabacum* (79% di identità e 88% di positività). Il dato è importante in quanto nelle successive prove di modellamento ha consentito di utilizzare la proteina appartenente ad una specie filogeneticamente molto vicina a quella utilizzata in questo studio (*N. benthamiana*) il cui genoma non è stato ancora completamente sequenziato e le cui EST codificanti le HSP70, seppur identificate, non sono ancora state annotate completamente in banca dati.

Avendo verificato l'elevata identità della HSC70 di tabacco con quella umana è stato possibile, applicando il metodo di modellamento per omologia (*homology modelling*), procedere con la costruzione del suo modello *in silico*. Le strutture sperimentalmente definite utilizzate come riferimento (*templates*) sono state quella della HSC70 bovina, unica HSP di mammifero completa ad oggi descritta a livello strutturale, (Jiang et al., 2005a), quella della DnaK di *E.coli* (Cho et al., 2003) e quelle dei domini N- e C-terminale cristallizzati separatamente (Flaherty et al. 1990; Jang et al., 2005b). Quattro modelli sono stati ottenuti utilizzando i quattro servizi *on-line* ad oggi considerati più affidabili sulla base dell'elevato punteggio ottenuto nei recenti esperimenti di valutazione critica delle tecniche di predizione della struttura delle proteine (*Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction*, CASP; <http://predictioncenter.org/casp7/>). Di questi modelli, in seguito alla valutazione con strumenti *ad-hoc* (TM-score e TM-align), il migliore è risultato essere quello prodotto dal servizio *on-line* Swiss Model che ha ottenuto un Tm-score di 0.82 (un valore molto elevato se si considera che valori di TM-score superiori a 0.5 sono già indice del fatto che due strutture hanno la stessa conformazione).

Procedendo con il confronto tra il modello della HSC70 vegetale e la struttura della HSC70 bovina, è risultata subito evidente la quasi completa identità tra i due. In particolare, sono risultate assolutamente sovrapponibili la topologia dei domini N-terminale (coinvolto nell'interazione con i

nucleotidi ATP ed ADP; NBD) e C-terminale (coinvolto nell'interazione con i peptidi; SBD) sia in termini di orientamento delle strutture secondarie (foglietti β ed β -eliche) che di posizionamento, in struttura primaria e terziaria, dei residui aminoacidici direttamente coinvolti nel legame con i rispettivi substrati. La messa a punto del modello ha consentito altresì di verificare che i residui aminoacidici che distinguono l'isoforma vegetale da quella animale, non si trovano strettamente associati fra loro ma piuttosto distribuiti nella proteina ripiegata così come nella sua sequenza primaria. Questo permette di supporre che l'impiego della proteina vegetale come veicolo di peptidi di interesse vaccinale, non sia in grado di evocare risposte anticorpali e di indurre la rapida *clearance*.

L'elevata identità strutturale consente di concludere non solo che le HSC70 vegetali abbiano come quelle animali attività ATPasica, ma anche e soprattutto che siano in grado di associarsi a peptidi. Andando ad analizzare più nel dettaglio il dominio SBD ed in particolare l'allineamento delle sequenze aminoacidiche, si nota tuttavia che, oltre alla conservazione dei residui/gruppi aminoacidici di cui sopra, ci sono residui presenti solo nell'isoforma vegetale. Questi residui potrebbero essere responsabili di una eventuale differenza nel tipo di peptidi che vengono legati dalle HSC70 vegetali. È noto che le HSP70 si associano a peptidi di lunghezza compresa tra i 7 e i 25 aminoacidi (Morshauer et al., 2005) e che tali peptidi sono in genere caratterizzati da un *core* idrofobico fiancheggiato da residui aminoacidici carichi, in prevalenza positivamente. E' altresì noto però che le diverse isoforme si associano a classi o sottoclassi di peptidi con proprietà chimiche differenti ed è quindi ragionevole pensare che una stessa isoforma possa in specie diverse associarsi a classi di peptidi differenti. Lo studio del modello strutturale in combinazione con la sequenza di peptidi eluiti dalle HSP70 potrebbe contribuire a chiarire questo aspetto. Questo tipo di approccio potrebbe infatti permettere di comprendere le basi strutturali dell'interazione peptide-HSP70 e di definire con maggiore accuratezza le caratteristiche fisico-chimiche che un peptide deve possedere per potersi associare efficacemente al dominio SBD. Un approccio analogo potrebbe altresì chiarire se le HSP vegetali abbiano la capacità di interagire con i recettori cui si associano sulle APC le HSP animali.

Nell'ottica di dover purificare dai tessuti vegetali le HSC/HSP70 per effettuare i saggi immunologici, dopo la fase di *modeling* sono stati condotti esperimenti di fisiologia vegetale con lo scopo di identificare le condizioni in cui sono massimi i livelli di espressione di tali proteine. A tal fine, gruppi di piante di *N. benthamiana* sono stati sottoposti a stress abiotico (*shock* termico e da danno meccanico) o biotico (infezione virale e/o batterica) e i loro tessuti fogliari prelevati a tempi successivi dall'inizio dello stress per estrarre le proteine e valutare come varia il profilo di

espressione. I risultati ottenuti hanno mostrato innanzitutto che mentre nel caso degli stress abiotici l'induzione è di breve entità e si esaurisce nel giro di poche ore (22 ore), nel caso degli stress biotici l'induzione è più marcata e si protrae nel tempo per alcuni giorni. E' evidente che questa discrepanza sia dovuta in primo luogo alla differente durata dello stress cui la pianta è sottoposta. Breve e finita nel tempo nel caso degli stress abiotici, prolungata nel caso degli stress biotici. Si può ipotizzare che nel primo caso, il trattamento non abbia durata e intensità tali da riuscire ad alterare la vitalità delle cellule vegetali e che, una volta riportata la pianta alle condizioni fisiologiche normali, l'induzione delle HSP70 cessi perché non più necessaria.

Differenze sono state evidenziate nell'ambito di ciascun tipo di stress anche nell'entità dell'induzione. Per quanto riguarda gli stress abiotici, la produzione di HSP70 significativamente più bassa che si osserva in risposta al danno meccanico, è probabilmente dovuta a due fattori. Da una parte il fatto che l'induzione non è generata da uno stress che colpisce l'intera pianta e dall'altra che il tessuto preso in esame non è quello direttamente interessato dal trattamento, ma un tessuto distale cui il segnale di stress giunge mediato da molecole, come l'acido jasmonico, rilasciate dalle cellule vicine a quelle colpite (Vierling, 1991). In questo caso perciò l'induzione di HSP70, o di sue forme aggregate, seppur degna di nota è blanda poiché non deriva dalla necessità di far fronte ad una reale situazione di emergenza, ma è piuttosto una sorta di preparazione della pianta ad un potenziale pericolo.

Nell'ambito degli stress biotici, la maggiore induzione che si registra in risposta all'agroinfiltrazione rispetto all'infezione virale, può essere spiegata dal fatto che il vettore binario pGR106 utilizzato contiene un intero genoma virale, e che lo stress è duplice. Esperimenti sono in corso per stabilire quale sia il contributo relativo della componente batterica rispetto a quella virale.

Poiché le HSC/HSP70 sono coinvolte nel catabolismo delle proteine esistenti, ma anche nel ripiegamento di quelle neosintetizzate, l'induzione più marcata della loro espressione che si osserva in seguito a stress biotico può essere ricondotta al sovraccarico metabolico cui la cellula è sottoposta a causa della iperproduzione di proteine dell'agente patogeno. Questo spiega anche l'andamento di tipo gaussiano dell'espressione. Infatti, con l'avanzare dell'infezione, le vie biosintetiche della cellula ospite vengono utilizzate in modo sempre maggiore, e la quantità di *chaperones* necessari aumenta, fino a che l'infezione non induce gradualmente la morte delle cellule ospiti.

Sulla base degli studi di fisiologia e dell'analisi quantitativa che hanno messo in evidenza come la condizione che determina la massima induzione delle HSC/HSP70, sia l'agroinfiltrazione che

permette di ottenere un incremento dell'espressione di circa 6 volte rispetto alle condizioni basali, è stato deciso di utilizzare questo metodo anche per ottenere l'espressione transiente in pianta dell'antigene NP. Infatti, questa metodologia è una delle più rapide ed efficienti per esprimere proteine eterologhe nei tessuti vegetali.

Il cDNA codificante NP è stato clonato nel vettore binario pGR106, e cellule di *A. tumefaciens* trasformate sono state utilizzate da sole o insieme a cellule di *A. tumefaciens* trasformate con un vettore binario codificante la proteina P19 dell'AMCV, per infiltrare piante di *N. benthamiana*. Gli estratti proteici dei tessuti agroinfiltrati sono stati analizzati a tempi diversi per valutare non solo l'andamento dell'espressione della proteina NP ma anche quello dell'induzione di HSC/HSP70. Questo con lo scopo di identificare il momento migliore per campionare il tessuto agroinfiltrato ed aumentare la probabilità di estrarne HSP70 associate a peptidi derivanti dal catabolismo di NP e quindi efficaci nell'indurre risposte immuni specifiche contro questo antigene.

L'analisi dei profili di espressione ha messo in evidenza l'efficienza della P19 nell'aumentare la produzione di NP e l'induzione di HSP70, rispettivamente del 100% e del 50%. L'azione della P19 sull'induzione di HSP70 non dovrebbe essere diretta, ma un riflesso dell'aumento della sintesi della proteina NP. Infatti, l'andamento collima con la sua funzione di *chaperon* molecolare essendo maggiore quando la sintesi proteica raggiunge i livelli più alti.

Un'altra fase del lavoro, essenziale per poter effettuare gli esperimenti di immunologia, è stata quella di messa a punto di un protocollo di estrazione dei complessi HSP70-peptide che lasciasse inalterato il complesso consentendo di ottenere preparazioni altamente pure. Sono stati valutati a tale scopo diversi tamponi di estrazione e diverse tecnologie di purificazione. In definitiva, il protocollo più efficace è risultato essere quello in cui le proteine solubili vengono estratte dal tessuto fogliare utilizzando tampone fosfato. Infatti, a parità di grado di purificazione finale, tale tampone essendo quello chimicamente più semplice perché privo di detergenti, di agenti precipitanti o di agenti riducenti, dà garanzie maggiori circa il mantenimento dell'integrità dei complessi HSP70-peptide. Per gli stessi motivi (sostanziale equivalenza del grado di purificazione) nel protocollo si è deciso di eliminare la fase di precipitazione frazionata con ammonio solfato, caricando direttamente l'estratto proteico su colonna cromatografica di ADP-agarosio. E' infatti noto che le HSP70 complessate con i peptidi hanno elevata affinità sia per l'ADP che per l'ATP, ma che solo l'interazione con ADP non interferisce nel legame con il peptide. I campioni ottenuti hanno un grado di purezza estremamente elevato e, come rivelato dall'analisi SDS-PAGE e di spettrometria di massa, comprendono oltre alle HSP70 nella loro forma monometriche, una forma aggregata di più alto peso molecolare. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che in situazioni in cui

è elevata la quantità di *chaperones* presenti questi formano aggregati con membri della stessa famiglia o di famiglie diverse mediante dominio C-terminale (Vierling, 1991).

Ulteriori tentativi di migliorare il livello di purificazione, applicando le frazioni eluite dalla colonna di ADP-agarosio ad una colonna di Gel Filtrazione, sebbene abbiano effettivamente portato ad un grado di purezza maggiore, hanno determinato una diminuzione sostanziale della resa. È stato pertanto deciso di accettare come livello di purificazione quello ottenuto con la cromatografia per affinità che ha permesso di ottenere una resa di 15 µg di HSP70 per grammo di foglie prelevate da piante non trasformate/stressate e 22µg di HSP70 per grammo di foglie prelevate da piante sottoposte ad agroinfiltrazione.

Al fine di valutare se i complessi HSP70-peptide così ottenuti e purificati fossero in grado di determinare una risposta immunitaria specifica contro la proteina NP, espressa in maniera transiente nelle foglie da cui sono stati purificati i complessi stessi, è stato effettuato un esperimento preliminare *in vivo* su modelli murini. I topi sono stati immunizzati con i complessi HSP70-peptidi derivanti da piante agroinfiltrate che esprimevano la proteina NP. Il numero di linfociti T CD8+ presenti nelle milze di questi topi è stato quindi determinato mediante saggio ELISPOT per l'IFN- γ murino stimolando le cellule *in vitro* con la proteina NP o con il suo peptide ASNENMETM, noto per essere l'epitopo immunodominante nel ceppo di topi utilizzati. I risultati di questo esperimento preliminare hanno indicato che l'immunizzazione è stata efficace nell'indurre l'attivazione di una risposta immune NP-specifica, cosa che non accade qualora i topi vengano immunizzati con complessi HSP70-peptidi derivanti da piante che non esprimono l'antigene. Degno di nota il fatto che la risposta, seppur inferiore a quella indotta dall'immunizzazione dei topi con il peptide sintetico ASNENMETM, si ottiene senza l'impiego di alcun adiuvante. Nonostante i risultati siano incoraggianti anche perché sembrano confermare l'avvenuta associazione di peptidi derivanti dalla proteina NP alle HSP70 vegetali, ulteriori esperimenti saranno necessari per rendere il dato statisticamente valido. In futuro saranno necessari ulteriori esperimenti di immunologia con un numero maggiore di topi per validare a livello statistico il risultato ottenuto e determinarne la ripetitività. Inoltre, esperimenti con topi di aplotipo diverso, immunizzati con i medesimi complessi HSP70-peptide, permetterebbero di verificare se il *pool* di peptidi veicolati sia in grado di attivare i linfociti T di individui geneticamente diversi. Se questa ipotesi venisse confermata questo vorrebbe dire che i complessi HSP70-peptidi preparati nelle condizioni sin qui descritte possono essere considerati una preparazione vaccinale multiepitopica. Questa peculiarità, insieme al fatto che l'utilizzo di tali complessi non richiede l'uso di sostanze adiuvanti, aprirebbe prospettive nuove e di

grande rilievo nel campo della ricerca vaccinologica, gettando nuova luce sul ruolo delle piante biofabbrica nell'ambito della ricerca biofarmaceutica.

Tabelle e Figure

Famiglia HSP	Membri	Localizzazione intracellulare
Ubiquitina	Ubiquitina	C
LMW HSP	HSP10, GroES, HSP16, α -cristallino HSP20, HSP25, HSP26, HSP27	C
HSP40	HSP40, DnaJ*, SS1	C
HSP47	HSP47	RE
Calreticulina	Calreticulina, Calnexina	RE
HSP60	HSP60, HSP65, GroEL*	C ed M
HSP70	HSP72, HSC70, HSP110, DnaK*	C
	SSC1, SSQ1, EMC10	M
	BiP (Grp78), Grp170	RE
HSP90	HSC84, HSP86, HPTG	C
	Gp96 (Grp94, HSP108, Endoplasmina)	RE
HSP100	HSP104, HSP110	C
	Proteine CLP	RE
	HSP78	M

Tabella 1. Classificazione delle HSP in famiglie. *: isoforme batteriche; (): denominazioni alternative della medesima proteina. C: Citoplasma; RE: Reticolo Endoplasmatico; M: Mitocondrio.

Organismo	Proteina	Gene ID	Protein ID	% di identità con isoforma umana	% di positività con isoforma umana
<i>H. sapiens</i>	HSC70	3312	P11142	100%	100%
	HSP70	3303	Q5JQI4	100%	100%
	BiP	1143492	CAA61201	100%	100%
<i>B. taurus</i>	HSC70	281831	P19120	98%	100%
	HSP70	40254806	NP_776975	97%	99%
	BiP	115495027	NP_001068616	99%	100%
<i>N. tabacum</i>	HSC70	38325815	AAR17080.1	79%	88%
	HSP70	30025966	AAP04522.1	78%	82%
	BiP	19811	CAA42659	79%	84%
<i>E. coli</i>	DnaK	ABI99505	YP_851220	50%	68%

Tabella 2. Omologia fra le isoforme delle HSP70 umane e quelle di *Bos taurus* (unica HSP70 di mammifero la cui struttura sia stata sperimentalmente risolta mediante cristallografia a raggi X), *N. tabacum* ed *E. coli*. Di ogni isoforma sono indicati i codici identificativi della banca dati GeneBank (Gene ID, Protein ID).

Servizio <i>on-line</i> utilizzato	TM-score	TM-align
Swiss Model	0.82	0.99
I-Taaser	0.81	0.89
ModWeb	0.84	0.92
Pcons	0.40	0.67

Tabella 3. Valutazione in termini di *TM-score* e *TM-align* dei modelli ottenuti tramite i servizi *on-line* indicati nella prima colonna. In rosso è evidenziato il servizio che ha generato il modello con il punteggio complessivo più alto.

OLIGONUCLEOTIDE	SEQUENZA
T3	5' AATTAACCCTCACTAAAGGGA 3'
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
PVX Back	5' CTG GGG AAT CAA TCA CAG TGT TG 3'
PVX New	5' CAG TCT AGC TCT GCT GAT GCC GTT 3'

Tabella 4. Oligonucleotidi utilizzati per le reazioni di PCR e di sequenza.

	5X10 ⁵ cellule/pozzetto	2.5X10 ⁵ cellule/pozzetto	1.25X10 ⁵ cellule/pozzetto	2x10 ⁴ cellule/pozzetto	1.0x10 ⁴ cellule/pozzetto	0.5x10 ⁴ cellule/pozzetto
Peptide ASNENMETM 4µg	X	X	X			
Peptide ASNENMETM 0.4µg	X	X	X			
NP 2µg	X	X	X			
NP 1µg	X	X	X			
Mezzo di coltura completo	X	X	X	X	X	X
C+ (PMA/Ionicina)				X	X	X

Tabella 5. Schema del saggio ELISPOT allestito con gli splenociti. prelevati dai topi immunizzati

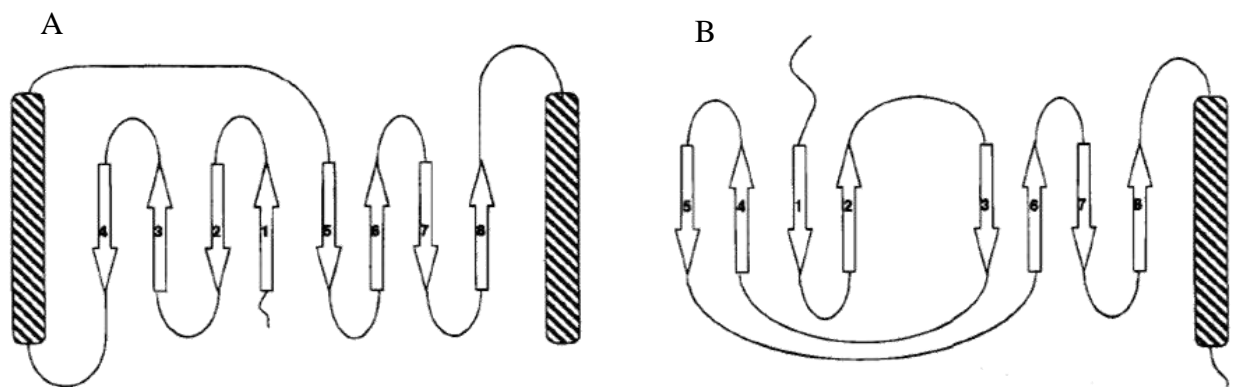


Figura 1. Topologia della tasca di legame per l'antigene della molecola MHC di classe I (A) e del dominio SBD delle HSP70 (B). I foglietti β sono rappresentati da dalle frecce dove la punta della freccia rappresenta l'estremità C-terminale del foglietto, mentre la base della freccia rappresenta l'N-terminale. Le α -eliche sono rappresentate come rettangoli. La numerazione dei foglietti β è quella determinata da studi strutturali di diffrazione a raggi X di cristalli delle due proteine (Morshauser et al., 1995).

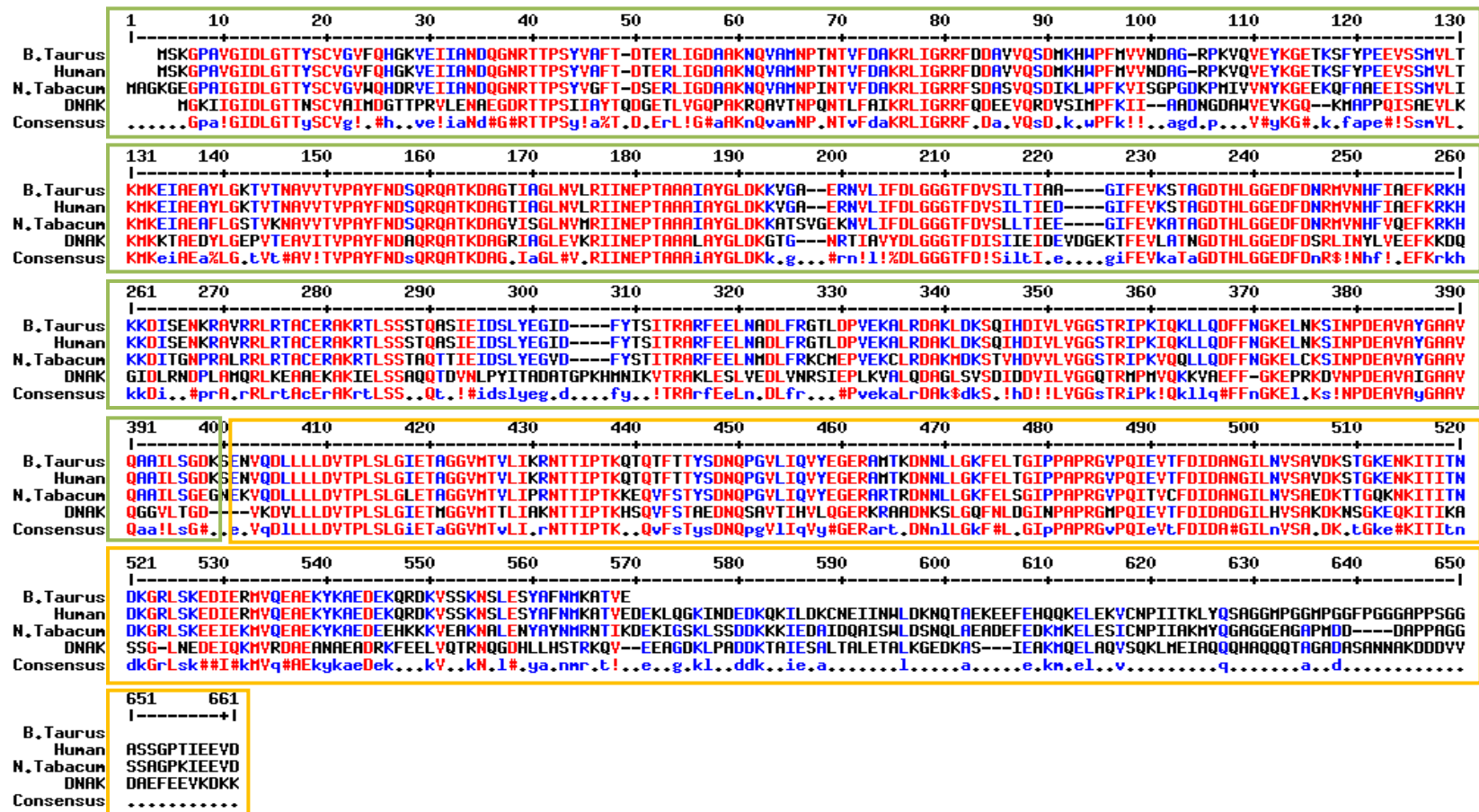


Figura 3. Allineamento della sequenza primaria (aminoacidica) delle HSP70 isoforma citosolica costitutiva di *Bos taurus*, umana, di *N. tabacum* e di *E. coli* (DnaK). La sequenza di *B. taurus* manca del C-Terminale, poiché è stata allineata la sequenza della proteina cristallizzata, mancante del C-terminale, ed usata come template per gli esperimenti di *homology modelling*. In rosso gli aminoacidi identici. In nero quelli diversi e in blu quelli condivisi non da tutte le sequenze. Il riquadro verde indica la sequenza del dominio NBD. Il riquadro arancione indica la sequenza del dominio SBD.

Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value
gb AAR17080.1 	heat shock protein 70-3 [Nicotiana tabacum]		1037	0.0
gb AAB97316.1 	cytosolic heat shock 70 protein; HSC70-3 [Spin...		1036	0.0
ref NP_001055754.1 	Os05g0460000 [Oryza sativa (japonica cult...		1033	0.0
ref NP_001049719.1 	Os03g0277300 [Oryza sativa (japonica cult...		1031	0.0
ref NP_001068540.1 	Os11g0703900 [Oryza sativa (japonica cult...		1028	0.0
gb AAP04522.1 	heat shock protein 70 [Nicotiana tabacum]		1027	0.0
emb CAN81694.1 	hypothetical protein [Vitis vinifera] >emb CA...		1026	0.0
gb EDQ67353.1 	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. p		1025	0.0
gb AAA62445.1 	heat shock protein >gb AAB88134.1 cytosolic h...		1022	0.0
gb AAF34134.1 	high molecular weight heat shock protein [Malus x		1021	0.0
ref NP_001049712.1 	Os03g0276500 [Oryza sativa (japonica cult...		1021	0.0
gb AAS57912.1 	70 kDa heat shock cognate protein 1 [Vigna radiat		1021	0.0
gb ABP35942.1 	heat shock protein 70 [Cyclamen persicum]		1020	0.0
emb CAB72129.1 	heat shock protein 70 [Cucumis sativus]		1019	0.0
gb ABD32895.1 	Heat shock protein Hsp70 [Medicago truncatula]		1019	0.0
ref NP_001044757.1 	Os01g0840100 [Oryza sativa (japonica cult...		1019	0.0
gb EDQ52117.1 	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. p		1019	0.0
emb CAA47948.2 	heat shock protein 70 [Oryza sativa (indica cult		1018	0.0
gb EDQ83358.1 	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. p		1018	0.0
sp P09189 HSP7C	PETHY Heat shock cognate 70 kDa protein >emb ...		1018	0.0
emb CAA31663.1 	hsp70 (AA 6 - 651) [Petunia x hybrida]		1018	0.0
gb AAN86275.1 	non-cell-autonomous heat shock cognate protein...		1017	0.0
gb EDQ75378.1 	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. p		1017	0.0
gb AAV98051.1 	heat shock protein 70 [Medicago sativa]		1016	0.0
gb AAN86274.1 	non-cell-autonomous heat shock cognate protein...		1016	0.0
gb ABK25453.1 	unknown [Picea sitchensis]		1015	0.0
gb AAB42159.1 	Hsc70 [Lycopersicon esculentum]		1015	0.0

Figura 2. Risultato dell'allineamento della HSC70 umana con le corrispondenti isoforme vegetali generato utilizzando l'algoritmo BLASTP. Il riquadro evidenzia che l'allineamento con il punteggio massimo è quello con l'isoforma di N. tabacum

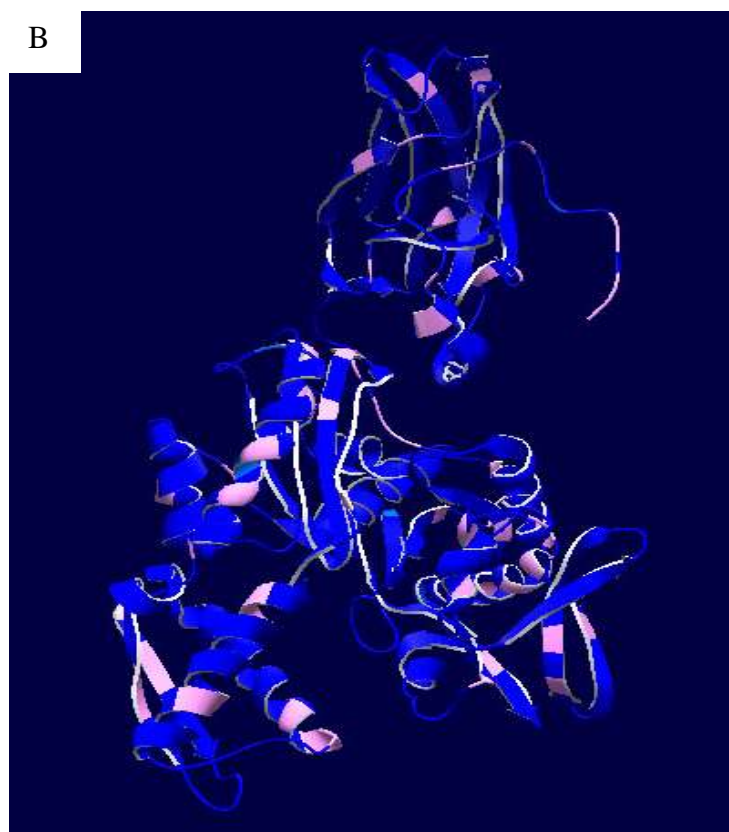


Figura 4. Pannello A: Struttura tridimensionale della HSC70 di *B. taurus* risolta mediante cristallografia a raggi X. Pannello B: modello delle HSC70 di *N. Tabacum*; in rosa sono indicati gli aminoacidi differenti rispetto a *B. taurus*. I foglietti β sono rappresentati come delle frecce la cui punta corrisponde all'estremità C-terminale e la cui coda corrisponde all'N-terminale. Le α -eliche sono rappresentate come delle eliche.

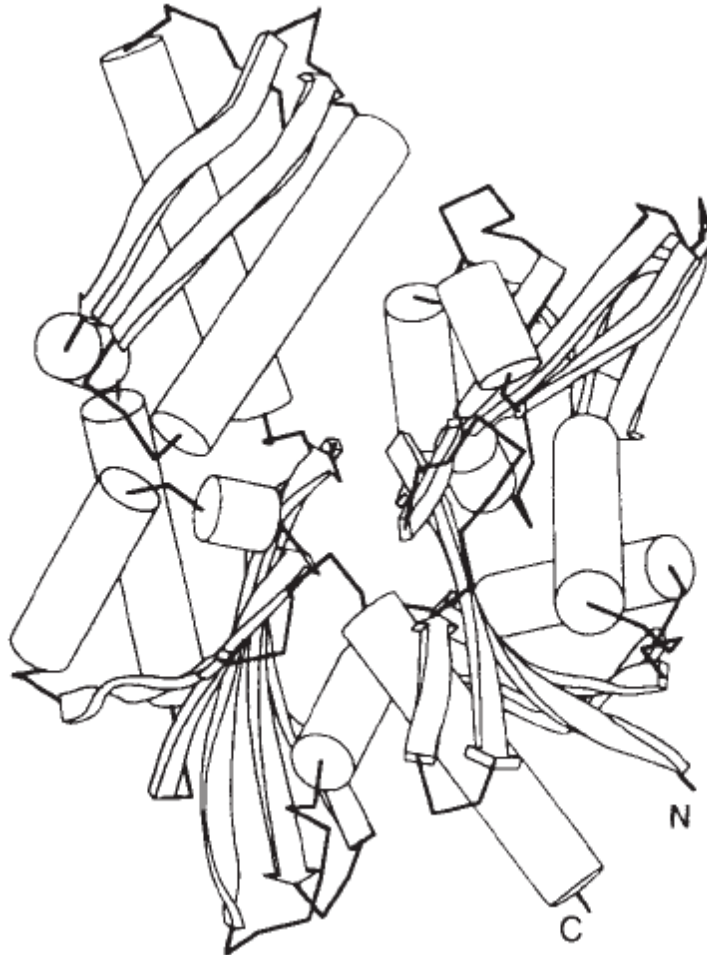


Figura 5. Dominio di legame con i nucleotidi (NBD) della HSC70 di *B. taurus*. I foglietti β sono rappresentati come delle frecce la cui punta corrisponde all'estremità C-terminale e la cui coda corrisponde all'N-terminale. Le α -eliche sono rappresentate come dei cilindri. N: estremità N-terminale del dominio e della proteina; C: estremità C-terminale del dominio (Flaherty et al., 1990).

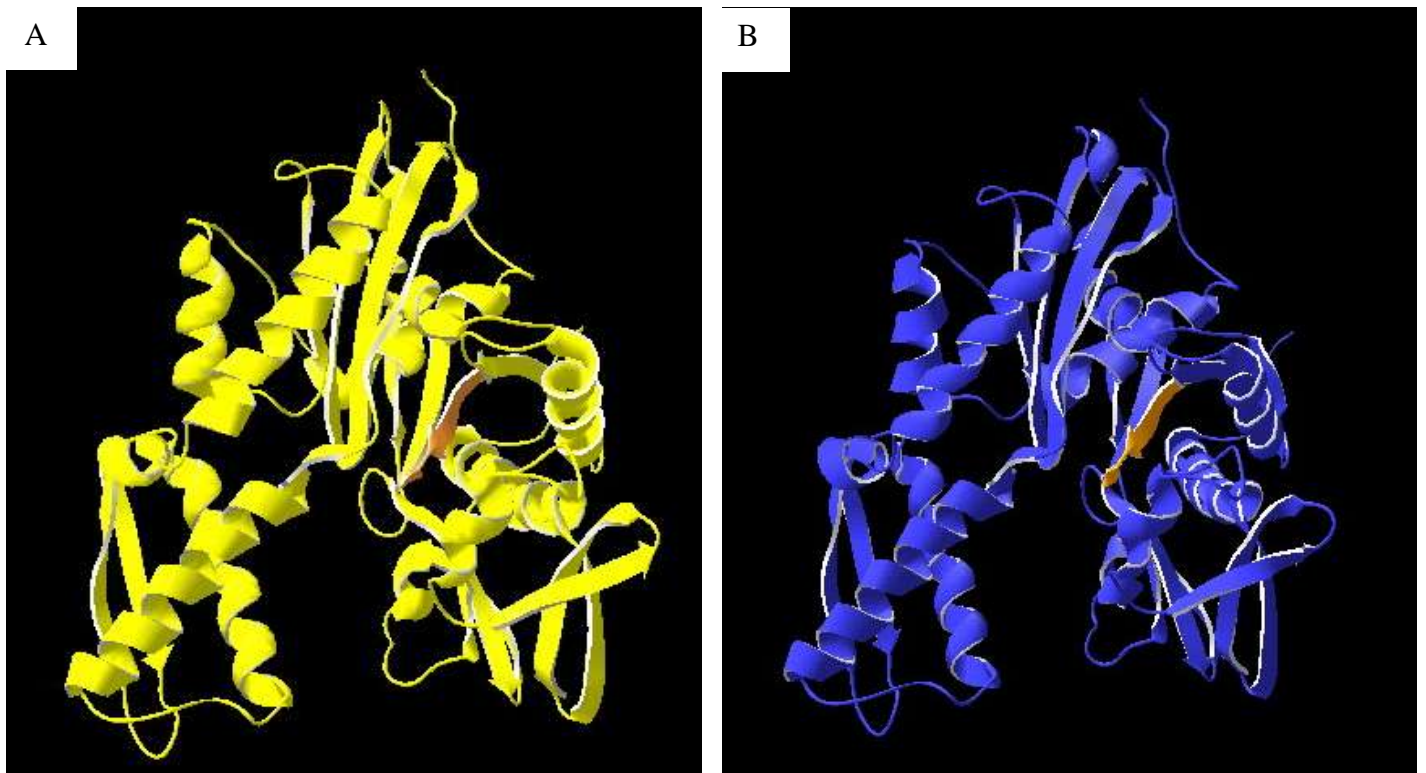


Figura 6. Pannello A: Struttura tridimensionale del dominio per il legame con i nucleotidi (NBD) di HSC70 di *B. taurus* determinata tramite cristallografia a raggi X. Pannello B: struttura del dominio NBD di HSC70 di *N. tabacum* ottenuta tramite modellamento per omologia. In entrambi i pannelli, in arancione è evidenziato il motivo conservato noto per essere coinvolto nell'associazione con i nucleotidi (GIDLGTT). I foglietti β sono rappresentati come delle frecce la cui punta corrisponde all'estremità C-terminale e la cui coda corrisponde all'N-terminale. Le α -eliche sono rappresentate come delle eliche.

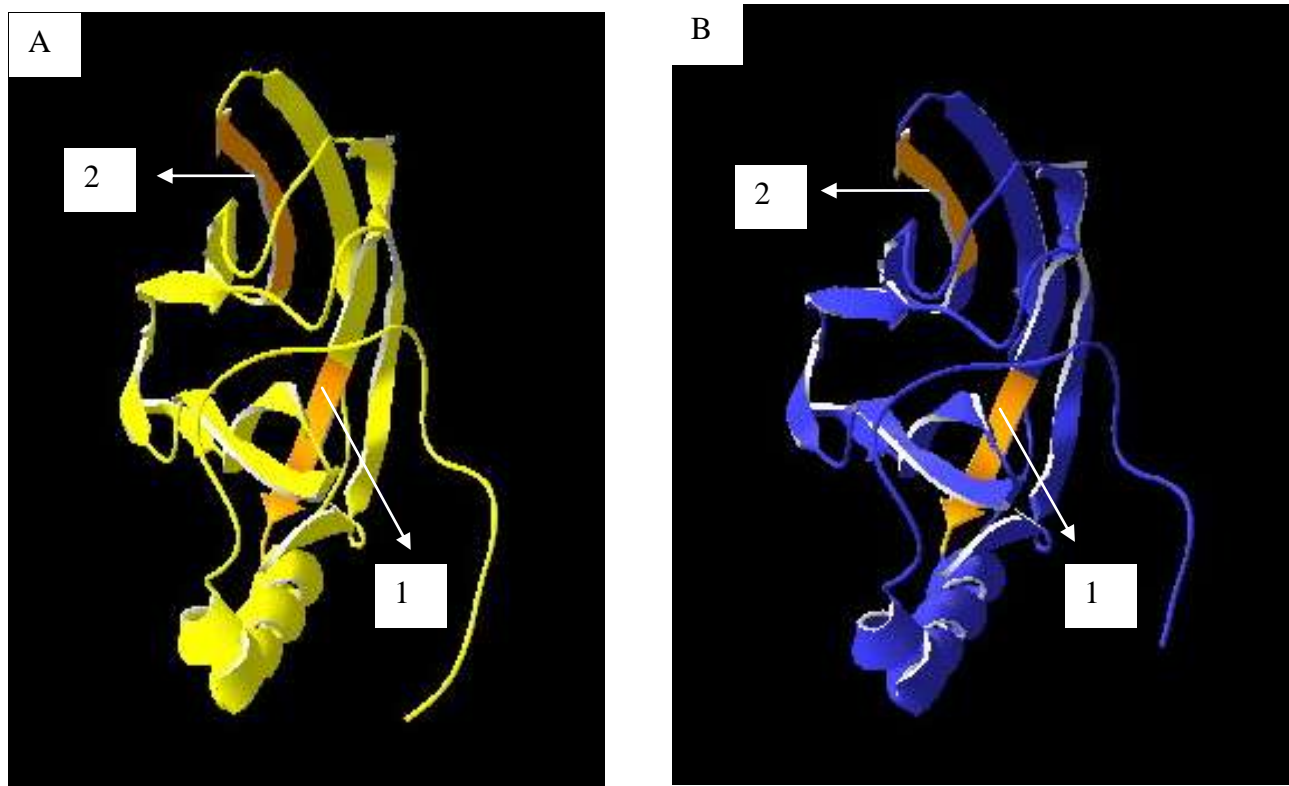


Figura 7. Pannello A: Struttura tridimensionale del dominio per il legame con i peptidi (SBD) di HSC70 di *B. taurus* determinata tramite cristallografia a raggi X. Pannello B: struttura del dominio SBD di HSC70 di *N. tabacum* ottenuta tramite modellamento per omologia. In entrambi i pannelli, in arancione sono evidenziati i motivi conservati noti per essere importanti per l'associazione con i peptidi: 1: QVFST; 2: QDLLLDVT. I foglietti β sono rappresentati come delle frecce la cui punta corrisponde all'estremità C-terminale e la cui coda corrisponde all'N-terminale. Le α -eliche sono rappresentate come delle eliche.

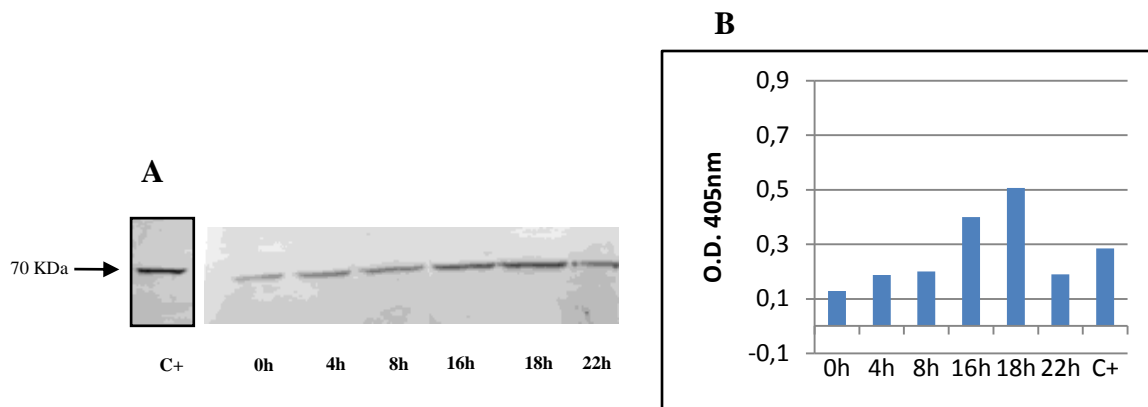


Figura 8 Analisi dell'espressione di HSP70 in tessuti fogliari di *N. benthamiana* a 0 (controllo non stressato), 4 8, 16, 18 e 22 ore (h) dallo *shock* termico. Pannello A: analisi Western, Pannello B saggio ELISA quantitativo C+: controllo positivo (HSP70 ricombinante). O.D 405 nm: densità ottica a 405 nm.

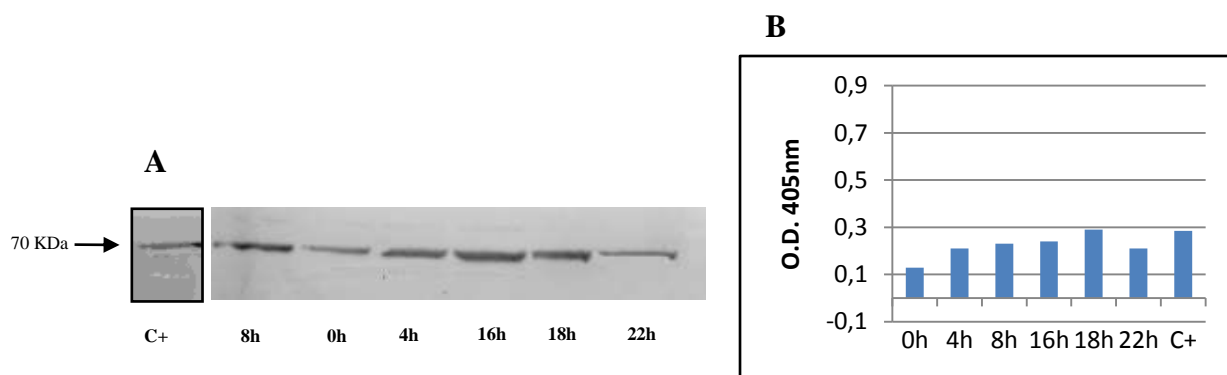


Figura 9. Analisi dell'espressione di HSP70 in tessuti fogliari di *N. benthamiana* a 0 (controllo non stressato), 4 8, 16, 18 e 22 ore (h) da danno meccanico tramite recisione dei fitomeri dei palchi più alti. Pannello A: analisi Western, Pannello B saggio ELISA quantitativo. C+: controllo positivo (HSP70 ricombinante); O.D. 405 nm: assorbanza a 405 nm.

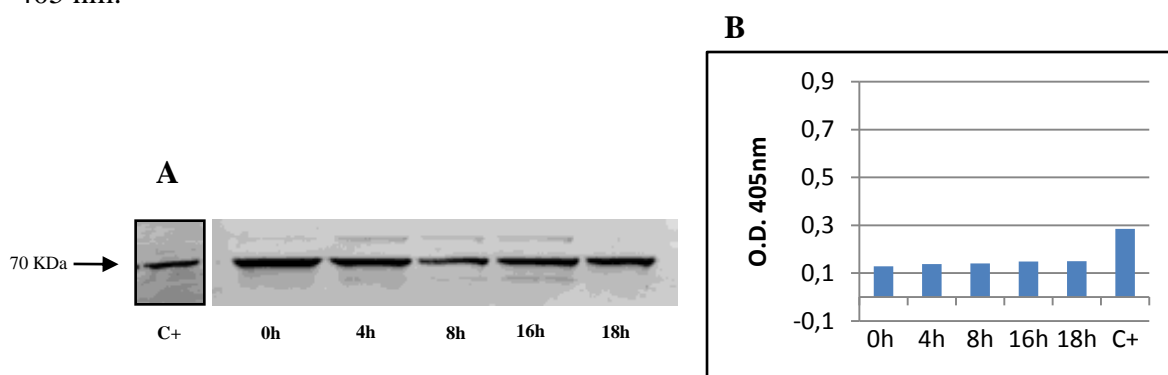


Figura 10. Analisi dell'espressione di HSP70 in tessuti fogliari di *N. benthamiana* a 0 (controllo non stressato), 4 8, 16, 18 e 22 ore (h) da danno meccanico tramite recisione dei fitomeri dei palchi più bassi. Pannello A: analisi Western, Pannello B saggio ELISA quantitativo. C+: controllo positivo (HSP70 ricombinante); O.D. 405 nm: assorbanza a 405 nm

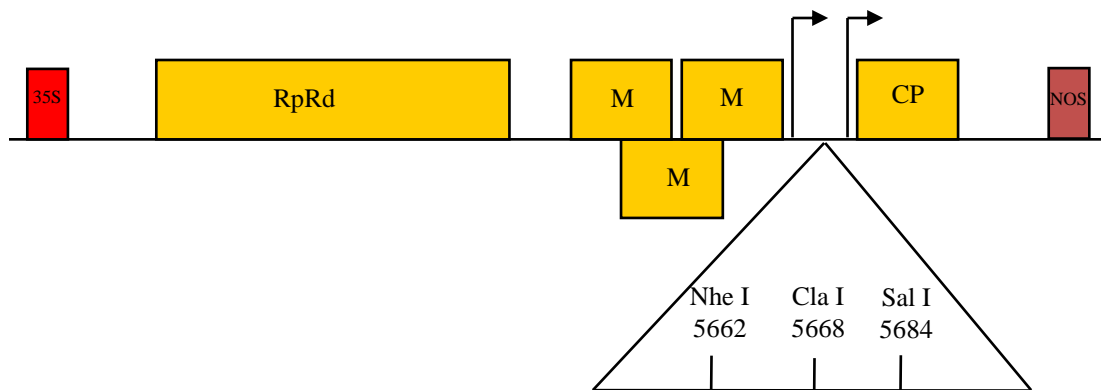


Figura 11. Rappresentazione schematica del vettore di espressione pPVX201 codificante il genoma completo del PVX. 35S: promotore 35S del Virus del Mosaico del Cavolfiore (Cauliflower Mosaic Virus, CaMV). RpRd: RNA polimerasi RNA dipendente. M: proteine del movimento virale. CP: proteina di rivestimento virale. NOS: terminatore trascrizionale del gene della nopalina sintasi di *A. tumefaciens*. Freccie: promotore subgenomico del gene della CP e sua duplicazione. Nel dettaglio il sito multiplo di clonaggio.

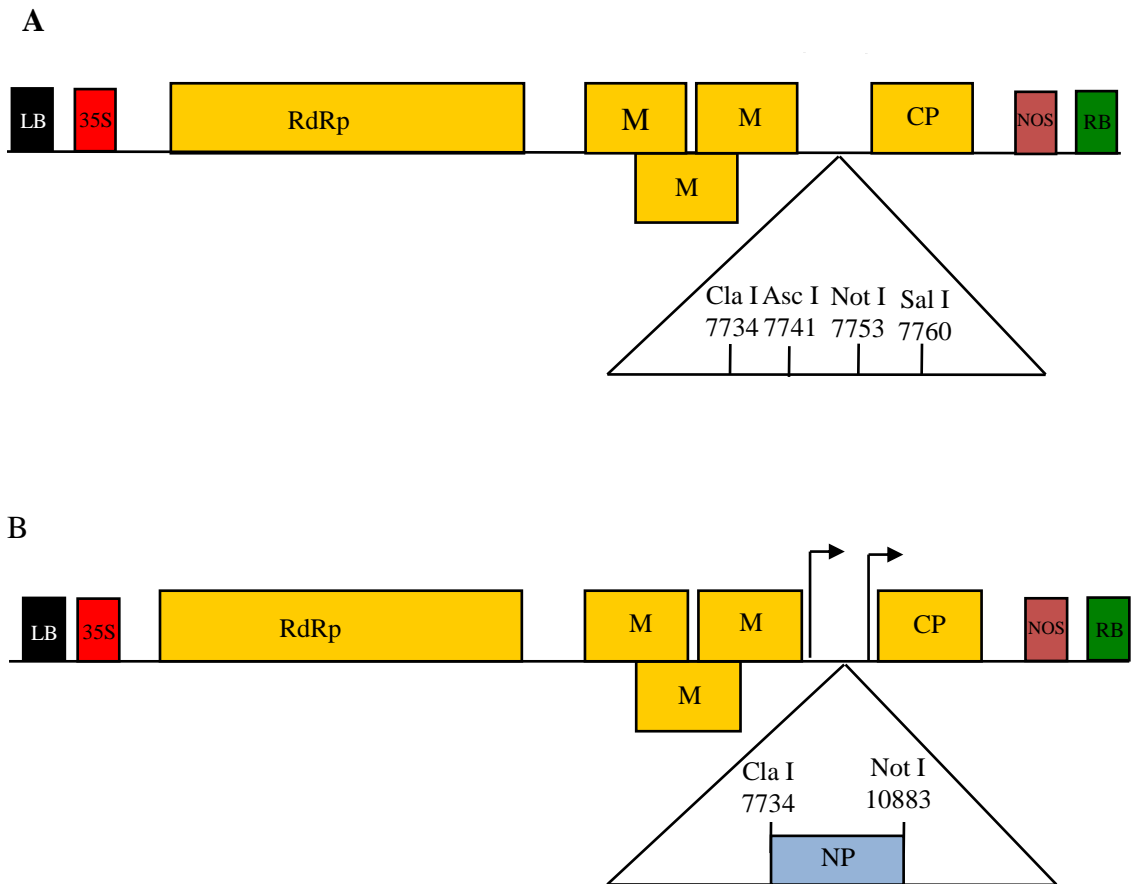


Figura 12. Pannello A: Rappresentazione schematica del vettore binario pGR106 codificante per il genoma del PVX. Pannello B: Rappresentazione schematica del vettore binario pGR106-NP codificante per il genoma PVX per e la proteina NP.. 35S: promotore 35S del Virus del Mosaico del Cavolfiore (Cauliflower Mosaic Virus CaMV). RpRd: RNA polimerasi RNA dipendente. M: proteine del movimento virale. CP: proteina di rivestimento virale. NOS: terminatore trascrizionale del gene della nopalina sintasi di *A. tumefaciens*. Frecce: promotore subgenomico del gene della CP e sua duplicazione. Nel dettaglio: il sito multiplo di clonaggio (Pannello A) e il sito di clonaggio della sequenza del cDNA codificante la proteina NP (Pannello B). LB: sequenza *Left Border*. RB: sequenza *Right Border*

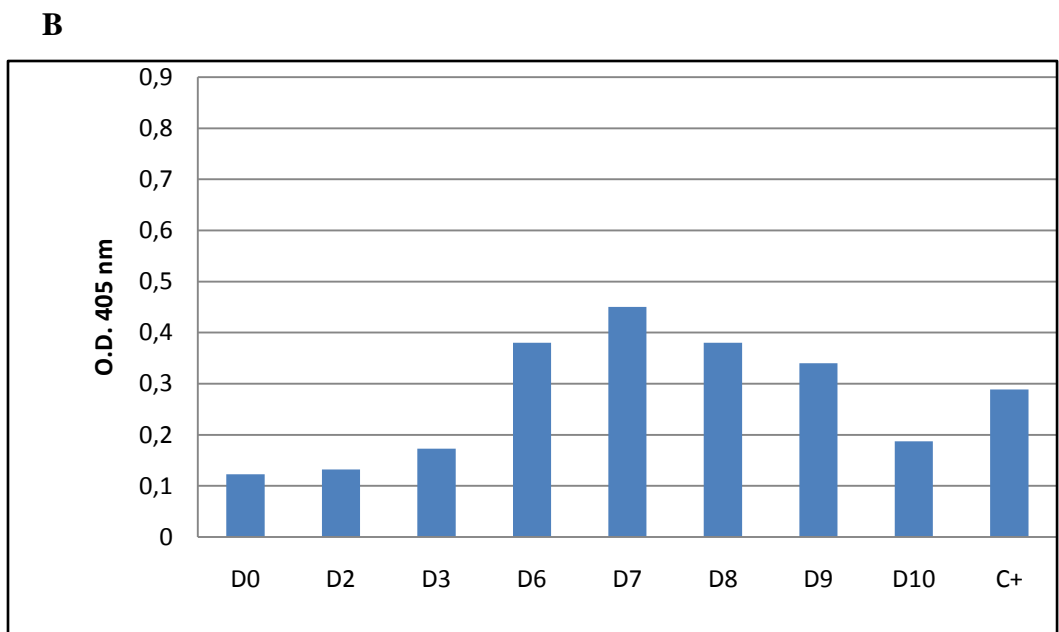
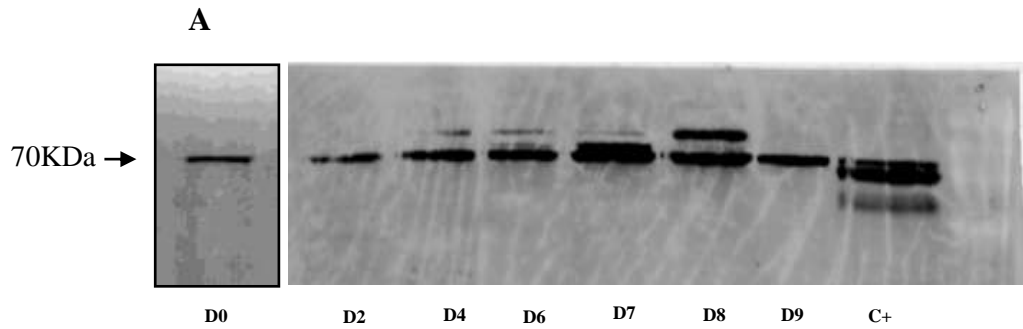


Figura 13. Analisi Western dell'espressione di HSP70 in seguito a stress biotico indotto da infezione virale a 0,2,3,4,6,7,8, 9 e 10 giorni (D). Pannello A: analisi Western. Pannello B: saggio ELISA quantitativo. C+: controllo positivo (HSP70 ricombinante); O.D. 405nm: assorbanza a 405 nm.

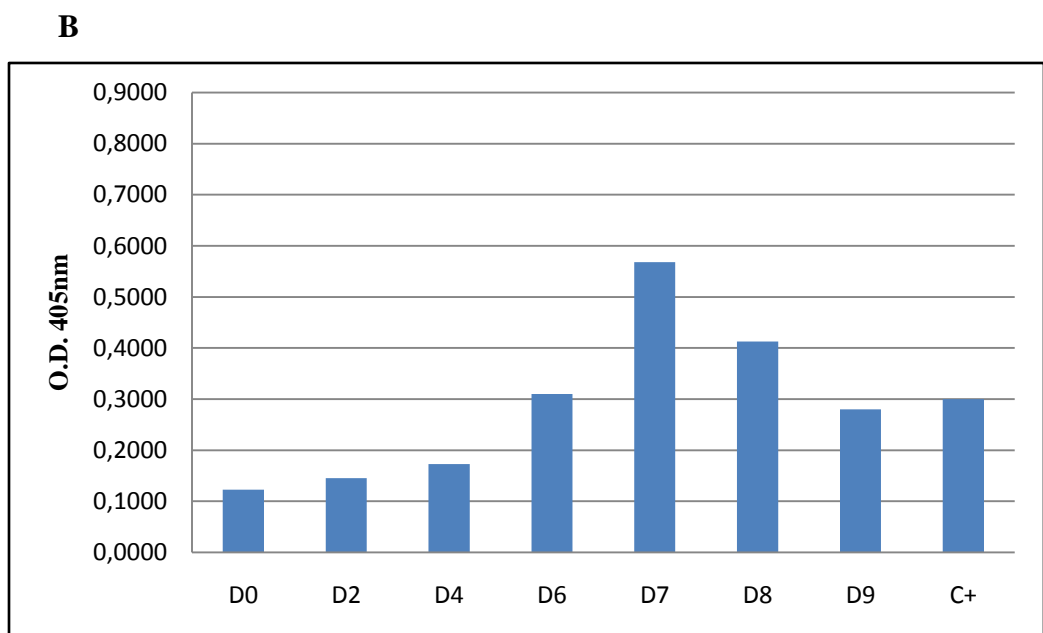
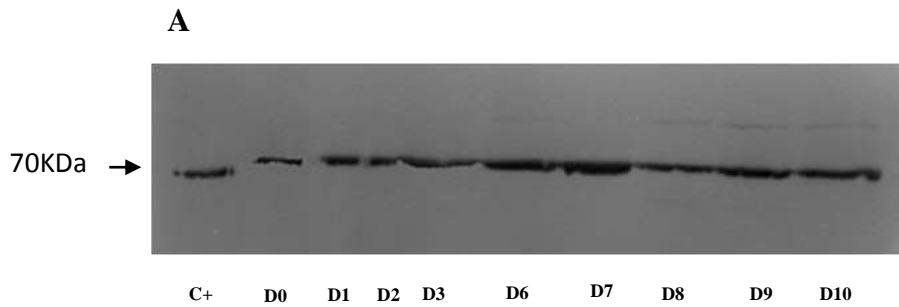


Figura 14. Analisi Western dell'espressione di HSP70 in seguito a stress biotico indotto da agroinfiltrazione a 0,1,2,3,4,6,7,8 e 9 giorni (D). Pannello A: analisi Western. Pannello B: saggio ELISA quantitativo. C+: controllo positivo (HSP70 ricombinante); O.D. 405nm: assorbanza a 405 nm.

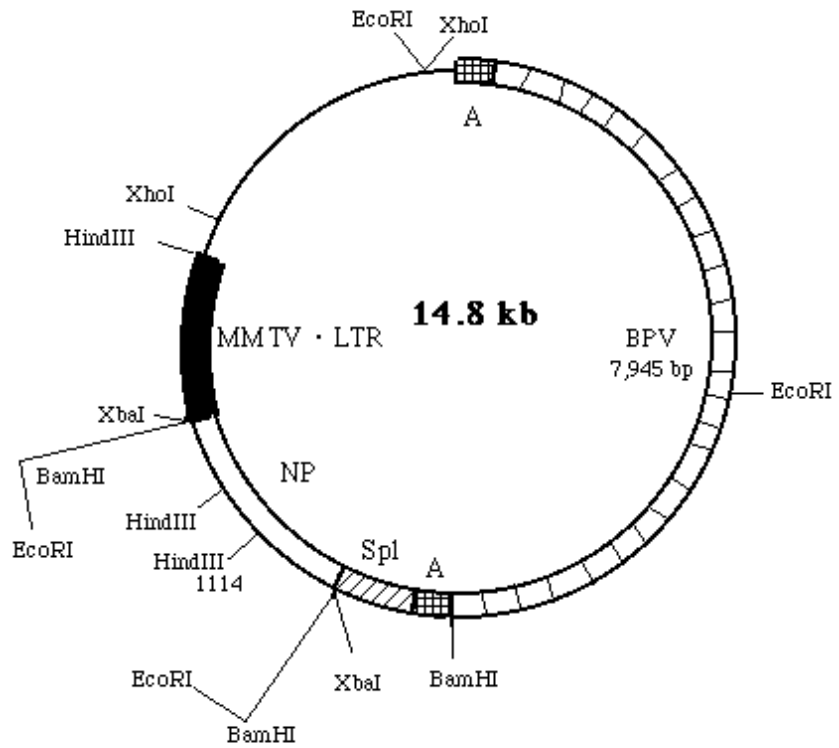


Figura 15. Rappresentazione schematica del vettore pBMSA-NP (ottenuto dal Riken Bio Resource Centre). NP: cDNA codificante la Nucleoproteina del Virus A dell'Influenza; MMTV-LTR: promotore inducibile del Virus del Tumore Mammario Bovino; BPV: cDNA del Virus del Papilloma Bovino; A: sito di poliadenilazione; Spl: sito di splincing

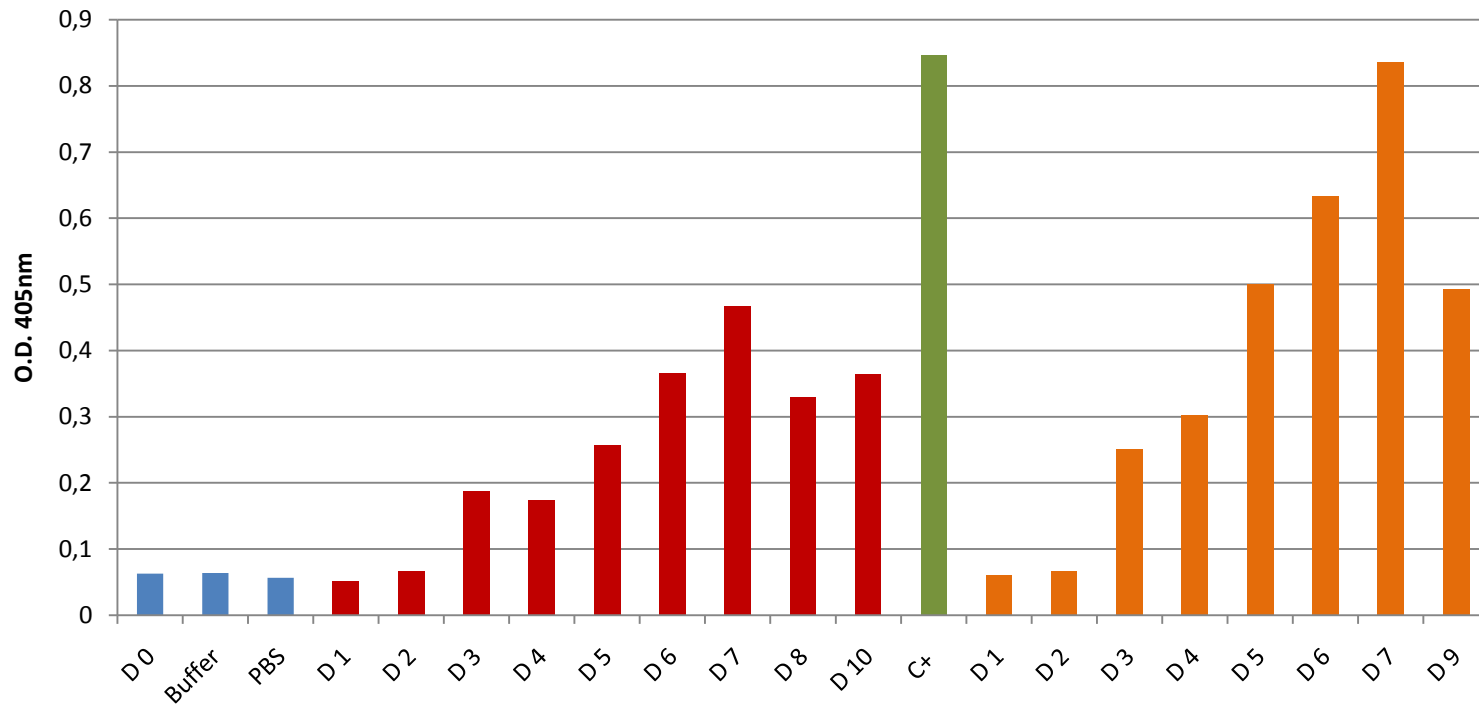


Figura 16. Saggio ELISA quantitativo con un anticorpo monoclonale anti-NP degli estratti proteici totali ottenuti da foglie infiltrate da 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 giorni (D) con cellule di *A. tumefaciens* recanti il vettore pGR106-NP da sole (barre rosse) o insieme a cellule di *A. tumefaciens* recanti un vettore binario per l'espressione della proteina P19 di AMCV (barre arancioni). D0: pianta non trattata (barra blu); Buffer: pianta di controllo infiltrata con il solo tampone (barra blu); PBS: controllo negativo in ELISA (PBS1X) (barra blu); C+: controllo positivo in ELISA (NP ricombinante) (barra verde)

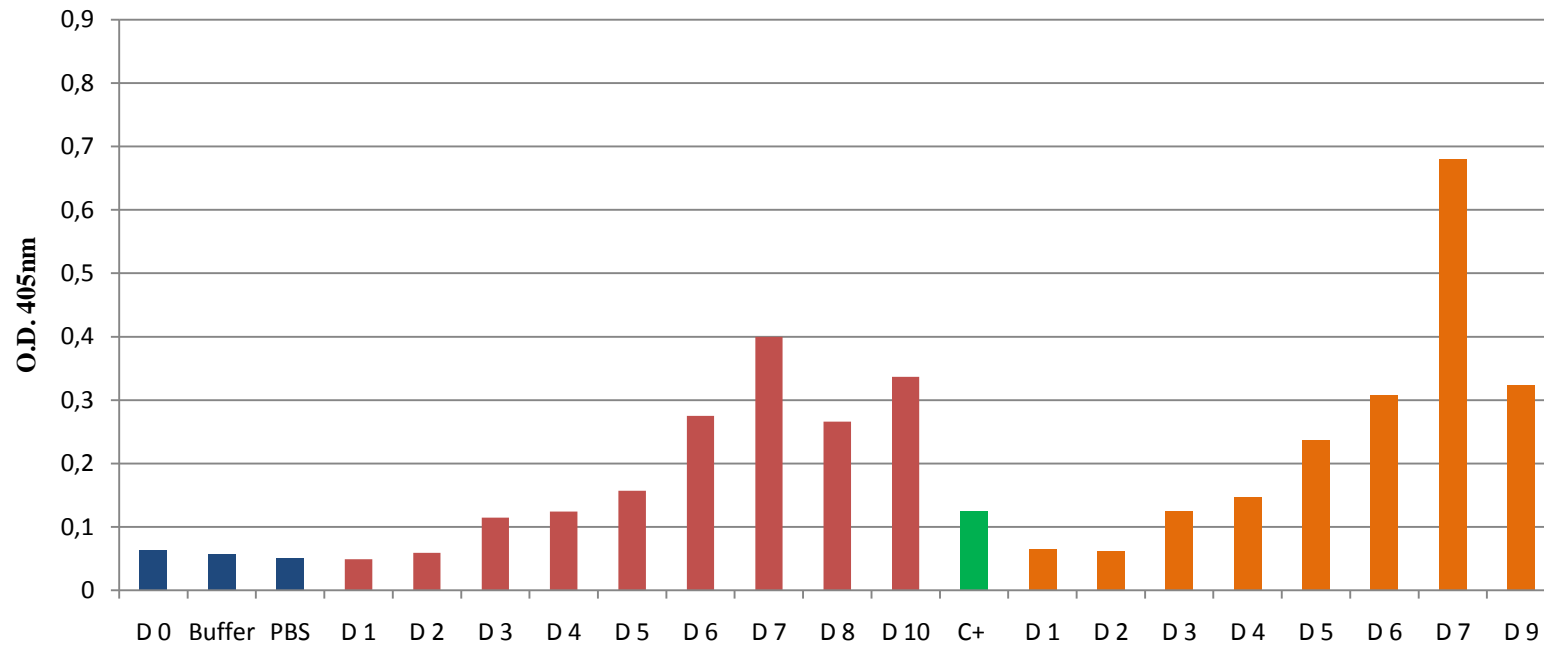


Figura 17. Saggio ELISA quantitativo con un anticorpo monoclonale anti-HSP 72/73 degli estratti proteici totali ottenuti da foglie infiltrate da 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 giorni (D) con cellule di *A. tumefaciens* recanti il vettore pGR106-NP da sole (barre rosse) o insieme a cellule di *A. tumefaciens* recanti un vettore binario per l'espressione della proteina P19 di AMCV (barre arancioni). D0: pianta non trattata (barra blu); Buffer: pianta di controllo infiltrata con il solo tampone (barra blu); PBS: controllo negativo in ELISA (PBS1X) (barra blu); C+: controllo positivo in ELISA (HSP ricombinante) (barra verde)

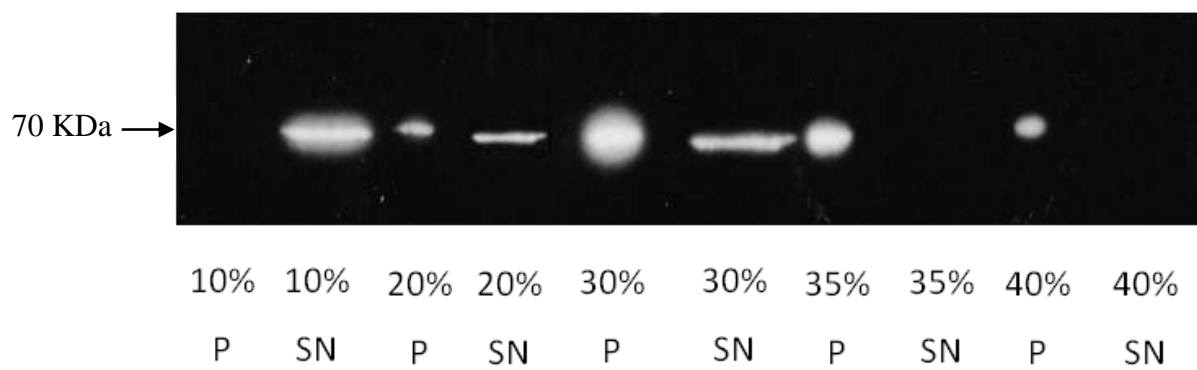


Figura 18. analisi western con un anticorpo monoclonale anti-HSP72/73 dei pellet (P) e dei supernatanti (SN) ottenuti aggiungendo quantità diverse (%W/V) di ammonio solfato all'estratto proteico totale preparato in tampone 1

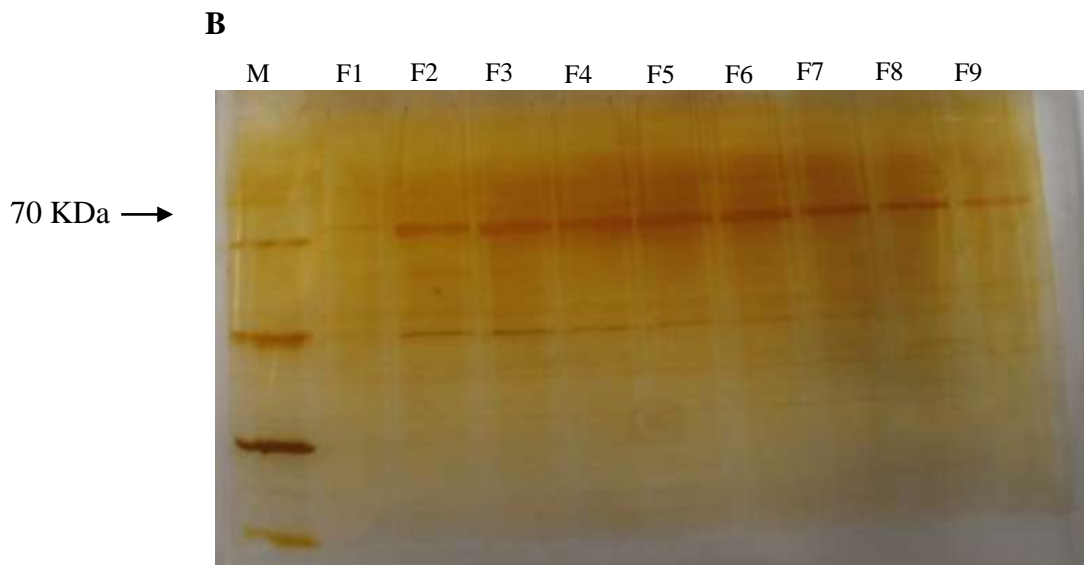
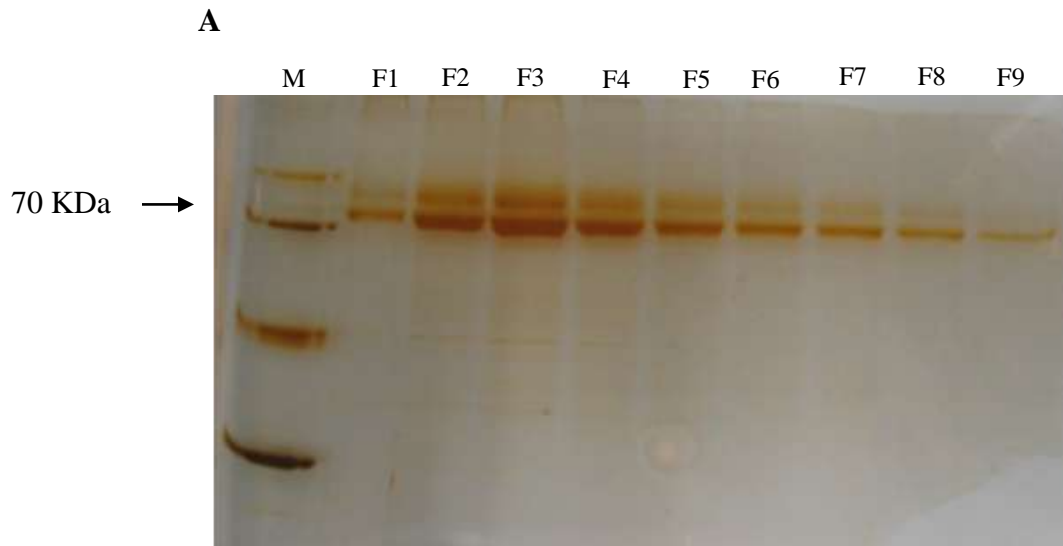


Figura 19. Analisi SDS-PAGE delle frazioni eluite (F1-F9) dalla colonna di ADP-agarosio di estratti ottenuti con T1 (Pannello A) o T2 (pannello B) dopo colorazione tramite nitrato d'argento. M: marcatore di peso molecolare (*Low Range molecular Marker*, Roche)

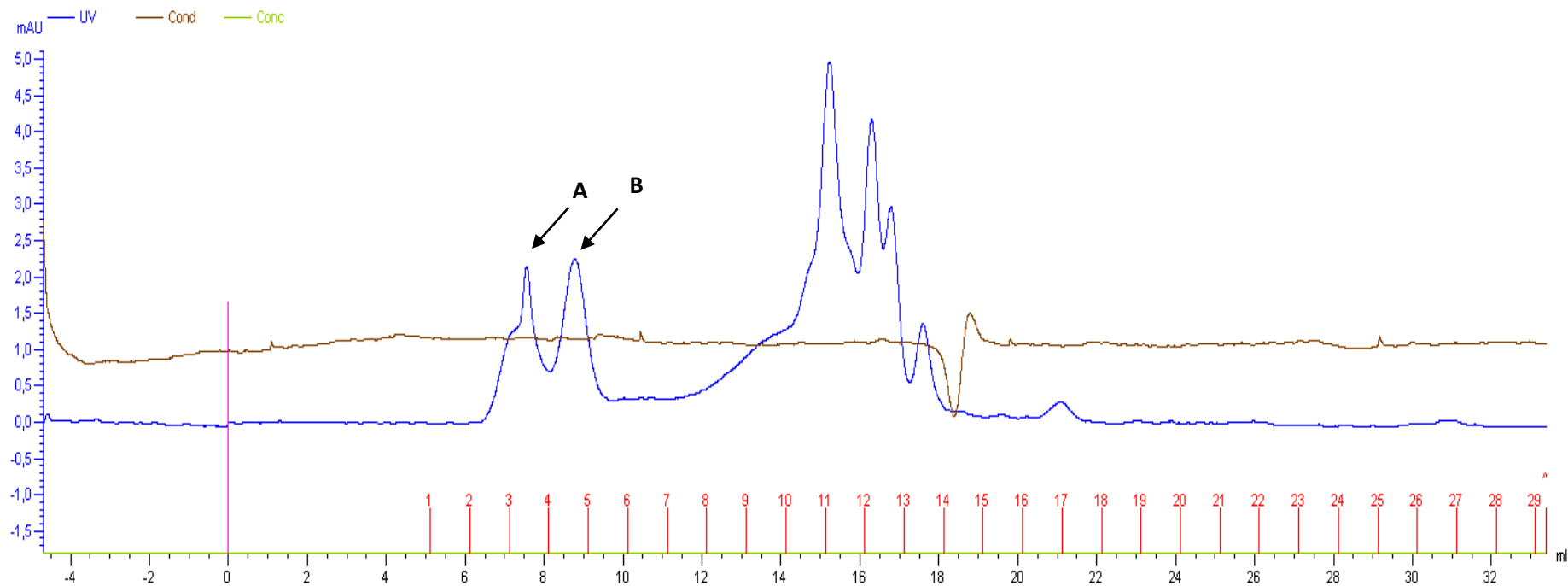


Figura 20. Profilo di eluizione che si ottiene caricando su colonna di Gel Filtrazione il campione contenente. Le frecce indicano la forma aggregata (A) e quella monomeric (B) della HSP70. L'asse delle ordinate indica l'assorbanza alla luce ultravioletta; l'asse delle ascisse rappresenta il volume di eluizione; le barre rosa indicano le frazioni recuperate. La linea marrone indica la conduttività del tampone di corsa durante il procedere dell'eluizione dei campioni dalla colonna.

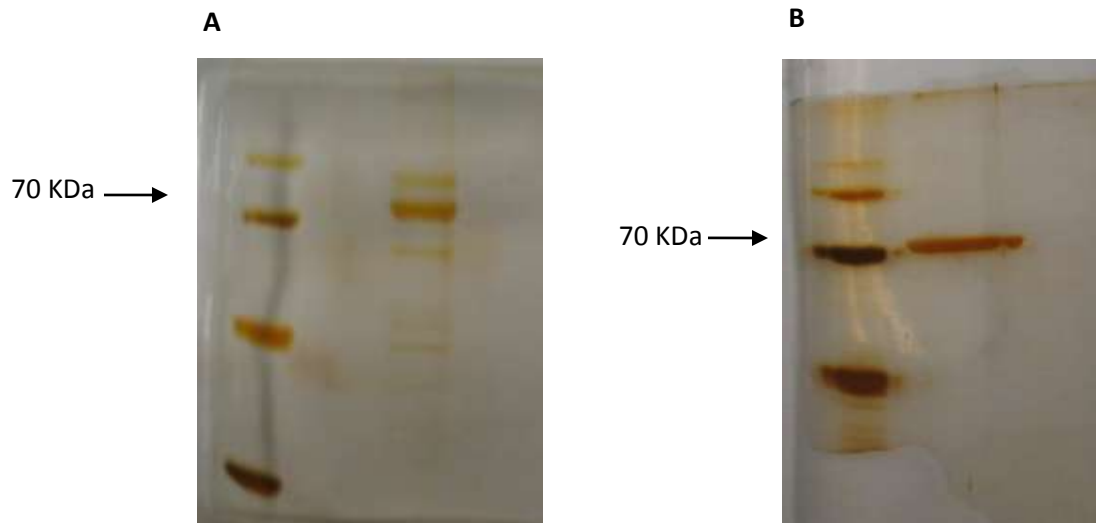


Figura 21. Analisi SDS-PAGE, colorato con nitrato d'argento, delle HSP70 ottenute prima e dopo la purificazione attraverso cromatografia per Gel Filtrazione. Pannello A: il campione prima di essere applicato alla colonna di Gel Filtrazione. Pannello B: la frazione di eluizione contenente la forma monometrica di HSP70.

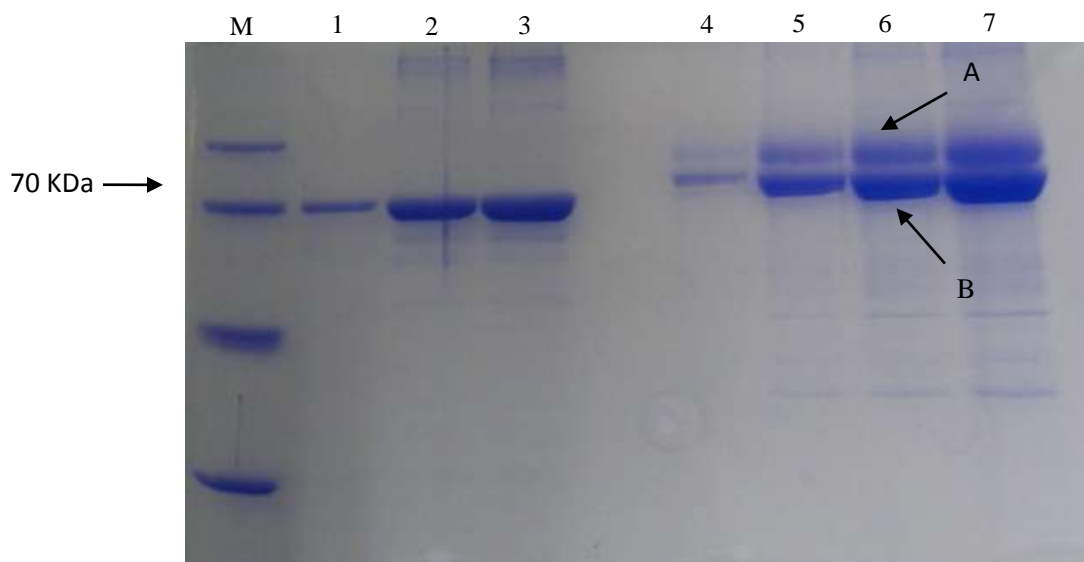


Figura 22. Analisi SDS-PAGE di quantità diverse delle HSP70 ottenute con il protocollo messo a punto (*lane 4: 1µl, lane 2: 5µl, lane 6: 10µl, lane 7: 20 µl*) sottoposto a colorazione con Blue di Coomassie. Valutazione del livello di purezza delle HSP70 purificate e di quantitativi noti di Siero Albumina Bovina (*lane 1: 1µg, lane 2: 5µg, lane 3: 10µg*). A e B indicano le bande analizzate tramite spettrometria di massa. M: marcatore di peso molecolare (*Low Range Molecular Marker, Roche*).

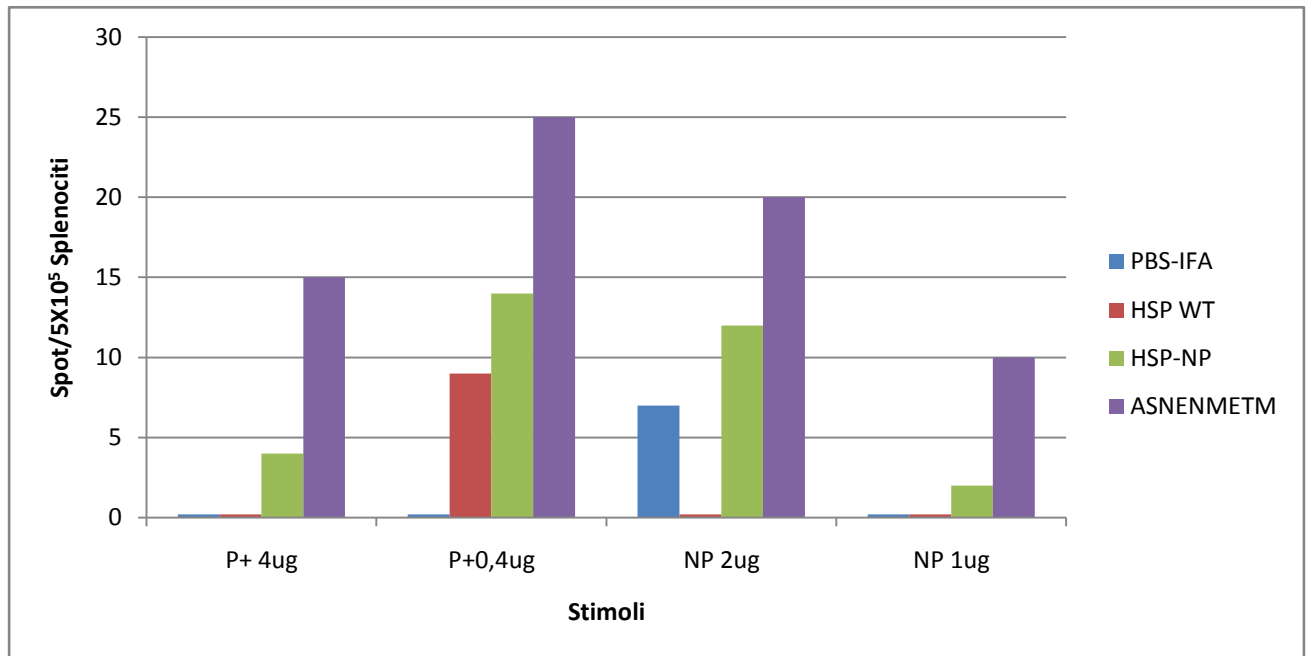


Figura 23. Risultato del saggio ELISPOT. Numero di *spot* ottenuti per 5×10^5 splenociti del topo immunizzato con PBS+IFA (barra blu), peptide ASNENMETM+IFA (barra viola), HSP70-peptide estratti da piante agroinfiltrate con cellule di *A. tumefaciens* recanti il vettore di espressione pGR106 (barra rossa), HSP70-peptide estratti da piante agroinfiltrate con cellule di *A. tumefaciens* recanti il vettore di espressione pGR106-NP (barra verde). In ordinata il numero di *spot* per 5×10^5 splenociti; in ordinata gli stimoli utilizzati.

BIBLIOGRAFIA

Aguilar J.C. and Rodríguez E.G. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* **25**: 3752-62, 2007.

Anderson J., Haskell D.W., Cuy C. Differential influence of ATP on native spinach 70-kilodalton Heat-Shock Cognates. *Plant Physiol.* **104**: 1371-80, 1994.

Aparicio F., Thomas C.L., Lederer C., Niu Y., Wang D., Maule A.J. Virus induction of heat shock protein 70 reflects a general response to protein accumulation in the plant cytosol. *Plant Physiol.* **138**: 529-36, 2005.

Aranda M.A., Escaler M., Wang D., Maule A.J. Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 15289-93, 1996.

Arnold D., Faath S., Rammensee H., Schild H. Cross-priming of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells upon immunization with the heat shock protein gp96. *J. Exp. Med.* **182**: 885-88, 1995.

Arnold J.N., Wormald M.R., Sim R.B., Rudd P.M., Dwek R.A. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **25**: 21-50, 2007.

Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu. Rev. Biochem.* **51**: 531-54, 1982

Baker-LePain J., Reed R.C., Nicchitta C.V. ISO: a critical evaluation of the role of peptides in heat shock/chaperone protein-mediated tumor rejection. *Curr. Op. Immunol.* **15**: 89-94, 2003.

Bakker H., Rouwendal G.J.A., Karnoup A.S., Florack D.E., Stoopen G.M., Helder J.P.F.G., van Ree R., van Die I., Bosch D. An antibody produced in tobacco expressing a hybrid b-1,4-galactosyltransferase is essentially devoid of plant carbohydrate epitopes. *Proc Natl. Acad. Sci.* **103**: 7577-82, 2006.

Baneyx F., Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**:1399-408, 2004.

Basu S., Binder R.J., Ramalingam T., Srivastava P.K. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*. **14**: 303-307, 2001.

Basu S. and Matsutake T. Heat shock protein-antigen presenting cell interactions. *Methods* **32**: 38-41, 2004.

Baulcombe D.C., Chapman S., Santa Cruz S. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* **6**: 1045-53, 1995.

Belz G.T., Stevenson P.G., Doherty P.C. Contemporary analysis of MHC-related immunodominance hierarchies in the CD8+ T cell response to influenza A viruses. *J. Immunol.* **165**: 2402-09, 2000.

Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L. GenBank. *Nucl. Acid. Res.* **36**: D25-30, 2008.

Blachere N.E., Li Z., Chandawarkar R.Y., Suto R., Jaikaria N.S., Basu S., Udono H., Srivastava P.K. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted *in vitro*, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J. Exp. Med.* **186**: 1315-23, 1997.

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

Brehmer D., Rüdiger S., Gässler C.S., Klostermeier D., Packschies L., Reinstein J., Mayer M.P., Bukau B. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 427-32, 2001.

Bukau B. and Horwich A.L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. **92**: 351-66, 1998.

Calderwood S.K., Mambula S.S., Gray P.J. Jr. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1113**: 28-39, 2007.

Cañizares M., Nicholson L., Lomonosoff G. P. Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunol. Cell. Biol.* **83**: 263-70, 2005.

Christensen A.H. and Quail P.H. Sequence analysis and transcriptional regulation by heat shock of polyubiquitin transcripts from maize **12**: 619-32, 1989.

Commandeur U., Twyman R. M. and Fischer R. The biosafety of molecular farming in plants *Agbiotech.* **5**: 110-18, 2003.

Cooper E. and O'Reilly M. A novel staff vaccination strategy. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **23**: 232-3, 2002.

Cox K.M., Sterling J.D., Regan J.T., Gasdaska J.R., Frantz K.K., Peele C.G., Black A., Passmore D., Moldovan-Loomis C., Srinivasan M., Cuisson S., Cardarelli P.M., Dickey L.F.. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nat. Biotech.* **24**: 1591-97, 2004

Cupp-Vickery J.R., Silberg J.J., Ta D.T., Vickery L.E. Crystal structure of IscA, an iron-sulfur cluster assembly protein from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **338**: 127-37, 2004.

Daniell H. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat. Biotechnol.* **20**: 581-6, 2002.

Dhaubhadel S., Browning K.S., Gallie D.R., Krishna P. Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *Plant. J.* **29**: 681-91, 2002.

De Cosa B., Moar W., Lee S.B., Miller M., Daniell H. Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat. Biotechnol.* **19**: 71-4, 2001.

Del Giudice G., Hilbert A.K., Bugarini R., Minutello A., Popova O., Toneatto D., Schoendorf I., Borkowski A., Rappuoli R., Podda A. An MF59-adjuvanted inactivated influenza vaccine containing A/Panama/1999 (H3N2) induced broader serological protection against heterovariant influenza virus strain A/Fujian/2002 than a subunit and a split influenza vaccine. *Vaccine.* 2006 **24**: 3063-5, 2006.

Drake P.M., Chargelegue D.M., Vine N.D., Van Dolleweerd C.J., Obregon P., Ma J. Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots. *Plant Mol Biol.* **52**: 233-41, 2003.

Facciponte J.G., Wang X.Y., MacDonald I.J., Park J.E., Arnouk H., Grimm M.J., Li Y., Kim H., Manjili M.H., Easton D.P., Subjeck J.R. Heat shock proteins HSP70 and GP96: structural insights. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**: 339-46, 2006.

Feder M.E., Hofmann G.E. Heat Shock Proteins, molecular chaperons and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **61**: 243-51, 1999.

Feldmann K. and Marks M. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach *Mol. Gen. Genet.* **208**: 1-9, 1987.

Flaherty K.M., DeLuca-Flaherty C., McKay D.B. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature.* **346**: 623-8, 1990.

Fischer R., Vaquero-Martin C., Sack M., Drossard J., Emans N., Commandeur U. owards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**: 113-6, 1999.

Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Twyman R.M. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Pl. Biol.* **7**: 152-58, 2004.

Fourie A., Sambrook J., Gething S M.H. Common and Divergent Peptide Bindings pecificities of hsp70 Molecular Chaperones. *J. Biol. Chem.* **269**: 30470-78, 1994.

Fraley R., Rogers S., Horsch R., Sanders P., Flick J., Adams S., Bittner M., Brand L., Fink C., Fry J., Galluppi G., Goldberg S., Hoffmann N., Woo S. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 4803-7, 1983.

Gelvin S.B. Viral-mediated plant transformation gets a boost. *Nat. Biotech.* **23**: 68 -85, 2005.

Geoffrey A. C. Interferon- γ ELISPOT Assay for the quantitative measurement of antigen-specific murine CD8⁺ T-Cells. In Handbook of ELISPOT: Methods and Protocol. Kalyuzhny A.E. ed., *Meth. Mol. Biol.* Vol. **302**, Humana press, Totowa (NJ), 2005. Pp 191-203

Gething M.J., Blond-Elguindi S., Buchner J., Fourie A., Knarr G., Modrow S., Nanu L, Segal M, Sambrook J. Binding sites for Hsp70 molecular chaperones in natural proteins. *Cold. Spring. Harb.Symp. Quant. Biol.* 60: 417-28, 1995.

Gething M.J., Sambrook J Protein folding in the cell. *Nature* **355**: 35-42 1992.

Gidalevitz T., Biswas C., Ding H., Schneidman-Duhovny D., Wolfson H.J., Stevens F., Radford S., Argon Y. Identification of the N-terminal peptide binding site of glucose-regulated protein 94. *J. Biol. Chem.* **279**: 16543-52, 2004.

Ginalski K. Comparative modeling for protein structure prediction. *Cur.r Opin. Struct. Biol.* **16**: 172-1777, 2006.

Gleba Y., Klimyuk V, Marillonnet S. Magniflection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* **23**: 2042-48, 2005.

Goloubinoff P. and De Los Rios P. he mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together. *Trends. Biochem. Sci.* **32**: 372-80, 2007.

Gragerov A. and Gottesman M.E. Different peptide binding specificities of hsp70 family members. *J. Mol. Biol.* **241**: 133-5, 1994.

Graves A. and Goldman S. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the monocot genus Gladiolus: detection of expression of T-DNA-encoded genes. *J. Bacteriol.* **169**: 1745-6, 1987.

Guex N. and Peitsch M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PDBViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714-23, 1997.

Gupta R.K., Sharma S.B., Ahuja S., Saxena S.N. The effect of aluminium phosphate adjuvant on the potency of pertussis vaccine. *J. Biol. Stand.* **15**: 99-101, 1987.

Gullo C.A. and Teoh G. Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Immunol. Lett.* **94**: 1-10, 2004.

Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurtner D., Buchner J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 842-6, 2005.

Hamilton S.R, Davidson R.C., Sethuraman N., Nett J.H., Jiang Y., Rios S., Bobrowicz P., Stadheim T.A., Li H., Choi B.K., Hopkins D., Wischniewski H., Roser J., Mitchell T., Strawbridge R.R., Hoopes J., Wildt S., Gerngross T.U. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science* **313**: 1441-3, 2006.

Hamilton E.W. and Coleman J.S. Heat-shock proteins are induced in unstressed leaves of *Nicotiana attenuata* (Solanaceae) when distant leaves are stressed. *Am. J. Bot.* **88**: 950-55, 2001

Harper D.M., Franco E.L., Wheeler C.M., Moscicki A.B., Romanowski B., Roteli-Martins C.M., Jenkins D., Schuind A., Costa Clemens S.A., Dubin G.; HPV Vaccine Study group. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet.* **367**: 1247-55, 2006.

Harris S.F., Shiau A.K., Agard D.A. The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the Escherichia coli Hsp90, reveals a potential substrate binding site. *Structure.* **12**: 1087-97, 2004.

Hellens R.P., Edwards E.A., Leyland N.R., Bean S., Mullineaux P.M. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **42**: 819-32, 2000.

Helm K.W. and Abernethy R.H. Heat Shock Proteins and Their mRNAs in Dry and Early Imbibing Embryos of Wheat. *Plant Physiol.* **93**: 1626-33, 1990.

Hinman A.R., Orenstein W.A., Santoli J.M., Rodewald L.E., Cochi S.L. Vaccine shortages: history, impact, and prospects for the future. *Annu. Rev. Public. Health.* **27**: 235-59, 2006.

Hood E., Witcher D., Maddock S., Meyer T., Baszczyński C., Bailey M., Flynn P., Register J., Marshall L., Bond D., Kulisek E., Kusnadi A., Evangelista R., Nikolov Z., Wooge C., Mehig R., Hernan R., Kappel W., Ritland D., Ping Li C., Howard J., Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Mol. Breed.* **3**: 291-306, 1997.

Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G., Sanders P.R., Lloyd A., Hoffmann N. Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants. *Science* **223**: 496-98, 1984.

Houde M., Bertholet S., Gagnon E., Brunet S., Goyette G., Laplante A., Princiotta M.F., Thibault P., Sacks D., Desjardins M. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**: 402-6, 2003.

Ishii T., Udono H., Yamano T., Ohta H., Uenaka A., Ono T., Hizuta A., Tanaka N., Srivastava P.K., Nakayama E. Isolation of MHC Class I- restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with Heat Shock Proteins hsp70, hsp90, and gp961. *J. Immunol.* **162**: 1303-09, 1999.

Itoh T, Matsuda H., Mori H. Phylogenetic Analysis of the Third Hsp70 Homolog in *Escherichia coli*; a Novel Member of the Hsc66 Subfamily and Its Possible Co-chaperone. *DNA Res.* **6**: 299-305, 1999.

Jakob U., Gaestel M., Engel K., Buchner J. Small Heat Shock Proteins Are Molecular Chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**: 1517-20, 1993.

Javid B., MacAry P.A., Lehner P.J. Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity. *J. Immunol.* **179**: 2035-40, 2007.

Jiang J., Lafer E.M., Sousa R. Crystallization of a functionally intact Hsc70 chaperone. *Acta. Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **62**: 39-43, 2006.

Kelly D.F. and Rappuoli R. Reverse vaccinology and vaccines for serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **568**: 217-23, 2005.

Krieg A.M. CpG DNA: trigger of sepsis, mediator of protection, or both? *Scand. J. Infect. Dis.* **35**: 653-9, 2003.

Krishnan J., Selvarajoo K., Tsuchiya M., Lee G., Choi S. Toll-like receptor signal transduction. *Exp. Mol. Med.* **39**: 421-38, 2007.

Janeway C. Immunobiology, Oxford Press, 2000

Kapila J., De Rycke R., Van Montagu M., Angenon G. An *Agrobacterium* -mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* **122**: 101-08, 1997.

Larrick J. and Thomas D. Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr. Op. Biotech.* **12**: 411-18, 2001.

Lee D., Redfern O., Orengo C. Predicting protein function from sequence and structure. *Nat. Rev. Moll. Cell. Biol.* **8**: 995-1005, 2007.

Lee Y., Nagao R.T., Lin C.Y., Key J.L. Induction and Regulation of Heat-Shock Gene Expression by an Amino Acid Analog in Soybean Seedlings. *Plant Physiol.* **110**: 241-48, 1996.

Lemmler U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-84, 1970.

Lindbo J.A. High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. *BMC Biotechnol.* **7**:52-7, 2007.

Lindquist S. The heat shock response. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 1151-79, 1986.

Lindquist S., Craig E.A. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 631-756, 1988.

Lorence A, Verpoorte R. Gene transfer and expression in plants. *Methods Mol Biol.* **267**: 329-50, 2004.

Lu R., Malcuit I., Moffet P., Ruiz M.T., Peart J., Wu A.J., Rathjen J.P., Bendahmane A., Day L., Baulcombe D.C. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance *EMBO J.* **22**: 5690-99, 2003.

Ma J., Chikwamba R, Sparrow P, Fischer R, Mahoney R, Twyman R. Plant-derived pharmaceuticals--the road forward. *Trends Plant Sci.* **10**: 580-5, 2005.

Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol.* **23**: 718-23, 2005.

Menoret A. Purification of recombinant and endogenous HSP70s. *Methods* **32**: 7-12, 2004.

Metzlaff M. RNA-mediated RNA degradation in transgene- and virus-induced gene silencing. *Biol Chem.* **383**: 1483-9, 2002.

Morshauer R.C., Wang H., Flynn G.C., Zuiderweg E.R. The peptide-binding domain of the chaperone protein Hsc70 has an unusual secondary structure topology. *Biochemistry.* **34**: 6261-6, 1995.

Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev. Immunol.* **3**: 331-41, 2003.

Nakamura Y., Oda K., Nakada S. Growth complementation of influenza virus temperature-sensitive mutants in mouse cells which express the RNA polymerase and nucleoprotein genes. *J. Biochem.* **110**: 395-401, 1991.

Neutra M.R., Frey A., Kraehenbuhl J.P. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* **86**: 345-8, 1996.

O'Dell J.T., Nagy F., Chua N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**: 810-2, 1985.

Panjwani N., Popova L., Srivastava P. Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J. Immunol.* **168**: 2997-3003, 2002.

Pashine A., Valiante N.M., Ulmer J.B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat. Med.* **11**: S63-8, 2005.

Pogue G.P., Lindbo J., Garger S., Fitzmaurice W. Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**: 45-74, 2002.

Porta C. and Lomonosoff G.P. Viruses as vectors for the expression of foreign sequences in plants. *Biotechnol. Gene.t Eng. Rev.* **19**: 245-91, 2002.

Prodromou C., Roe S.M., O'Brien R., Ladbury J.E., Piper P.W., Pearl L.H. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell.* **90**: 65-75, 1997.

Ritossa P. New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**: 571-79, 1962.

Roy C.R. Immunology: professional secrets. *Nature* **425**: 351-2, 2003.

Ryan E.J., Daly L.M., Mills K.H. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biotechnol.* **19**: 293-304, 2001.

Rüdiger S., Buchberger A., Bukau B. Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 342-9, 1997.

Sanders M.T., Brown L.E., Deliyannis G., Pearse M.J. ISCOM-based vaccines: the second decade. *Immunol. Cell. Biol.* **83**: 119-2, 2005.

Sandhu G., Precup J.W., Kline J.W., Kline B.C., Rapido ne step characerization of recombinant vectors by direct analysis of transformed *Escherichia Coli* colonies. *Biotechniques* **7**: 689-90, 1989.

Saint-Jore-Dupas C., Faye L., Gomord V. From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *Trends Biotechnol.* **25**: 317-23, 2007.

Schahs M., Strasser R., Stadlmann J., Kunert R., Rademacher T., Steinkellner H. Production of a monoclonal antibody in plants with a humanized N-glycosylation pattern. *Plant. Biotech. J.* **5**: 457-461, 2007

Segal B.H., Wang X., Dennis C.G., Youn R., Repasky E.A., Manjili M.H., Subjeck J.R. Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer *Drug. Discov. Today* **11**: 534-41, 2006.

Shankar G., Shores E., Wagner C., Mire-Sluis A. Scientific and regulatory considerations on the immunogenicity of biologics. *Tr. Biotech.* **24**: 274-80, 2006.

Sippl M.J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* **17**: 355-362, 1993.

Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 185-94, 2002, a.

Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 395-425, 2002, b

Srivastava P.K., De Leo A.B., Old L.J. Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. *Proc. Natl. Aca. Sci.* **83**: 3407-11, 1986.

Stockert R.J., Potvin B., Tao L., Stanley P., Wolkoff A.W. Human hepatoma cell mutant defective in cell surface protein trafficking. *J. Biol. Chem.* **270**: 16107-13, 1995.

Swindell W.R, Huebner M., Weber A.P. Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics.* **8**:125-36. 2007.

Sun W., Van Montagu M., Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1577**: 1 – 9, 2002.

Suto R. and Srivastava P.K. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* **269**: 1585-88, 1995.

Tavaria M. Gabriele T., Kola I., Anderson R.L. A hitchhiker's guide to the human Hsp79 family. *Cell. Stress. Chap.* **1**: 23-8, 1996.

Tsan M.F. and Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J. Leukoc. Biol.* **76**: 514-9, 2004.
Townsend A.R.M., Rothard J., Gotch F.M., Bahadur G., Wraith D., McMichael A.J. The Epitopes of Influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* **44**: 959-68, 1986.

Ulmer J.B., Valley U., Rappuoli R. Vaccine manufacturing: challenges and solutions. *Nat. Biotechnol.* **24**: 1377-83, 2006.

Vain P. Thirty years of plant transformation technology development. *Plant. Biotechnol. J.* **5**: 221-9, 2007.

Van Ginkel F.W., Jackson R.J., Yuki Y., McGhee J.R. Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *J. Immunol.* **165**: 4778-82, 2000.

Verchot-Lubicz J., and Bamunusinghe D. Molecular biology of potexviruses: recent advances. *J. Gen. Virol.* **88**: 1643-55, 2007.

Vierling E. The role of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biol.* **42**: 579-620, 1991.

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

Walsh G. and Jefferis R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat. Biotechnol.* **24**: 1241-52, 2006.

Wong C-H. Protein glycosylation: new challenges and opportunities. *J. Org. Chem.* **70**: 4219-25, 2005.

Yewdell J., Antón L.C., Bacik I., Schubert U., Snyder H.L., Bennink J.R. Generating MHC class I ligands from viral gene products. *Immunol. Rev.* **172**: 97-108, 1999.

Zhang Y. and Skolnick J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on TM-score. *Nucleic Acids Research*, **33**: 2302-09, 2005.

Yang Zhang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, **9**: 40-7 2008.

Zhu X., Zhao X., Burkholder W.F., Gragerov A., Ogata C.M., Gottesman M.E., Hendrickson W.A. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*. **72**: 1606-14, 1996.

Zuo J, Niu Q.W, Chua N.H. Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* **24**: 265-73, 2000.

