

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA
TUSCIA DI VITERBO**

Dip. di Agrobiologia & Agrochimica

**Dottorato in Genetica e Biologia Cellulare
Universita' della Tuscia
(ciclo XXIII)**

**PRODUZIONE DI ANTICORPI
RICOMBINANTI IN PIANTA PER USI
BIOFARMACEUTICI**

CANDIDATA
Margherita Pugnali

TUTOR
Dr. P. Galeffi
ENEA-Casaccia, Rome

COORDINATORE
Prof. G. Pranterà
Università della Tuscia

INDICE

OBIETTIVO DELL'ATTIVITA DI RICERCA	7
INTRODUZIONE	7
1- PIANTE COME BIOFABBRICHE	10
1.1- <i>PLANT MOLECULAR FARMING</i>	12
2- DESCRIZIONE DELLA TECNOLOGIA	15
2.1- SCELTA DEL SISTEMA PIANTA	16
2.2- TRASFORMAZIONE STABILE DELLE PIANTE	17
2.3- TRASFORMAZIONE TRANSIENTE DELLE PIANTE	20
2.4- COMPARTIMENTALIZZAZIONE MIRATA ETEROLOGHE	22
2.5- ESPRESSIONE IN COLTURE CELLULARI ED ALTRI SISTEMI	24
2.6- RIZOSECRETIONE	25
2.7- SILENZIAMENTO	27
2.8- PROTEINE PRODOTTE UN PIANTA IN FASE AVANZATA DI SPERIMENTAZIONE	27
2.9- AUTORIZZAZIONI	29
3- ANTICORPI	
3.1- STRUTTURA E FUNZIONE	31
3.2- LA TECNOLOGIA DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI	33
3.3- FRAMMENTI ANTICORPALI INGEGNERIZZATI	38
4- ANTICORPI A SINGOLA CATENA	40
4.1 STRUTTURA DEGLI scFvs	40

4.2	COSTRUZIONE ED ESPRESSIONE DEGLI scFvs	40
4.3	scFvs ESPRESSI IN PIANTA	42
5-	ONCOPROTEINA HER2, TRASDUZIONE DEL SEGNALE ED ONCOGENESI	43
5.1	LA FAMIGLIA Erb2	43
5.2	L'ANTIGENE TUMORALE HER2 E LA SUA ATTIVAZIONE	45
5.3	TRASTUZUMAB, UN ANTICORPO MONOCLONALE APPROVATO PER LA TERAPIA CONTRO IL TUMORE AL SENO	47
5.4	scFvs NELLA LOTTA AL CANCRO	49
6-	PATOGENESI DELLA MALATTIA DI ALZHEIMER	50
6.1	BASI MOLECOLARI DELLA MALATTIA	52
6.2	INDIRIZZI TERAPEUTICI ATTUALI	54
6.3	ANTICORPI NELLA LOTTA CONTRO LA MALATTIA D'ALZHEIMER	55
	INTRODUZIONE AL LAVORO SPERIMENTALE	58
7-	STRATEGIE UTILIZZATE PER LA COSTRUZIONE DEI VETTORI PLASMIDICI	59
7.1	VETTORI PER LO STUDIO D'ESPRESSIONE DEL scFv800E6	59
7.2	VETTORI PER LO STUDIO D'ESPRESSIONE DEL scFvADDLs	60
8-	STRATEGIE UTILIZZATE PER LA TRASFORMAZIONE DELLE PIANTE	61
	MATERIALI UTILIZZATI	62
	METODI	63

9- COSTRUZIONE DEI VETTORI INTERMEDI	64
9.1 COSTRUZIONE DEL PLASMIDE INTERMEDIO pUC19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS	64
9.2 COSTRUZIONE DEL PLASMIDE INTERMEDIO pUC19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS	64
9.3 COSTRUZIONE DEL PLASMIDE INTERMEDIO pUC19::LeExt1.1-SP/scFvADDLs/OCS.	66
10- COSTRUZIONE DEI VETTORI D'ESPRESSIONE DEL scFV800E6	67
10.1 VETTORE D'ESPRESSIONE pBIN19::LeExt- SP/scFv800E6/OCS	67
10.2 VETTORE D'ESPRESSIONE pBIN19::LeExt- SP/scFv800E6-EGFP/OCS	68
11- COSTRUZIONE DEI VETTORI D'ESPRESSIONE DEL scFvADDLs	69
11.1 VETTORE D'ESPRESSIONE pBINAR:: 35S - SP/SCFVADDLs/OCS	69
11.2 VETTORE D'ESPRESSIONE pBIN19::LeExt1.1 - SP/scFvADDLs/OCS	69
12- TRASFORMAZIONE E CRESCITA DI PIANTE TRANSGENICHE	69
12.1 TRASFORMAZIONE DI <i>A. TUMEFACIENS</i> GV3101 CON IL PLASMIDE: pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6/OCS	70
12.2 TRASFORMAZIONE DEI DISCHI FOGLIARI	70
12.3 TRASFERIMENTO IN COLTURA IDROPONICA	71
12.4 COLTIVAZIONE DELLE PIANTE TRANSGENICHE IN AREOPONICA	72
13- TRASFORMAZIONE E CRESCITA DI PIANTE TRANSIENTI	72
13.1 AGRIOINFILTRAZIONE DELLE PIANTE DI TABACCO	72

14-	ANALISI MOLECOLARI DEI TESSUTI FOGLIARI DI PIANTE TRANSGENICHE E TRANSIENTI	72
14.1	PIANTE TRANSGENICHE DI <i>N.TABACUM</i> E <i>SOLANUM TUBEROSUM</i> TRASFORMATE CON AGRO CONTENENTE pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6/OCS	73
14.2	PCR	73
14.3	RT-PCR	74
15-	ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA	75
15.1-	ESTRAZIONE PROTEICA DA FOGLIE E RADICI	75
15.2	CONCENTRAZIONE DELLE PROTEINE PRESENTI NEL MEZZO DI COLTURA	75
15.2-	SDS-PAGE.	75
15.3-	WESTERN BLOTTING	75
15.4-	IMMUNOPRINTING	76
	RISULTATI	77
16-	COSTRUZIONE PLASMIDI INTERMEDI	78
16.1	PLASMIDE INTERMEDIO pUC19:: LeExt1.1-SP/PHY/OCS.	78
16.2	PLASMIDE INTERMEDIO pUC19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS	79
16.3	PLASMIDE INTERMEDIO pUC19::LeExt1.1- SP/scFvADDLS/OCS	83
17-	PLASMIDI PER L'ESPRESSIONE DEL scFv800E6	84
17.1	PLASMIDE pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS.	85
17.2	PLASMIDE pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6-EGFP/OCS.	88

18- PLASMIDI PER L'ESPRESSIONE DEL scFvADDLs	89
18.1 PLASMIDE pBINAR-35S-SP/scFvADDLs/OCS	89
18.2 PLASMIDE pBIN19::LeExt1.1- SP/scFvADDLs/OCS	91
19- TRASFORMAZIONE E CRESCITA DELLE PIANTE TRANSGENICHE E TRANSIENTI PER L'ESPRESSIONE DEL scFv800E6	92
19.1 TRASFORMAZIONE DI <i>A. TUMEFACIENS</i> CON IL PLASMIDE: pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6/OCS	92
19.2 TRASFORMAZIONE E RIGENERAZIONE DI <i>N. TABACUM</i>	92
19.3 TRASFORMAZIONE E RIGENERAZIONE DI <i>SOLANUM TUBEROSUM</i> .	96
19.4 TRASFORMAZIONE DI <i>A. TUMEFACIENS</i> CON IL PLASMIDE: pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6-EGFP/OCS	97
19.5 TRASFORMAZIONE E RIGENERAZIONE DI <i>N. TABACUM</i>	97
20- TRASFORMAZIONE E CRESCITA DELLE PIANTE TRANSIENTI E TRANSGENICHE PER L'ESPRESSIONE DI scFvADDLs	98
20.1 TRASFORMAZIONE DI <i>A. TUMEFACIENS</i> CON IL VETTORE pBINAR:35S-SP/ScFvADDLs/OCS	98
20.2 TRASFORMAZIONE TRANSIENTE DELLE PIANTE DI <i>N. TABACUM</i>	99
20.3 TRASFORMAZIONE DEI DISCHI FOGLIARI DELLE PIANTE DI <i>N. TABACUM</i>	100
21- ANALISI MOLECOLARE DEI TESSUTI DI PIANTE TRANSGENICHE (scFv800E6)	100
21.1 ANALISI MOLECOLARE DEL DNA ESTRATTO DA PIANTE DI TABACCO	

	TRANSGENICHE TRASFORMATE CON AGRO CONTENENTE IL pBIN19::LeExt1.1-SP /scFv800E6-OCS	100
21.2	ANALISI MOLECOLARE PER RT-PCR	101
21.3	ANALISI MOLECOLARE PER RT_PCR DELLE PIANTE DI <i>SOLANUM</i> <i>TUBEROSUM</i> TRASFORMATE CON AGRO CONTENETE IL pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6-OCS	102
22-	ANALISI MOLECOLARI DEI TESSUTI FOGLIARI DI PIANTE TRANSIENTI (scFvADDLs)	103
22.1	ANALISI MOLECOLARE PER RT_PCR DELLE PIANTE TRANSIENTI	103
23-	ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA	104
23.1	WESTERN BLOTTING DEL scFv800E6 ESTRATTO DA PIANTE TRANSGENICHE DI <i>N. TABACUM</i> CRESCIUTE IN IDROPONICA	104
23.2	WESTERN BLOTTING DEL scFv800E6 ESTRATTO DA PIANTE DI <i>N. TABACUM</i> CRESCIUTE IN UN SISTEMA DI COLTIVAZIONE AREOPONICO	107-
23.3	WESTERN BLOTTING DEL scFv800E6 ESTRATTO DA PIANTE TRANSGENICHE DI <i>S. TUBEROSUM</i> CRESCIUTE IN UN SISTEMA DI COLTIVAZIONE AREOPONICO	107
23.4	WESTERN BLOTTING DEL scFvADDLs ESTRATTO DA PIANTE TRANSIENTI DI <i>N. TABACUM</i> CRESCIUTE IN SERRA SOTTO CONDIZIONI CONTROLLATE	109
	DISCUSSIONE	113
	BIBLIOGRAFIA	118

OBIETTIVO DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA

La richiesta di proteine per uso farmaceutico destinate all'uomo è in continuo aumento ed attualmente questi farmaci (proteine semplici o modificate) vengono prodotti in cellule di mammifero, il che garantisce la funzionalità biologica del prodotto atteso. Tuttavia, questo sistema di produzione risulta essere molto dispendioso a causa degli elevati costi di costruzione e di gestione dei fermentatori industriali necessari allo scopo. Per questo motivo altri sistemi di espressione vengono studiati e valutati e, un'ottima alternativa al sistema tradizionale è rappresentata dal sistema vegetale.

La coltivazione delle piante è più economica di un impianto industriale, l'estrazione e la purificazione dei prodotti risultano semplificate e soprattutto, visto che le piante non ospitano patogeni come virus animali o prioni, la produzione in pianta garantisce una maggior sicurezza per la salute umana. Le piante sono in grado di operare le modifiche post-traduzionali e permettono virtualmente l'espressione di qualsiasi gene e anche di più geni contemporaneamente. Esistono vari sistemi per trasformare le piante, tutti però riconducibili a due approcci principali: la trasformazione transiente e quella stabile. La prima permette una vasta resa in per tempi brevi e può essere utilizzata ad esempio per la produzione di sostanze come i farmaci personalizzati, mentre la seconda è quella d'elezione per la produzione su scala industriale.

L'uso delle piante come biofabbriche prende il nome di *Plant Molecular Farming*.

L'attività di ricerca qui riportata si inserisce in questa tematica ed in particolare l'obiettivo del lavoro sperimentale presentato era la produzione in pianta di due frammenti anticorpali a singola catena (scFvs). Un scFv, denominato scFv800E6, specifico per l'antigene tumorale HER2 (ErbB2) over-espresso nel 30% dei casi di tumore al seno, l'altro denominato scFvADDLs che risulta legare specificatamente gli oligomeri β , costituenti principali delle placche degenerative, principale causa della malattia degenerativa di Alzheimer.

Un ulteriore obiettivo del lavoro, volto a rendere la produzione di proteine ricombinanti in pianta ancora più sicura e meno costosa, era quello di indirizzare i frammenti anticorpali nell'apparato radicale per sfruttare il naturale processo di rizosecrezione delle piante, per cui un soluto che si accumula all'interno dell'apoplasto diffonde passivamente al di fuori della parete cellulare nel mezzo di crescita. Questo processo è continuo, non distruttivo, rende più facile la purificazione della proteina di interesse. Non ultimo per la produzione si possono utilizzare sistemi di coltivazione, idroponici e aeroponici, disponibili in commercio.

Per quanto riguarda il scFv800E6, sintetizzato nei laboratori dell'ENEA e già espresso con successo in batterio, in piante transienti e in piante transgeniche, il lavoro è stato focalizzato esclusivamente nello studiare il suo accumulo in radice e la sua eventuale rizosecrezione nel mezzo di crescita della pianta.

Diversamente, per l'ADDLs (Amyloid Derived Diffusible Ligands) anticorpo ottenuto dal laboratorio del Prof. A. Cattaneo, sintetizzato in

scarsa quantità esclusivamente in batterio, l'obiettivo era di verificare la possibilità di una sua espressione nel sistema vegetale per aumentarne la resa. In questo secondo caso il lavoro ha portato prima alla produzione di piante transienti, poi a quella di piante transgeniche, ed infine sono state gettate le basi per uno sviluppo futuro tramite il sistema della rizosecrezione.

I risultati ottenuti, riguardo l'800E6, dimostrano, come era stato ipotizzato, che il transgene viene correttamente espresso e la proteina da esso codificata si accumula preferenzialmente nelle radici delle piante trasformate. Delle analisi preliminari effettuate sul terreno di crescita non è stata riscontrata la presenza dell'anticorpo, forse a causa di una bassa efficienza di secrezione del sistema o perché la proteina è trattenuta e accumulata all'interno dello spazio apoplastico.

Per quanto riguarda l'ADDLs, per la prima volta è stato espresso in un sistema vegetale, il transgene è correttamente espresso in foglie di piante transienti, ed inoltre sono state ottenute plantule transgeniche la cui espressione proteica sarà analizzata prossimamente.

INTRODUZIONE

1. PIANTE COME BIOFABBRICHE

Negli ultimi anni, con lo sviluppo di nuove tecniche molecolari applicate al sistema vegetale, la produzione di molecole eterologhe in pianta ha assunto una notevole importanza sia nel campo d'interesse industriale che farmaceutico. Questo approccio, definito *plant molecular farming*, considera il sistema vegetale come una “biofabbrica” e presenta numerosi vantaggi rispetto ai sistemi convenzionali di produzione di proteine eterologhe, basati essenzialmente sull'utilizzo di colture di cellule batteriche ed eucariotiche.

La produzione di proteine ricombinanti *in planta* è molto più economica; la tecnologia ora disponibile permette una produzione su larga scala; le piante sono in grado di apportare alle proteine eterologhe prodotte le modificazioni post-traduzionali, in alcuni casi fondamentali per l'attività biologica della molecola, ed infine non essendo le piante ospiti di patogeni animali si evita il rischio di pericolose contaminazioni.

Fino ad oggi, i sistemi di produzione di molecole di interesse farmaceutico, hanno fatto essenzialmente uso di microorganismi, ne è un esempio l'*Escherichia coli*, largamente utilizzato nelle industrie per la produzione di proteine su larga scala.

Il sistema batterico ha il vantaggio di essere economico e molto flessibile, tuttavia non permette l'espressione di proteine che necessitano di modificazioni post-traduzionali tipo la glicosilazione o la formazione di ponti disolfuro, che non raramente sono necessari per il corretto “folding” e funzionamento delle proteine di interesse applicativo.

Nelle industrie è molto diffuso anche l'impiego delle cellule di lievito per l'espressione di proteine ricombinanti. In questo caso i vantaggi sono dati dalla facile propagazione delle colture cellulari, dalla grande quantità di proteina ricombinante che si riesce ad ottenere e dal corretto assemblaggio delle proteine espresse. Il maggior problema risiede nell'espressione delle proteine che hanno bisogno della glicosilazione, che in cellule di lievito non avviene correttamente.

Le colture cellulari animali, al momento, rappresentano il sistema d'elezione per la produzione di molecole complesse come gli anticorpi. Si è molto investito nello sviluppo e nell'ottimizzazione dei processi di produzione in bioreattori di cellule animali, nel tentativo di aumentare la produzione e di soddisfare la richiesta sempre maggiore di farmaci. Ciò nonostante, spesso accade che le linee cellulari di mammifero vadano incontro ad apoptosi a causa della mancanza di nutrienti chiave o di ossigeno all'interno dei fermentatori. Inoltre i costi per costruire e gestire impianti industriali di questo tipo sono molto alti, spesso proibitivi e necessitano di personale altamente formato e qualificato. Basti pensare che per allestire un bioreattore di 10.000 litri (la grandezza minima per avere una produzione su scala industriale), sono necessari dai due ai cinque anni e che esso costa tra i 250 e i 500 milioni di dollari americani.

La tecnologia degli animali transgenici per la produzione di proteine ricombinanti è un campo di ricerca aperto da vari anni. La produzione del

primo animale transgenico risale al 1985 e da subito è stata intravista la possibilità di utilizzare animali da allevamento per produrre biofarmaci. Tuttavia la produzione di un animale transgenico è notevolmente costosa e varia dai 20.000 ai 300.000 dollari americani, inoltre solo una percentuale molto bassa dei tentativi fatti per ottenere un animale transgenico ha successo, infatti, l'introduzione del transgene nel patrimonio genetico dà risultati positivi solo tra il 5 e il 25% degli animali nati vivi. Una produzione in animali transgenici ed in cellule di mammifero comporta inoltre i rischi associati alla contaminazione dei prodotti con patogeni e virus trasmissibili anche all'uomo (Tiwari et al. 2009).

Nella tabella 1 sono elencati i vantaggi e gli svantaggi relativi ai vari sistemi d'espressione analizzati:

TAB 1: Comparazione dei diversi sistemi d'espressione (Goldstein e Thomas 2004;, Ma et al. 2003; Schillberg et al. 2003).I vantaggi sono evidenziati in verde, gli svantaggi in rosso.

Costs	Bacteria	Yeast	Mammalian Cell Cultures	Transgenic Plants	Transgenic Animals	Plant cell culture	Plant viruses
Costs and Timescale							
Costs	Low	Medium	High	Low	High	Medium	Low
Storage cost	Moderate	Moderate	Expensive	Inexpensive	Expensive	Moderate (m,c)	N.sp.
Productivity	Medium	Medium	Medium	High	High	Medium	N.sp.
Timescale	Short	Medium	Medium	Controversial*	Very long	Medium	Low
Risks and Ethical Concerns							
Risks	Toxins	Low	Viruses prions	Low	Viruses prions	Low	N.sp.
Public perception of risks	Low	Medium	Medium	High	High	N.sp.	High
Safety	Low	Unknown	Medium	High	High	N.sp.	High
Contamination risks	Endotoxins	Low	Viruses, prions and oncogenic DNA	Low	Viruses, prions and oncogenic DNA	Low	N.sp.
Therapeutic risks	Yes	Unknown	Yes	Unknown	Yes	N.sp.	Unknown
Ethical concerns	Low	Low	Medium	Medium	High	Low	N.sp.
Scale-up							
Scale-up capacity	High	High	Very low	Very high	Low	Medium	N.sp.
Scale-up costs	High	High	High	Low	Medium (h,m)	High	Low

	Bacteria	Yeast	Mammalian Cell Cultures	Transgenic Plants	Transgenic Animals	Plant cell culture	Plant viruses
Technical Factors							
Gene size	Unknown	Unknown	Limited	Not limited	Limited	N.sp.	Limited
Protein yield	Medium	High	Medium-High	High	High	N.sp.	Very high
Propagation	Easy	Easy	Limited	Easy	Medium	Easy	N.sp.
Millimetres protein assembly	No	No	No	Yes	Yes	N.sp.	No
Protein folding accuracy	Low	Medium	High	High?	High	N.sp.	High?
Glycosylation	None	Incorrect	Correct	Minor differences	Correct	Minor differences	Minor differences
Product quality	Low	Medium	High	High	High	High	N.sp.
Protein homogeneity	Low	Medium	Medium	High?	High	N.sp.	Medium
Distribution	Feasible	Feasible	Difficult	Easy	Difficult	N.sp.	Easy
Data monitoring	Easy	Easy	Easy	Difficult	Difficult	Easy	N.sp.
GMP conformity	Possible	Possible	Possible	Difficult	Possible	Possible	N.sp.
Storage temp	-20°C	-20°C	Liquid nitrogen	Room temperature ^a	Liquid nitrogen	-20°C	N.sp.

Le evidenti problematiche, connesse ai sistemi di espressione tradizionali, hanno spinto la ricerca di altri sistemi di espressione, come quello dei sistemi vegetali: la pianta.

L'uso di piante transgeniche per la produzione di proteine e di altre molecole a scopi farmaceutici è un approccio che risale a circa 20 anni ed ancora oggi è considerato un campo aperto e in continua evoluzione.

1.1 PLANT MOLECULAR FARMING

Il Plant molecular farming (PM farming) inizia alla fine degli anni '80. Il 2 Novembre del 1989 la copertina di Nature presenta l'immagine di un topo e di una pianta, e la rivista annuncia per la prima volta la sintesi e la corretta espressione di un anticorpo IgG murino in piante transgeniche di *Nicotiana tabacum*. Questo risultato ottenuto da A. Hiatt e dai suoi collaboratori presso i laboratori della Scripps (Hiatt et al., 1989) in realtà fu la seconda pubblicazione in tal senso, infatti, già nel 1986, era stato espresso correttamente in piante di tabacco l'ormone della crescita umano (Barta *et al.*, 1986).

Da quel momento, numerose proteine sono state espresse in pianta, dal 1992, data della produzione della prima subunità vaccinica in pianta (Mason et al., 1992), sono stati pubblicati circa 800 articoli scientifici (Plant Biotechnology Journal, 2010), vedi fig 1, e depositati nel mondo circa 100 brevetti (Thangaraj et al., 2009) su questa tematica.

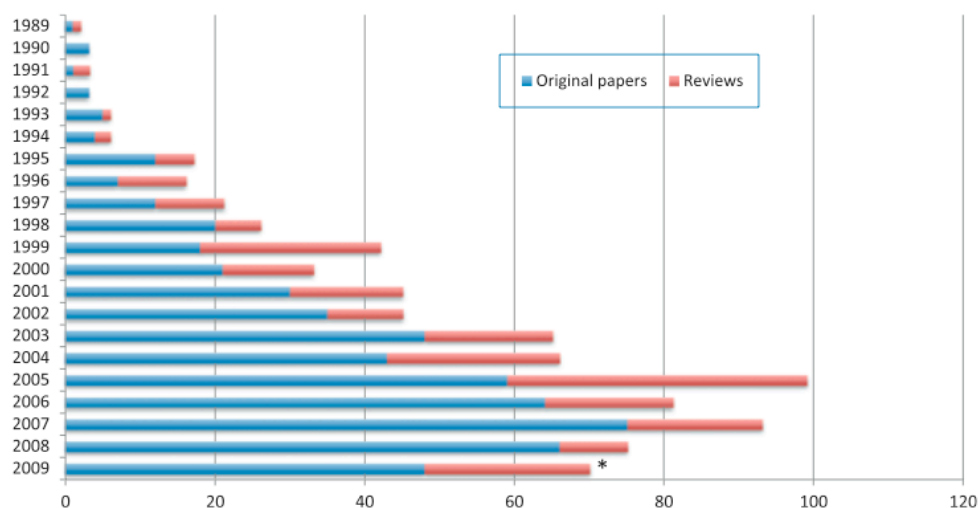


FIG 1: Articoli correlati al plant molecular farming pubblicati negli ultimi vent'anni (PBJ, 2010)

Di seguito è riportata una tabella che mostra la notevole quantità di farmaci prodotti con successo in pianta nel corso degli anni.

TAB 2: Biofarmaci e vaccini ricombinanti espressi in pianta (tratta da Biotecnologie per la produzione di biofarmaci Galeffi et al., 2009)

Biofarmaci per uso umano espressi in pianta		
Biofarmaco	Applicazioni	Pianta ospite
Human growth hormone	Growth hormone	Tobacco, Sunflower
Enkephalin	Antihyperanalgesic by opiate activity	Arabidopsis
Human serum albumin	Liver cirrhosis, burns, surgery	Tobacco, Potato
Human β -interferon	Antiviral treatment	Tobacco
Angiotensin-I-converting enzyme	Hypertension	Tobacco, Tomato
Human epidermal growth factor	Wound repair and control of cell proliferation	Tobacco
α -trichosanthin from TMV-U1 subgenomic coat protein	HIV therapies	Benthamiana
Trout growth factor	Growth factor	Tobacco
Human α -interferon	Hepatitis C and B treatment	Rice
Hirudin	Thrombin inhibitor	Canola
Erythropoietin	Anaemia	Tobacco Suspension cells
Glucocerebrosidase, human protein C serum protease	Anticoagulant	Tobacco
Human α and β haemoglobin	Blood substitute	Tobacco
Human muscarinic cholinergic receptors	Cell receptors	Tobacco
Interleukin-2 and Interleukin-4	Immune regulation	Tobacco Suspension cells
Human placental alkaline phosphatase	Reporter gene	Tobacco Rhizosecretion
Human α 1-antitrypsin	Cystic fibrosis, liver disease and haemorrhage	Rice Suspension cells
Human growth hormone (somatotrophin)	Growth hormone	Tobacco Seeds
Human growth hormone (somatotrophin)	Growth hormone	Tobacco Chloroplasts
Human homotrimeric collagen	Collagen	Tobacco
Human lactoferrin	Antimicrobial	Potato
scFv	Oxazolone	Potato tuber, ER
IgG1	HSV-2	Glycine max Plant, Secretory pathway
scFv	Dihydro-flavonol 4-reductase	P.hybrida Leaf, Cytosol
IgG	Colon cancer surface antigen	Benthamiana
IgG	HSV-2	Soybean
IgG	Human IgG	Alfa Plant, Apoplast
ScFv, IgG1	CEA	Tobacco Leaf, Transient expression
scFv	Tospoviruses	Benthamiana Plant, ER, Apoplast
bi-scFv	TMV	Tobacco Suspension cells, Leaf, Apoplast, ER
scFv	CEA	Rice Suspension cells, Leaf, ER and Apoplast
scFv	38C13 mouse B cell lymphoma	Benthamiana Leaf, Apoplast
scFv	CEA	Bread wheat Plant, ER and Apoplast
scFv	TMV	Tobacco Leaf, Apoplast and Membrane
IgG1	Streptococcal surface antigen (I/II)	Tobacco Plasma membrane
scFv	Chlorophoram	Arabidopsis ER, Apoplast

Vaccini ricombinanti espressi in pianta		
Vaccino	Applicazioni	Pianta ospite
Envelope surface protein	Hepatitis B virus (humans)	Tobacco, Potato, Lupin (<i>Lupinus spp.</i>), Lettuce
Heat-labile toxin B-subunit	Enterotoxigenic <i>E.coli</i> (humans)	Tobacco, Potato, Maize
Glycoprotein	Rabies virus (humans)	Tomato (expressed on virus particles)
Malarial B-cell epitope	Malaria (humans)	Tobacco
Capsid protein	Norwalk virus	Tobacco, Potato
Hemagglutinin	Influenza	Tobacco
<i>V.cholerae</i> toxin CtxA and CtxB subunits	<i>Vibrio cholerae</i> (humans)	Potato
Mink enteritis virus epitope (VP2)	Resistance to mink enteritis virus (domestic animals)	Blackeyed bean
VP1	Foot-and-mouth disease virus (agric.domestic animals)	Arabidopsis, Alfalfa
Glycoprotein S	Transmissible gastroenteritis coronavirus (pigs)	Arabidopsis, Maize, Tobacco
<i>E.coli</i> Lt-B toxin	Enterotoxigenic <i>E.coli</i> (humans)	Potato
<i>Streptococcus mutans</i> surface protein SpaA	Dental caries (humans)	Tobacco, Potato
VP60	Rabbit hemorrhagic disease virus (rabbit)	Potato
Glycoprotein B	Human cytomegalovirus (humans)	Tobacco
D2 peptide of fibronectin-binding protein of <i>Staphylococcus aureus</i>	Mucosal vaccine not requiring adjuvants (human)	Cow-pea
Peptides 10 and 18 OMP-FP.auruginosa	Pulmonary infections	Cow-pea
Diabetes associated autoantigen	Diabetes	Tobacco, Carrot, Potato
Human rhinovirus epitope (HR14)	Rhinovirus	Blackeyed bean (Expressed on virus particles)
HIV epitopes	HIV	Tobacco, Cow-pea, Blackeyed bean

Lo stato dell'arte raggiunto per le proteine ricombinanti espresse in pianta deriva essenzialmente dagli enormi vantaggi che offre il sistema vegetale per l'espressione di molecole biofarmaco. L'utilizzo delle piante per la produzione di proteine eterologhe teoricamente non presenta alcuna restrizione sul tipo di proteina che può essere espressa, infatti, il sistema pianta garantisce la sintesi di molecole proteiche, con caratteristiche strutturali e funzionali sostanzialmente indistinguibili dai loro equivalenti naturali di origine murina o umana. Le piante sono in grado di operare l'acetilazione, la fosforilazione, la glicosilazione e le altre modifiche post-traduzionali spesso necessarie per la corretta attività biologica di molte proteine di origine eucariotica. Nelle piante possono essere prodotti vaccini, proteine del siero, fattori di crescita ed enzimi, anche se spesso questi ultimi per funzionare in modo corretto necessitano di cofattori che non possono essere prodotti dalla maggior parte dei sistemi di espressione. In questo ambito, un'altra classe di proteine importanti è costituita dagli anticorpi: le piante rappresentano un sistema vantaggioso per la loro produzione e la ricerca e sviluppo in questo campo rimane di stringente attualità.

Altri vantaggi che il sistema vegetale offre, come già accennato, sono: un minor costo di produzione, un minor costo di purificazione della molecola prodotta e l'assenza di patogeni dannosi per l'uomo.

Giddings (2001) stima una riduzione della spesa compresa tra l'80% e il 98% nella produzione di proteine ricombinanti in pianta rispetto ai sistemi tradizionali di fermentazione microbica e del 99,9% se paragonata alla produzione ottenuta da colture cellulari di mammifero. Tali valori dipendono comunque dai livelli di espressione della proteina e dai sistemi utilizzati per la purificazione della proteina stessa.

Il minor costo di produzione in pianta è ampiamente documentato in letteratura (Dove 2002; Giddings 2001; Kusanadi *et al.* 1997; Seon *et al.* 2002), e una stima realistica ottenuta confrontando i dati riportati da diversi autori, è sintetizzata nella tabella di Spok et Karner, 2008.

TAB 3: Costi di produzione utilizzando diverse piattaforme d'espressione

Production platform	Estimated costs [€ per g] ^a	
	Upstream	Including downstream
Yeast	77	n.sp.
Mammalian cell culture	40-1,538	550-5,100
Transgenic plants	8-160	24-1,300
Transgenic animals	1-77	45-548

Nella tabella 3 è stata fatta una distinzione tra i costi di produzione prima (upstream) e dopo (including downstream) la purificazione della molecola prodotta. La purificazione delle proteine è un processo molto costoso indipendentemente dal mezzo di produzione, tuttavia nel caso delle piante esistono diverse strategie che, se adottate ed ottimizzate permetterebbero di abbattere notevolmente tali costi. Una strategia potrebbe essere l'accumulo delle proteine nell'endosperma dei semi, dal quale le proteine possono essere lungamente conservate e facilmente estratte (Wright et al., 2001), un'altra, molto attuale, è la produzione dei biofarmaci dagli essudati radicali di piante transgeniche coltivate in sistemi idroponici.

Non ultimo, nel caso in cui si utilizzino per l'espressione piante eduli, la proteina può non essere estratta dai tessuti, ma potrebbe essere somministrata direttamente ai pazienti subito dopo semplici processi di controllo della concentrazione e dosaggio nella pianta/frutto produttore "ad hoc" del biofarmaco.

Il principale vantaggio della produzione in pianta è comunque rappresentato dalla sicurezza sanitaria dei prodotti. Le linee cellulari di mammifero possono ospitare virus e prioni, mentre i microbi possono essere contaminati da batteri patogeni e funghi che possono dare origine a endotossine. Al contrario, a tutt'oggi non si conoscono virus vegetali che possano minare la salute umana (Commandeur et al., 2003). Ciò non toglie che in caso di coltivazioni in campo aperto, diversi agenti patogeni, come il virus dell'epatite A (HAV), il Minute Virus of Mice (MVM) o il virus dell'influenza aviaria, potrebbero contaminare la biomassa attraverso il contatto con escrementi di uccelli, carcasse o fertilizzanti già contaminati.

Per ovviare a tale problema, le linee guida EMEA 2006 (European Medicines Agency), suggeriscono l'utilizzo di sistemi a contenimento totale, come le colture idro e/o aeroponiche o le colture cellulari vegetali.

2. DESCRIZIONE DELLA TECNOLOGIA

2.1 SCELTA DELLA PIANTA

Numerose specie vegetali possono essere utilizzate per il Plant Molecular Farming (PMF), tra queste le piante di alfalfa, *Arabidopsis*, banana, carota, lattuga, mais, lino, piselli, arachidi, patata, riso, spinaci, soia, barbabietola da zucchero, canna da zucchero, tabacco, pomodoro, grano (Twyman et al. 2005; Twyman 2004).

Ai fini della coltivazione nel PMF, queste piante possono essere suddivise in piante con seme secco (tipo i cereali e le leguminose da granella), piante da foglia, piante da frutta, ortaggi e piante ricche di fibra e oleose. La scelta della pianta dipende da un'attenta analisi e comparazione dei vantaggi e degli svantaggi legati alle caratteristiche genetiche, fisiologiche e specifiche che essa stessa presenta.

Le piante da foglia, come il tabacco, sono favorevoli in termini di biomassa e quindi di produzione, tuttavia le proteine essendo sintetizzate in un tessuto ricco d'acqua (la foglia) sono più facilmente soggette a degradazione. Gli alti rendimenti quindi, possono essere raggiunti solo se il materiale è prontamente congelato o liofilizzato, in modo particolare durante il trasporto, lo stoccaggio e il momento dell'estrazione/purificazione prima dell'uso.

Al contrario di quanto accade nella produzione in foglia, l'espressione di proteine in seme permette la loro conservazione per tempi più lunghi anche a temperatura ambiente, in quanto all'interno del seme è presente, fisiologicamente, un microambiente che consente l'accumulo proteico stabile. E' stato dimostrato che anticorpi espressi in semi conservati a temperatura ambiente conservano la loro attività per un periodo di almeno tre anni (Stöger et al., 2000). In genere però le rese ottenute nelle specie da seme sono molto più basse che nel tabacco. L'espressione in seme riduce anche il rischio di contatto con erbivori e micro-organismi, anche se i tempi di realizzazione e produzione sono estremamente più dilatati perché le piante transgeniche devono necessariamente attraversare il ciclo della fioritura prima di poter generare semi. I cereali (riso, grano e mais) e i legumi, come il pisello e la soia, sono stati utilizzati per una produzione di questo tipo. Il riso, il grano, il pisello e il tabacco sono stati confrontati per l'espressione dello stesso anticorpo ricombinante a singola catena (Stöger et al., 2002) e, sorprendentemente, le piante di riso esibivano la resa più alta per unità di biomassa.

Proteine espresse negli ortaggi o nella frutta, presentano il vantaggio di poter essere assunte direttamente, senza una precedente cottura, ne sono un esempio le banane, i pomodori, le patate. Infine, un ultimo sistema d'espressione riguarda l'utilizzo di piante oleose e ricche di fibra, come il lino, il cotone e la colza che avrebbero il vantaggio di essere piante "non-food" e dunque a rischio zero di incrocio naturale e spontaneo in coltivazioni utilizzate per la produzione alimentare. Di seguito è riportata una breve descrizione delle colture utilizzate più frequentemente in *Plant Molecular Farming*.

Tabacco

Il tabacco è utilizzato da diversi anni con successo nel “molecular farming” ed è il miglior candidato per la produzione commerciale di proteine ricombinanti (Stöger et al., 2002). I vantaggi dell’uso del tabacco sono rappresentati dalla tecnologia ben consolidata della trasformazione e dell’espressione di geni esogeni in questa pianta, un’alta resa in termini di biomassa, un’alta produzione di semi, e l’esistenza di infrastrutture per la sua coltivazione su vasta scala. Il fatto che il tabacco non sia una pianta utilizzata per l’alimentazione umana o degli animali riduce i rischi di contaminazione delle catene alimentari.

Mais

Il mais è facile da trasformare e da utilizzare in laboratorio, presenta una resa in biomassa superiore a quella di altri cereali, inoltre è una specie molto semplice da coltivare.

In termini di costi di produzione ed efficienza è considerato da molti produttori il miglior sistema di produzione disponibile per l’espressione di proteine in pianta.

Il mais è stato scelto dalla Prodigene (<http://www.prodigene.com>) come pianta per la produzione commerciale di vaccini e prodotti terapeutici ed è stato anche utilizzato per la produzione commerciale di anticorpi per uso umano, di avidina ricombinante e di β -glucoronidasi (Hood et al., 2002; Hood et al., 1997; Witcher et al., 1998).

Riso

Come il mais, il riso è tra i cereali la specie più semplice da trasformare e da manipolare in laboratorio e coltivazioni su larga scala sono facilmente allestite. Rispetto al mais però presenta una resa minore e i costi di produzione sono significativamente più alti.

2.2 TRASFORMAZIONE STABILE DELLE PIANTE.

I metodi utilizzati per introdurre in modo stabile il gene eterologo all’interno del DNA della pianta sono essenzialmente due: l’infezione di dischi fogliari con *Agrobacterium tumefaciens* trasformato con il gene d’interesse; il bombardamento di tessuti vegetali con microproiettili rivestiti di DNA contenente il gene d’interesse (metodo bio-balistici).

Entrambi i metodi presentano vantaggi e svantaggi e la scelta del metodo dipende essenzialmente dalla pianta da trasformare.

Il metodo più utilizzato per la trasformazione genetica di piante dicotiledoni prevede l’uso di una forma ingegnerizzata di *A. tumefaciens*, (c e Mozo, 1994) che permette di ottenere un’inserzione genomica casuale e stabile del DNA esogeno.

Tale batterio è normalmente in grado di infettare numerose piante alle quali provoca tumori noti col nome di “galla del colletto”, visibili generalmente nella zona tra fusto e radice. L’infezione si stabilisce in seguito a ferite accidentali delle pianta.

La formazione del tumore è generata dalla presenza di una specifica

sequenza di DNA presente nel plasmide Ti (*tumor-inducing*) del batterio. Tale regione detta T-DNA (*transferred DNA*) è in grado di duplicarsi e inserirsi nel genoma dell'ospite durante il processo d'infezione inducendo l'espressione delle opine ed una elevata quantità di ormoni come auxine e citochine.

Le cellule vegetali danneggiate liberano composti fenolici, come l'acetosiringone, che attivano nel batterio i geni vir (*virulence*), localizzati sempre sul plasmide Ti. I geni vir sono necessari per la produzione di proteine cis-regolatrici responsabili della trasformazione. In seguito all'attivazione dei geni vir l'elemento del T-DNA viene escisso dal DNA plasmidico. Il T-DNA è fiancheggiato da sequenze lunghe rispettivamente 25 coppie di basi che vengono denominate "right" e "left borders" (confini destro e sinistro) del T-DNA. L'escissione è un processo a due fasi: nella prima si ha il taglio a livello del confine destro e nella seconda al confine sinistro, il risultato di questo processo è il rilascio del T-DNA a singolo filamento. Il processo di trasferimento di questo frammento nel DNA della cellula vegetale è molto simile alla coniugazione batterica. Una volta all'interno della cellula al T-DNA non rimane che entrare nel nucleo e integrarsi col DNA cellulare in un sito casuale, di solito in copie multiple. La maggior parte dei geni localizzati nella regione del T-DNA è attivata solo dopo che il T-DNA è stato inserito nel genoma della pianta. La figura 2 illustra schematicamente il processo d'infezione.

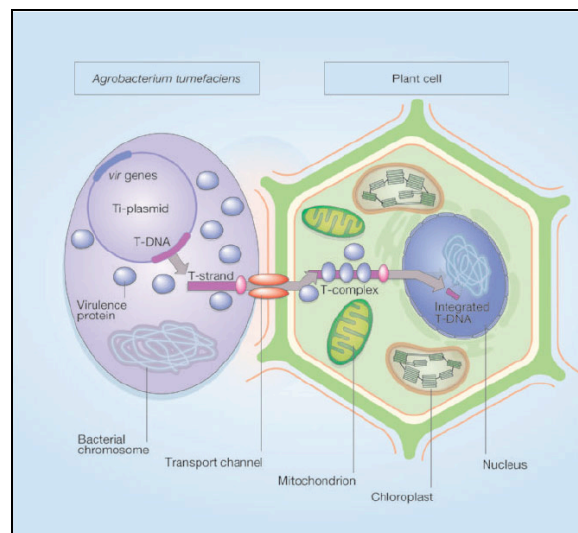


Figura 2: Infezione da *Agrobacterium tumefaciens*.

Sulla sinistra una cellula batterica che trasferisce il T-DNA a singolo filamento in una cellula vegetale (a destra).

Fonte: <http://www.nature.com>

Grazie alla tecnologia del DNA ricombinante, il plasmide T è stato convertito in un efficiente vettore per la trasformazione delle piante, i geni che inducono il tumore sono stati rimossi e al loro posto è stato inserito un sito multiplo di clonaggio.

Dal momento che il plasmide Ti è molto grande (200 Kb) ed è quindi molto difficile da manipolare sono stati sviluppati i cosiddetti vettori binari (

Bevan et al., 1984). In questo caso nell'agrobatterio sono presenti due vettori, uno contenente la regione T-DNA disarmata e i geni vir necessari per il trasferimento, e uno con le regioni LB ed RB, la sequenza d'interesse e un'origine di replicazione riconosciuta sia in *E.coli* che in *A.tumefaciens*. Per trasformare una pianta con *A. tumefaciens*, è quindi necessario un vettore binario contenente, tra le sequenze LB ed RB, un promotore, la sequenza genica d'interesse e una sequenza terminatrice della trascrizione.

Inoltre, è generalmente presente un gene marcatore completo di sequenze promotrici e di terminazione che consente di distinguere e far rigenerare solo le cellule trasformate.

La trasformazione genetica consiste in una co-cultura degli espianti della pianta con l'agrobatterio contenente il plasmide d'interesse. Successivamente i tessuti vegetali vengono fatti rigenerare su un substrato contenente sia l'antibiotico di selezione, sia gli ormoni necessari per la crescita delle cellule trasformate.

I plasmidi maggiormente utilizzati nella trasformazione stabile delle piante sono quelli che derivano da pMON e da pBIN19.

pBin19 (Bevan, 1984) è uno dei vettori binari più diffusi nel campo delle biotecnologie vegetali; è un plasmide a basso numero di copie di circa 11 kb, deriva dal plasmide a largo spettro d'ospite pRK252, del quale sono state mantenute le origini di replicazione e coniugazione per permettere la replicazione sia in *Escherichia coli* che in *Agrobacterium*. Al plasmide pRK252, derivato a sua volta dal pRK2, sono stati aggiunti il gene per la resistenza alla Kanamicina e un sito di clonaggio multiplo derivato da M13, contenente la sequenza genica che codifica per il frammento alfa di complementarità alla beta-galattosidasi (che permette la selezione bianco-blu). Il vettore contiene due geni per la resistenza alla Kanamicina, uno responsabile della resistenza in *E.coli* (NTPIII) e uno che svolge lo stesso ruolo nelle cellule vegetali trasformate (NPTII). La differenza nell'espressione di questi due geni è da ricercarsi nel loro promotore: mentre i geni di resistenza batterici sono sotto il controllo di promotori procariotici, quelli che risiedono sul T-DNA che sarà trasferito ed integrato nel genoma della pianta sono controllati da promotori eucariotici forti. Inoltre sono necessarie le regioni di regolazione dell'espressione eucariotica, come quella di poliadenilazione fornita dal terminatore della nopalina sintetasi.

Il sistema di trasformazione biolistico è meno genotipo-dipendente rispetto al precedente e rimane il metodo più utilizzato per la trasformazione di cereali, come il riso, il frumento e il mais e di leguminose come ad esempio la soia.

La tecnica si basa sull'utilizzo di microproiettili di oro o tungsteno del diametro di 0.4-1,2 μm , rivestiti con il DNA plasmidico d'interesse mediante precipitazione con CaCl_2 , spermidina o glicole-poli-etilenico.

Questi microproiettili vengono accelerati contro le cellule vegetali, ad una velocità sufficientemente alta da superare, senza danneggiare la parete e la membrana cellulare (Sanford, 1990).

Il bombardamento con particelle è utilizzato anche per la trasformazione del genoma di plastidi.

La trasformazione plastidiale è una tecnica descritta da molti autori (Maliga, 2004; Daniell, 1993), tuttavia le caratteristiche strutturali e metaboliche dei

plastidi comportano un aumento delle difficoltà in tutte le fasi della trasformazione (Heifetz, 2000). Fino ad oggi solo pochi protocolli sono disponibili e per un numero limitato di specie vegetali quali tabacco, patata, riso e pomodoro. I vantaggi che questo sistema offre sono: un aumento del grado di espressione della proteina di interesse di circa 10 volte rispetto alla trasformazione nucleare; il sequestro della proteina nel plastide; l'assenza di effetti di posizione in quanto l'integrazione nel genoma plastidiale è sito-specifica; l'assenza di trasmissione indesiderata del transgene nel polline in quanto i plastidi sono ereditati per via materna. Quest'ultimo vantaggio è di notevole importanza perché favorendo il contenimento genico, riduce il problema dell'impatto ambientale delle piante transgeniche, (Daniell *et al.*, 2002).

Tra i limiti della trasformazione plastidiale rientrano alcune modifiche post-traduzionali come la glicosilazione e la miristilazione, che non avvengono nei plastidi per la mancanza degli enzimi necessari,

Sia la trasformazione mediata da *A. tumefaciens* che quella con il metodo biolistico, richiedono la rigenerazione dei tessuti vegetali *in vitro*. La rigenerazione comporta tempi lunghi che variano secondo la specie trasformata e considerevoli costi per il mantenimento delle piante *in vitro*, prima che l'espressione delle proteine possa essere analizzata (Fischer e Emans, 2000).

2.3 TRASFORMAZIONE TRANSIENTE DELLE PIANTE.

I sistemi transienti introducono una sequenza genica nella cellula vegetale senza che ne avvenga l'integrazione nel genoma. Il metodo di trasformazione transiente, in passato era utilizzato essenzialmente per testare l'efficacia di una cassetta di espressione oppure per produrre piccole quantità di proteine. Oggi la messa a punto di nuove strategie, tra cui l'utilizzo di nuovi promotori (Venzina *et al.*, 2009), rende questa tecnica molto più efficiente e le piante transienti sono usate non soltanto per esperimenti preliminari, ma anche per la produzione su larga scala. Ne sono esempio, la produzione del vaccino per il trattamento del linfoma non_Hodgkin's, approvato dalla FDA e ottenuto mediante espressione transiente (McCormick *et al.*, 2008) e il vaccino contro il virus pandemico H5N1, ora in fase I di sperimentazione, che mette in evidenza l'importanza della trasformazione transiente, rapida e veloce, in caso di emergenze sanitarie di questo tipo (D'Aoust *et al.*, 2010).

La trasformazione transiente può essere eseguita in tre diversi modi: il bombardamento mediante il metodo biolistico; l'infezione dei tessuti vegetali tramite vettori virali modificati; l'infiltrazione dei tessuti vegetali intatti mediante agrobatterio (agroinfiltrazione). Inoltre dopo la trasformazione non è richiesta la rigenerazione dei tessuti e l'espressione della proteina d'interesse è ampia e veloce (Fisher *et al.*, 1999) tanto che il risultato della trasformazione può essere analizzato entro pochi giorni (Kapila *et al.*, 1997)

Tra i metodi sopra elencati il metodo biolistico è il meno utilizzato, perché

raggiunge poche cellule e la trascrizione è limitata (Christou, 1993).

I vettori virali, al contrario, infettano sistemicamente molte cellule e permettono un'espressione delle proteine eterologhe maggiore, rispetto a quella che si ottiene in piante trasformate in maniera stabile. L'espressione della proteina in genere è ottenibile in tempi brevi, anche poche settimane; la resa è alta, grazie ai meccanismi d'infezione virale capaci di attivare la trascrizione e la traduzione prima dell'instaurarsi dei meccanismi di silenziamento da parte della pianta.

I vettori virali più utilizzati nelle biotecnologie vegetali sono vettori derivanti da virus opportunamente modificati come il TMV (*Tobacco mosaic virus*) e il PVX (virus X della patata (Donson et al., 1991; Chapman et al., 1992), il WSMV (virus del mosaico screziato del grano), il CIYVV (virus delle venature gialle del trifoglio), l'AIMV (il virus del mosaico dell'alfalfa), lo ZYMV (il potyvirus del mosaico giallo delle zucchine) e il BeYDV (il virus del fagiolo giallo nano) (Choi et al., 2000; Masuta et al., 2000; Yusibov et al., 1997; Arazi et al., 2001; Mor et al., 2003). I virus TMX e PVX sono quelli più ampiamente utilizzati. Sono virus a RNA a singolo filamento positivo che si replicano al di fuori del cromosoma, si spostano rapidamente da cellula a cellula e sono in grado di reindirizzare la sintesi proteica dell'ospite verso una massiccia produzione delle proteine virus-specifiche.

Un' ulteriore tecnica che permette di infettare un elevato numero di cellule è la tecnica di agroinfiltrazione con agrobatterio. Sono disponibili due strategie per la trasformazione transiente mediata da agrobatterio.

La prima strategia, descritta da Kapila e suoi collaboratori (1997), si basa sull'utilizzo di acetosiringone per l'induzione della sospensione batterica, che in seguito viene messa in contatto con i tessuti vegetali per alcuni minuti. L'altra metodica descritta da Voinnet *et al.* (2003), consiste nell'infiltrare con una siringa all'interno dei vasi della pianta la soluzione contenente l'agrobatterio introducendo così direttamente il batterio a contatto con le cellule dell'epidermide delle foglie.

Il sistema di agroinfiltrazione, pur non innescando un'espressione sistemica come nel caso dei vettori virali, presenta diversi vantaggi, primo tra tutti la capacità di veicolare geni estranei relativamente lunghi (>2 kb), che nei virus sono generalmente più instabili. Inoltre *Agrobacterium* può introdurre nella pianta diversi geni simultaneamente: questo è utile nel caso degli anticorpi completi, in cui la proteina da esprimere è composta di diverse catene polipeptidiche. (Vaquero et al., 1999). La tecnica tuttavia presenta il grande limite del declino dei livelli d'espressione del transgene dopo un periodo di appena 60-72 ore, probabilmente causato dall'instaurarsi di diversi meccanismi di difesa della pianta, come ad esempio il silenziamento genico.

Comunque diversi lavori scientifici riportano il successo dell'espressione transiente di proteine mediante agroinfiltrazione ad esempio l'espressione della proteina S1 del virus SARS fusa alla GFP (Li *et al.*, 2006) e l'espressione del gene *gag* e della sequenza corrispondente alla subunità p24 (Meyers *et al.*, 2005), in entrambi i casi sono stati ottenuti buoni livelli di produzione. Altri lavori relativi a studi di espressione transiente riguardano il gene *gus* ed il gene della *gfp* (Wydro *et al.*, 2006; Lee e Yang, 2006; Joh *et al.*, 2005) analizzati come geni reporter e sistemi modello.

2.4 COMPARTIMENTALIZZAZIONE MIRATA DELLE PROTEINE ETEROLOGHE.

Le proteine ricombinanti prodotte in pianta, possono essere indirizzate e quindi accumulate in specifici compartimenti: il reticolo endoplasmatico (ER), l'apparato di Golgi (G), il vacuolo (V), i corpi oleosi (OB), i cloroplasti (C), il nucleo (N), la membrana plasmatica (PM), lo spazio extracellulare (ES), il compartimento prevacuolare (PVC).

L'indirizzamento in comparti subcellulari è un sistema generale per aumentare l'efficienza della produzione. La natura del compartimento cellulare in cui la proteina si accumula influenza il corretto ripiegamento (folding), l'assemblaggio e le modifiche post-traduzionali alle quali sarà soggetta.

Nel caso delle immunoglobuline intere e degli anticorpi a singola catena, diversi studi hanno dimostrato che per garantire il corretto *folding*, la via secretoria è preferibile all'accumulo nel citosol (Zimmermann et al., 1998; Schilliberg et al., 1999)

All'interno del reticolo endoplasmatico (ER) è presente un ambiente ossidante, con molte chaperonine e poche proteasi, indirizzare la molecola verso questo compartimento è essenziale nel caso in cui la glicosilazione o la formazione dei ponti disolfuro siano necessari per una corretta funzione biologica. Il livello di espressione di un anticorpo, che necessita di ponti disolfuro per un corretto folding, può essere aumentato dalle due alle dieci volte se esso viene indirizzato nel lume del reticolo endoplasmico tramite il legame con il tetrapeptide H/KDEL alla sua estremità carbossiterminale (Conrad and Fiedler, 1998).

Molto vantaggioso è anche l'accumulo proteico nei corpi oleosi, che sono circondati da una proteina idrofobica denominata oleosina (15-26 kDa) (Huang, 1996; Murphy, 1993) che conferisce loro stabilità strutturale e presenta un sito di riconoscimento per il legame con la lipasi. La piccola taglia dell'oleosina la rende un trasportatore ideale di proteine. Infatti, quando una proteina viene fusa con l'oleosina e la β -glucuronidasi ed è espressa in piante transgeniche, questa viene correttamente accumulata in maniera stabile nei corpi oleosi (Hsieh and Huang, 2004; van Rooijen *et al.*, 1995). I corpi oleosi sono presenti in molti tessuti tra i quali i semi, il polline e i frutti ma soprattutto sono presenti nei semi oleosi, (Huang, 1996; Huang, 1992; Ting *et al.*, 1998; Vance and Huang, 1987; Wu *et al.*, 1997). La fusione della proteina eterologa con l'oleosina, permette non solo un buon accumulo, ma anche una più facile purificazione in quanto i corpi oleosi possono essere facilmente separati dalle altre componenti cellulari (van Rooijen *et al.*, 1995). Grazie a questa strategia di espressione sono state prodotte numerose proteine farmaceutiche, ad esempio anticoagulanti, in semi di *Brassica napus* (Boothe *et al.*, 1997; Murphy, 1990; Tzen *et al.*, 1997) e *Brassica carinata* (Chaudhary *et al.*, 1998).

Alti livelli di espressione sono stati ottenuti anche nei casi in cui i transgeni siano stati inseriti nel genoma dei cloroplasti piuttosto che in quello della pianta (Daniell et al., 2002). Il primo lavoro in cui è riportata la trasformazione di plastidi di piante di *N. tabacum* risale al 1990 (Svab et al., 1990). In tale lavoro gli autori definiscono pianta "transplastomica" una pianta trasformata geneticamente a livello del cloroplasto.

La trasformazione dei cloroplasti, in cui il tratto transgenico acquisito è trasmesso attraverso ereditarietà materna, ha come risultato delle piante transgeniche somatiche, e per questo motivo non può esattamente essere annoverata tra le tecniche di trasformazione stabile. I cloroplasti mancano inoltre dei sistemi di silenziamento a cui sono sottoposti i transgeni introdotti nel nucleo.

Questa tecnologia presenta i vantaggi derivanti dalle alte rese in proteine espresse e quelli dovuti al “contenimento genico”, infatti, grazie all’ereditarietà esclusivamente materna, la propagazione del transgene non può avvenire attraverso il polline (Arlen *et al.*, 2007; Daniell *et al.*, 2002). Tuttavia, negli ultimi anni, in seguito alla scoperta che il trasferimento genico orizzontale dai cloroplasti al nucleo è un processo più attivo di quanto ipotizzato, è nata una controversia che ha messo in discussione il concetto di “contenimento genico” (Huang *et al.*, 2003; Stegemann *et al.*, 2003).

In genere la trasformazione dei cloroplasti è effettuata con il metodo biolistico (Daniell, 1993). Pur essendo state prodotte in questo modo numerose proteine eterologhe, questo approccio ai fini del molecular farming rimane però limitato dall’impossibilità dei cloroplasti di operare molte modifiche post-traduzionali.

Un’ipotesi alternativa è l’introduzione del transgene nel genoma nucleare con un segnale peptidico che però indirizzi specificatamente la proteina ricombinante all’interno del cloroplasto. In questo modo è stato espresso con successo un anticorpo camelide a catena pesante (*camelid heavy chain antibody*) in piante di patata. (Jobling *et al.*, 2003).

Le proteine eterologhe, posso essere indirizzate nei compartimenti cellulari oppure entrare nel percorso secretorio ed essere accumulate negli spazi extracellulari. Questa metodologia rappresenta una strategia molto efficiente per l’accumulo e la purificazione delle proteine prodotte. In passato, la parete cellulare era considerata una barriera, che consentiva la secrezione solo di proteine con peso molecolare inferiore a 30 kDa (Carpita *et al.*, 1979; Fischer *et al.*, 1999).

Recentemente è stato dimostrato che una proteina umana lisosomiale di 80 kDa, sotto il controllo del promotore costitutivo 35SCaMV e di un peptide segnale di origine vegetale, viene espressa e secreta nel mezzo di crescita di piante transgeniche di tabacco in maniera funzionale (Fu *et al.*, 2008, “personal communication Miao *et al.*, 2008).

Nonostante i tanti approcci esistenti per indirizzare le proteine eterologhe in specifici compartimenti subcellulari, è stato dimostrato che le proteine non sempre si ritrovano dove sono indirizzate. Recenti lavori mostrano che spesso proteine eterologhe indirizzate verso compartimenti subcellulari tramite promotori e peptidi segnale specifici, sono state trovate anche in compartimenti subcellulari inaspettati (Petrucelli *et al.*, 2006; De Muynck *et al.*, 2009) Concludendo, la possibilità di accumulare una proteina eterologa in un compartimento subcellulare è certamente un vantaggio, nonostante ciò è importante tener presente l’eventualità che la strategia di espressione possa non avvenire correttamente. In questo caso la conseguenza potrebbe riflettersi sull’ottenimento di una proteina non perfettamente “folded” o di

una miscela eterogenea di molecole all'interno dello stesso sistema di espressione.

2.5 ESPRESSIONE IN COLTURE CELLULARI ED ALTRI SISTEMI

Colture cellulari vegetali, derivate da tabacco, riso, carota sono state ampiamente utilizzate per la produzione di proteine eterologhe (Doran et al., 2000). Queste colture in sospensione sono particolarmente utili qualora la produzione del farmaco debba seguire accorgimenti particolari come la sterilità del materiale di partenza. Il metodo di produzione basato su colture cellulari vegetali è inoltre considerato intrinsecamente più sicuro di altri, visto che queste cellule non sono in grado di ospitare virus e patogeni umani o animali. Proteine espresse in colture cellulari possono essere secrete nel mezzo di coltura o trattenute all'interno delle cellule: la loro localizzazione cellulare o extracellulare dipende dai segnali di compartimentalizzazione inseriti nel costrutto.

Se le proteine sono accumulate nel reticolo endoplasmatico grazie alla presenza del segnale H/KDEL, per il loro isolamento è allora necessaria la rottura delle cellule, un processo laborioso che può provocare anche il rilascio di sostanze fenoliche che però interferiscono con il processo di purificazione e possono dunque diminuire sensibilmente le rese.

Le sospensioni cellulari possono essere generate da calli posti in un mezzo di coltura liquido tenuto in leggera agitazione, una volta ottenuta una sospensione omogenea, la coltura cellulare può essere trasferita in un fermentatore.

In questo modo negli ultimi quindici anni sono state prodotte più di venti proteine ricombinanti: anticorpi, ormoni, fattori di crescita e citochinine.

Nel 2001 è stata prodotta in sospensioni cellulari di riso l' α -1-antitripsina (AAT), una proteina generalmente estratta dal plasma umano. Questa proteina è utilizzata per la cura di diverse malattie, come l'enfisema polmonare, varie patologie del fegato, la fibrosi cistica e la dermatite. L' α -1-antitripsina prodotta in pianta è funzionale, ma possiede un'emivita più breve rispetto a quella umana, questo fatto è probabilmente causato dall'assenza di acido sialico sui residui glicanici addizionati durante il processo di modificazione post-traduzionale che, evidentemente per questo specifico caso, non è completamente sovrapponibile a quello osservato in cellule animali (Huang et al., 2001).

Il primo vaccino ad essere stato approvato dall'USDA (United States Department of Agriculture), ottenuto con il sistema PMP (Plant-Made Pharmaceuticals) è stato un vaccino animale prodotto in piante dalla Dow AgroSciences (2006) attraverso l'uso di un sistema a contenimento completo di coltura di cellule vegetali.

Altri organismi utilizzati come sistemi di espressione vegetale sono il muschio (Schaaf et al., 2005; Decker et al., 2003; Decker and Reski 2004; Hohe and Reski 2005; Huether et al 2005), le lenticchie acquatiche (Lemna) (Fitzgerald 2003; Gasdasaka et al., 2003) e le alghe che ancora possono essere ampiamente studiate a questo scopo (Walker 2005, Mera Pharmaceuticals, c. f. Dunwell and Ford.,2005; Sun et al., 2003).

2.6 RIZOSECREZIONE

La produzione di proteine ricombinanti su vasta scala ha come fattori limitanti le basse rese e le difficoltà che si incontrano nell'estrazione e nella purificazione dei prodotti. Il rilascio di proteasi durante l'omogenizzazione dei campioni e l'estrazione proteica può portare alla degradazione della proteina di interesse (Ma et al., 1994).

Un'alternativa a questo problema è l'utilizzo del naturale meccanismo di rizosecrezione della pianta, che in natura gioca un ruolo chiave nel processo di nodulazione, colonizzazione micorriziale, acquisizione di nutrienti dal suolo e difesa dai metalli tossici (Gleba et al., 1999). Le piante quindi possono essere ingegnerizzate in maniera tale da permettere la secrezione continua delle proteine nel mezzo di crescita. La rizosecrezione è un processo non distruttivo, le piante transgeniche possono produrre per tutto l'arco della loro vita e la purificazione del prodotto è meno complessa, tutto questo porta a un aumento delle rese. La secrezione negli essudati radicali combina insieme i vantaggi dei sistemi di espressione *in vitro* e quelli basati sulla produzione in piante intere. Ovviamente in questo tipo di strategia il mezzo di crescita deve essere liquido, parliamo in questo caso di colture idroponiche. Infine, la produzione industriale è facilitata dalla vasta scelta di sistemi di crescita idroponica presenti in commercio.

Diverse proteine sono state prodotte applicando questa strategia: la Green Fluorescent Protein (GFP), la fosfatasi alcalina umana secreta dalla placenta (SEAP), la xinalasi del batterio termofilo *Clostridium thermocellum*. Tutte e tre queste proteine sono state secrete da piante ingegnerizzate con l'impiego di promotori forti e specifici per l'espressione in radice e di peptidi segnale per l'indirizzamento alla secrezione (Borisjuk et al., 1999; Gleba et al., 1999). Piante di tabacco sono state trasformate con geni codificanti le tre proteine sotto il controllo del promotore forte e costitutivo 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV), o del promotore forte modificato della mannopina sintetasi (mas2'), proveniente da *Agrobacterium* e attivo soprattutto nelle radici. L'utilizzo del promotore radicale mas2' incrementava la rizosecrezione della SEAP fino a 20 µg per grammo di tessuto radicale, notevolmente maggiore rispetto ai 5,8 µg ottenuti sotto il controllo del promotore 35S (Borisjuk et al., 1999).

Nel caso dell'espressione della GFP, la proteina è stata fusa al peptide segnale del reticolo endoplasmatico della calreticulina di *Nicotiana plumbaginifolia*, una specie strettamente correlata a quella ospite del transgene. La quantità di GFP isolata in seguito ad un'estrazione delle proteine totali in radice era notevolmente inferiore a quella presente negli essudati radicali.

La fosfatasi alcalina è stata correttamente secreta utilizzando entrambi i promotori e il suo stesso peptide segnale: 32 giorni dopo il trasferimento delle piante in coltura idroponica il 79% dell'attività della SEAP era presente nel mezzo di coltura.

Questa tecnologia ha trovato applicazione anche per la produzione di anticorpi interi, come nel caso del Guy's 13, un anticorpo monoclonale murino che riconosce un antigene superficiale dello *Streptococcus mutans* (Drake et al., 2003). Il promotore utilizzato in questo caso era il 35S del virus del mosaico del cavolfiore e una sequenza segnale responsabile della

secrezione (Ma et al., 1994; Frigerio et al., 2000). L'anticorpo ricombinante è stato correttamente secreto grazie a un meccanismo di diffusione, guidato dal gradiente di concentrazione della proteina ricombinante tra lo spazio apoplastico e il mezzo di coltura. Nello stesso lavoro è stata anche seguita nel tempo la quantità dell'anticorpo secreto: i dati indicavano un accumulo dell'anticorpo nel mezzo di crescita dal primo all'undicesimo giorno, con un picco massimo tra i giorni 7 e 11. Nei giorni seguenti la quantità di proteina iniziava a diminuire fino alla scomparsa al ventunesimo giorno, probabilmente a causa della sua degradazione. Lo stesso esperimento effettuato con piante cresciute in un mezzo contenente gelatina mostrava un accumulo dell'anticorpo 4 volte maggiore. Questo evento suggerisce che la gelatina possa avere un effetto protettivo bloccando le interazioni non specifiche tra l'anticorpo e le fasi solide della coltura idroponica, modificando le interazioni tra le componenti del mezzo e l'IgG o agendo da substrato competitivo per le proteasi.

Gaume e i suoi collaboratori hanno messo a punto un sistema di espressione che combina la rizosecrezione di proteine eterologhe e le *hairy roots* (radici pelose), con lo scopo di aumentare la resa, utilizzando la SEAP come proteina modello (Gaume et al., 2003). Il risultato è stato un'espressione da 5 a 7 volte maggiore nelle radici *hairy* rispetto a quelle avventizie, probabilmente dovuta alla superficie radicale totale maggiore, ad una maggiore percentuale di tessuto meristematico attivo ed ad un'aumentata attività tradizionale cellulare.

In un recente lavoro (Ma et al., 2009) il mezzo di crescita idroponico di piante transgeniche di tabacco, è stato arricchito aggiungendo dei regolatori della crescita delle piante (PGRs), come ad esempio l'auxina. Queste molecole agendo positivamente sulla crescita dell'apparato radicale e anche sulla permeabilizzazione della parete cellulare, possono facilitare la secrezione delle proteine eterologhe nel mezzo di crescita. In effetti, gli autori hanno dimostrato che l'aggiunta di NAA (Naftalene acido acetico) incrementa notevolmente la produzione sia di un anticorpo intero Guy's13 che di un anticorpo ricombinante CV-N, in entrambi i casi, la concentrazione proteica ha raggiunto valori mai ottenuti prima (rispettivamente 128 e 766 µg/g di radice in 24 ore). L'utilizzo di ormoni e fattori di crescita quali IBA, BAP e in particolare NAA, possono dunque aumentare la quantità di proteina ricombinante prodotta sia perché determinano una maggiore crescita radicale, sia perché permettono una facile fuoriscita del prodotto proteico ricombinante dalle cellule epidermiche delle radici.

Concludendo, numerosi progressi sono stati fatti negli anni che hanno reso la rizosecrezione sempre più efficiente e le rese proteiche sempre maggiori. Al momento la produzione di proteine ricombinanti per mezzo della rizosecrezione sembra essere una strategia all'avanguardia, sia perché soddisfa, come vedremo in seguito, tutte le normative esistenti in materia di piante transgeniche, sia perché permette una purificazione semplice e veloce. Al riguardo è importante sottolineare la possibilità di legare alla proteina un ligando che possa essere riconosciuto da apparati cromatografici. In questo modo, collegando l'apparato cromatografico direttamente al mezzo idroponico, la purificazione potrebbe essere effettuata in continuo, evitando così che l'accumulo proteico nel mezzo di crescita, possa inibire la secrezione della proteina d'interesse o possa favorirne la degradazione. Un

ulteriore accorgimento, potrebbe essere l'utilizzo in serie di due sistemi di coltivazione, aeroponico in un primo momento, per accrescere l'apparato radicale e quindi la superficie di rizosecrezione, e idroponico in seguito per poter ottenere le proteine nel mezzo di crescita. La combinazione di entrambi i sistemi di crescita potrebbe incrementare di molto le rese proteiche.

2.7 SILENZIAMENTO

Diversi studi hanno dimostrato che il transgene inserito nella pianta, può nel tempo essere inattivato, tale fenomeno è detto silenziamento genico (Depicker et al., 1997; Matzke and Matzke, 1998). Diversi sono i meccanismi molecolari e i fattori che determinano il silenziamento. L'espressione di un gene può essere spenta tramite la sua metilazione (van Blokland et al., 1998; Kloti et al., 2002), la sua mancata trascrizione (*silenziamento genico trascrizionale*, TGS) (Meyer, 2000), la degradazione dell'RNA messaggero (*silenziamento genico post-trascrizionale*, PTGS) (Marathe et al., 2000; Meins, 2000) o la degradazione proteolitica della proteina da esso codificata. Un fattore importante che determina il silenziamento genico è il numero di copie del transgene inserite e la loro posizione all'interno del DNA della pianta (Finnegan and McElroy, 1994; Koprek et al., 2001). Altre cause di silenziamento possono essere l'utilizzo di vettori virali pseudo-costitutivi come il promotore CaMV35S, l'omologia di alcune sequenze all'interno della sequenza genica codificante o all'interno del promotore (*silenziamento genico dipendente da omologia di sequenza*, HDGS) (Meyer and Saedler, 1996). Il tipo di transgene inserito può contribuire direttamente al silenziamento qualora induca una regolazione negativa sui promotori pianta-specifici (Kusnadi et al., 1997)

2.8 PROTEINE PRODOTTE IN PIANTE IN FASE AVANZATA DI SPERIMENTAZIONE CLINICA

Ad oggi solo un vaccino animale prodotto in piante è stato lanciato sul mercato, si tratta del vaccino implicato nel disastro del New Castle, prodotto in sospensioni cellulari dalla Dow Agrosience. Molti altri vaccini sono ancora in fase di sperimentazione clinica.

La prima proteina ricombinante entrata in fase di sperimentazione clinica è il CaroRx, un anticorpo secretorio che combatte la carie, prodotto dalla Planet Biotechnology. Questo anticorpo ha ricevuto l'approvazione per utilizzo umano nel Regno Unito (Kaiser, 2008)

La Planet Biotechnology, sta sviluppando anche un anticorpo di fusione ICAM-1 applicabile all'epitelio nasale per il trattamento del raffreddore, questa proteina è in fase I di sperimentazione (Basaran e Rodríguez-Cerezo.,2008). Sempre la Planet Biotechnology ha prodotto un anticorpo che riconosce farmaci chemioterapici e previene la perdita di capelli durante la chemioterapia, anche quest'ultimo è in fase preclinica di sperimentazione.

La tabella 4 mostra una visione completa di tutte le proteine ricombinanti che hanno raggiunto la fase di sperimentazione clinica.

FIG 6: Biofarmaci prodotti in pianta per uso umano (tratta da Karg and Kallio., 2009)

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

La Sem BioSys Genetics Inc, ha approvato la produzione nei corpi oleosi di rapa dell' Hirudin, un peptide naturale delle ghiandole salivari con proprietà anticoagulanti, e parallelamente, ha anche approvato la produzione di proteine ricombinanti nel cavolfiore, si tratta principalmente di prodotti per la salute umana, la più promettente è l'insulina ricombinante che è già in fase III di sperimentazione dal Dicembre 2008 ((Karg e Kallio 2009).

Un'altra compagnia che va ricordata è la CIGB (Centro de Ingenieria Genetica Y Biotecnología) di Cuba, questa compagnia nel 2006 ha avuto l'approvazione per la produzione in tabacco di un anticorpo contro l'epatite B (Kaiser, 2008).

Molto recentemente, un gruppo di ricerca internazionale ha prodotto una proteina, la GRFT (griffithsin), che si è dimostrata efficace contro il virus dell'HIV anche in concentrazioni picomolari. La proteina Griffithsin, la prima a essere isolata dall'alga rossa (Griffithsia), può fermare la trasmissione del virus da una cellula all'altra legandosi alle glicoproteine presenti nell'involucro del virus. Tale proteina è stata espressa in *N. benthamiana* dalla KBP (Kentucky BioProcessing) (O'Keefe et al., 2009). Nel settembre 2008, la Bayer Innovation (GmbH) ha annunciato la sua collaborazione con il KBP per la produzione massiva di tale proteina in tabacco.

Purtroppo, accanto alle molte compagnie che si stanno sviluppando nel campo delle biotecnologie vegetali, ce ne sono tante altre che hanno chiuso

la loro attività, ne è un esempio la compagnia europea Meristem Therapeutics, che ha prodotto diverse proteine ricombinanti, tra cui una lipasi gastrica per il trattamento dell'insufficienza pancreatica e un anticorpo per il trattamento del cancro (source: www.meristem-therapeutics.com).

Un'altra compagnia, che non è più attiva, è la ProdiGene Inc, produttrice degli enzimi avidina, tripsina e il gene GUS. Va ricordata anche la Large Scale Biology Corporation fallita nel 2006, dopo aver prodotto in piante transienti di tabacco anticorpi target-specifici per pazienti con linfoma, numerosi enzimi e vaccini sia per uso animale che umano.

Il problema della chiusura e del “non decollo” di alcune compagnie, è spesso da associare agli ostacoli imposti dalle normative esistenti in materia di piante transgeniche che spesso pongono limiti, allo sviluppo della produzione di biofarmaci con sistemi biotecnologici.

2.9 AUTORIZZAZIONI

I farmaci e i vaccini prodotti in pianta, prima di essere autorizzati e messi sul mercato, devono essere sottoposti a numerosi controlli (efficacia, sicurezza e qualità). Tutto ciò comprende una serie di studi preclinici e clinici che generalmente sono effettuati su animali e soggetti umani.

Le autorità che regolano queste autorizzazioni in Europa, negli USA, in Canada e in altri paesi, hanno accumulato nel tempo una notevole esperienza e la loro attenzione è focalizzata principalmente su:

1. Biofarmaci e vaccini derivati da tecnologie di DNA ricombinante
2. Metodi per il controllo della qualità del materiale vegetale utilizzato
3. Controlli sui sistemi di coltivazione

In Europa, le normative per il controllo della produzione di biofarmaci, sono dettate dall'EMA (European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use).

Le prime normative sono state formulate nel 2002, anno in cui l'EMA ha pubblicato un cosiddetto “Points to consider”, ossia un documento sugli aspetti qualitativi dei biofarmaci prodotti mediante trasformazione stabile, tale documento ha gettato le basi per le linee guida che sono state definite successivamente.

Nel 2004, è stato costituito il consorzio PharmaPlanta, cui fanno parte 39 istituzioni accademiche e industriali dell'Europa e del Sud Africa. L'obiettivo di questo gruppo era definire appropriate linee guida sul PMP (Plant-Made Pharmaceuticals) in accordo con le normative previste dall'EMA e dall'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare).

Nel 2006, l'EMA ha finalmente definito le linee guida, attualmente in vigore.

La normativa è comunque ancora poco chiara, essa prevede la possibilità di coltivare piante transgeniche per la produzione di biofarmaci, regolarizza tutte le fasi, dalla genetica dello sviluppo del farmaco alla sua produzione e ai controlli. La normativa esclude la possibilità di utilizzare piante transienti

e cellule vegetali

Fra il 2007 e il 2008, il PharmaPlanta, ha concluso il suo lavoro e ha definito le linee guida sia in materia di coltivazione, sia in termini di processamento successivo all'espressione. Non presenta dei limiti definiti e precisi, pone attenzione sulla strategia utilizzata per la produzione, affinché i costi siano bassi e le rese alte. Il sistema scelto insomma deve assicurare una produzione industriale di successo, e le proteine espresse non devono assolutamente essere modificate dal processo di produzione. Per il resto sembra essere in accordo con le normative EMEA.

E' dunque evidente che in Europa, così come negli altri paesi, non esistono normative specifiche, che possano garantire la possibilità di mettere sul mercato un biofarmaco, dopo un lungo investimento di tempo.

Negli USA, le normative dettate dal FDA (Food and Drug Administration), sono paradossalmente meno restrittive rispetto a quelle europee, molto meno precise e non ostili alle piante transgeniche, questo riflette perfettamente il maggiore stato di avanzamento dei prodotti espressi.

Un aspetto rilevante in questo senso, è l'ostilità dell'Europa nei confronti delle piante transgeniche, quest'aspetto potrebbe indirizzare obbligatoriamente le attività di produzione verso tipi di coltivazione che utilizzano sistemi a contenimento totale, come le colture idroponiche e aeroponiche o le colture cellulari. Le coltivazioni in campo aperto, oltre a poter subire qualsiasi tipo di contaminazione, possono essere soggette a cambiamenti ambientali, climatici, e del suolo, potrebbero necessitare dell'utilizzo di pesticidi. Tali problematiche non si presentano invece nel caso di coltivazioni in serra e tantomeno in serra a contenimento, come quelle per piante transgeniche. Un altro indirizzamento potrebbe orientare l'espressione in piante così dette "no-food", ossia piante non alimentari. Inoltre è doveroso sottolineare che tutte le normative europee, elencate, si riferiscono a coltivazioni di " higher plants".

Riassumendo e tenendo conto dei punti chiave espressi dalle normative EMEA, e dal PharmaPlanta, affinché un determinato prodotto possa essere approvato dovrebbe : (1) essere espresso in piante transgeniche, (2) essere facilmente purificato, (3) avere delle alte rese, (4) le piante dovrebbero essere coltivate in un sistema a contenimento totale per la sicurezza, (5) la scelta della pianta dovrebbe ricadere su quelle non alimentari. In questo senso, l'utilizzo di piante transgeniche di tabacco, cresciute in idroponica per sfruttare i vantaggi della rizosecrezione (facile purificazione e rese ottimali), dovrebbe rappresentare un sistema ideale per l'approvazione della produzione su larga scala.

3 ANTICORPI

3.1 STRUTTURA E FUNZIONE.

Le *immunoglobuline* (Ig) o anticorpi sono glicoproteine di difesa in gran parte circolanti nel sangue e nella linfa, sintetizzate da linfociti B e plasmacellule, possono riconoscere, precipitare o neutralizzare batteri invadenti e proteine estranee di altre specie. Esse sono codificate da tre gruppi genici localizzati su cromosomi diversi e possono essere raggruppate in cinque classi:

- Le IgG (p.m. 150.000), sono composte da due catene pesanti (p.m. 53.000) e due catene leggere (p.m. 22.000) e contengono il 2-3% di carboidrati. Nell'uomo esse rappresentano il 75% delle immunoglobuline plasmatiche.
- Le IgA (p.m. 170.000) si trovano nel siero generalmente in forma monomerica, mentre nei secreti la forma rappresentata è la dimerica. Il loro contenuto di carboidrati è superiore rispetto alle IgG.
- Le IgM (p.m. 900.000) sono gli anticorpi filogeneticamente più antichi, si trovano in forma di pentameri molecolari e contengono il 9-10% di carboidrati. Esse hanno una forte affinità per il complemento e formano complessi antigene/anticorpo/complemento, facilitando i processi di fagocitosi.
- Le IgD (p.m. 160.000) sono monomeri, recettori di superficie delle cellule B mature insieme con le IgM, hanno una emivita breve e sono presenti nel siero ad una concentrazione molto bassa.
- Le IgE (p.m. 190.000) aumentano di numero durante i processi allergici e si trovano nelle secrezioni dell'apparato respiratorio e digerente in forma monomerica. Legano con affinità altissima i recettori Fc di granulociti basofili e mastociti, fungendo per queste cellule da recettori per gli antigeni.

Tutte le immunoglobuline possiedono la stessa struttura monomerica, formata da coppie simmetriche di catene polipeptidiche che vengono definite pesanti (*heavy* o H) o leggere (*light* o L) in base al loro peso molecolare (Edelman, 1970). Una rappresentazione schematica di un'immunoglobulina IgG è presente in figura 3.

Le catene H delle immunoglobuline hanno un peso molecolare compreso tra 45 e 55 kDa. Nei vertebrati superiori sono rappresentati almeno cinque tipi principali di catene H, detti α , δ , ϵ , γ e μ , che corrispondono alle principali classi anticorpali.

Le catene H sono caratterizzate dalla presenza di quattro domini: un *dominio aminoterminale*, diverso da catena a catena, e detto *dominio o regione variabile* o VH, e tre domini carbossiterminali, uguali in tutte le classi di immunoglobuline, che rappresentano i *domini o regioni costanti*, detti anche CH1, CH2 e CH3.

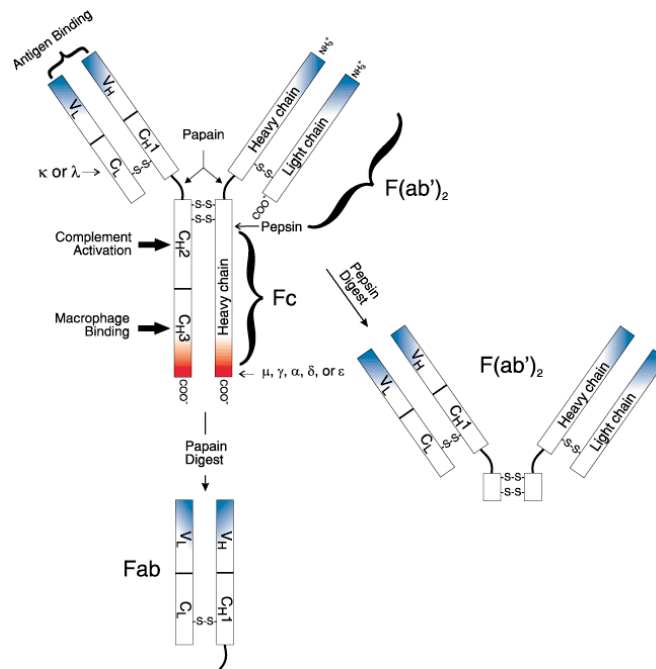


Figura 3: Struttura schematica di una immunoglobulina IgG.

I domini VL e VH sono deputati al riconoscimento dell'antigene; i domini costanti CH2 e attivano il complemento e quelli CH3 legano i macrofagi

I residui carboidratici in genere sono uniti alle catene pesanti attraverso legami N-glicosidici tra l'azoto amidico di un residuo di asparagina appartenente a CH2 e uno di N-acetilglucosamina dell'unità saccaridica.

Le catene L sono composte da 210-220 aminoacidi e hanno un peso molecolare di circa 23 kDa. Nei vertebrati superiori sono presenti diversi isotipi delle catene leggere, κ e λ , che possono associarsi indifferentemente con tutti i tipi di catena pesante. La proporzione fra le catene leggere di tipo κ e λ cambia da specie a specie: mentre nell'uomo il 60% delle catene L è di tipo κ ed il 40% di tipo λ , nel topo la percentuale di catene di tipo κ sale al 90%.

Le catene leggere a loro volta sono caratterizzate dalla presenza di due domini. Il dominio carbossiterminale comprende circa 110 aminoacidi, è identico in tutte le molecole appartenenti allo stesso isotipo ed è detto per questo motivo *dominio costante della catena leggera* o CL. Il dominio aminotermine della catena leggera, comprendente un uguale numero di aminoacidi, è detto *dominio variabile VL*, in quanto esso varia da anticorpo ad anticorpo.

Una singola catena anticorpale, ad esempio una IgG, assume una forma ad Y (Huber et al., 1976) ed è sempre formata da due catene H identiche, che ne definiscono la classe di appartenenza, e da due catene L dello stesso tipo (κ o λ). Ponti disolfuro tengono unite le catene L con le rispettive catene H, e le catene H tra loro. Oltre a legami covalenti di questo tipo la stabilità della struttura anticorpale è mantenuta anche da interazioni idrofobiche. Sull'estremità di ciascun braccio della Y si trovano i domini variabili delle

catene pesanti e leggere; proprio qui si localizzano i due identici siti di legame dell'anticorpo all'antigene (Milstein, 1985).

La regione variabile è l'unica responsabile della specificità per l'antigene, mentre tutte le altre funzioni biologiche come l'attivazione del complemento e l'aderenza ai macrofagi sono espletate dalle strutture presenti nella regione costante.

Il trattamento dell'anticorpo con l'enzima proteolitico papaina ha come risultato la sua scissione in tre frammenti (Porter, 1959). Due di questi sono identici e mantengono la capacità di legare l'antigene in un complesso solubile: essi vengono designati frammenti Fab (*Antigen binding fragments*). Il terzo frammento non lega l'antigene e viene chiamato Fc (*Fragment crystallizable*) perché si può ottenere in forma cristallina. Un frammento Fab è costituito da parte della catena pesante (VH e CH1) e da tutta la catena leggera (VL e CL), mentre il frammento Fc è composto esclusivamente dai domini costanti CH2 e CH3 delle catene pesanti.

I domini variabili VH e VL sono costituiti da sequenze polipetidiche conservate che agiscono da intelaiatura della molecola e per questo denominate *Framework region* (FR), intervallate a delle sequenze che possiedono un'alta variabilità aminoacidica rispetto al resto della catena. Queste ultime regioni vengono dette *regioni ipervariabili* o *regioni che determinano il complemento* (CDR1, CDR2, CDR3). Queste regioni ipervariabili sono le deputate al riconoscimento dell'antigene, la loro estrema variabilità permette al sito di legame di assumere forme molto diverse capace di adattarsi ad un numero enorme di determinanti antigenici differenti.

La presenza dei ponti disolfuro all'interno delle molecole anticorpali le rende delle strutture abbastanza rigide e compatte. L'unica regione flessibile è situata nella regione della catena pesante al confine tra i frammenti Fab ed Fc; tale regione prende il nome di *regione cerniera* (*hinge*) e permette ai frammenti Fab di ruotare intorno al frammento Fc e di legare determinanti antigenici relativamente distanti tra loro.

3.2 LA TECNOLOGIA DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI.

Nel 1975 Georges J.F. Köhler e César Milstein hanno descritto la tecnica degli ibridomi per generare anticorpi monoclonali (*mAbs*) *in vitro*. L'immortalizzazione di cellule che producono anticorpi attraverso la fusione con linee di cellule tumorali è una tecnica semplice che ha segnato un enorme passo avanti nella produzione illimitata di specifiche molecole anticorpali (Kohler and Milstein, 1975) ed è valsa anche un Nobel agli autori.

L'impiego delle terapie anticorpali offre numerosi vantaggi. Gli anticorpi sono specifici e possono virtualmente riconoscere tutti i tipi di molecole, incluse quelle umane. I mAbs si prestano ad un doppio utilizzo: se da un lato infatti essi possono fornire indicazioni sul ruolo di una molecola in una determinata malattia, essi sono anche alla base di un possibile trattamento. Diversamente dai farmaci tradizionali è possibile costruire mAbs contro specifiche molecole obiettivo, cause della malattia, senza recare danno alle cellule sane vicine.

Negli ultimi anni sono stati effettuati significativi progressi nella scoperta e nella classificazione degli antigeni associati ai tumori (TAA). Molti di questi antigeni non sono espressi solamente in cellule cancerose, ma anche in linee cellulari normali, di conseguenza essi vengono spesso definiti “tumor-associated” e non “tumor-specific”. In ogni caso, le cellule trasformate possiedono un’espressione di queste molecole fino a cento volte superiore rispetto ai tessuti normali e anche l’accessibilità nei confronti dell’antigene nei tessuti tumorali può essere maggiore. I TAA sono un gruppo eterogeneo di molecole: proteine, glicoproteine e glicolipidi.

Antigeni tumorali sono stati identificati in un ampio spettro di casi di cancro. Gli antigeni del differenziamento ematopoietico comprendono quelli associati ai cluster di differenziazione (CD). Degli antigeni superficiali di differenziamento fanno parte glicoproteine come l’antigene carcinoembrionario (CEA), la molecola di adesione epiteliale (ep-CAM), l’antigene di membrana prostata-specifico (PSA), come anche glicolipidi (gangliosidi) e carboidrati, come quelli specifici del gruppo sanguigno. Altri antigeni sono EGFR, HER2 e IL-2, recettori per fattori di crescita. Antigeni stromali dei processi di angiogenesi sono la proteina di attivazione dei fibroblasti (FAP), il recettore per il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGFR), la tenascina e l’integrina $\alpha v \beta 3$.

Una limitazione importante all’uso degli anticorpi monoclonali è l’induzione di risposta immunitaria diretta contro i frammenti Fc nei pazienti trattati. Questa risposta è da imputare all’origine murina di tali anticorpi.

Lo sviluppo dell’ingegneria genetica ha permesso la costruzione di mAbs chimerici, costruiti a partire da regioni variabili di anticorpi murini e regioni costanti di anticorpi umani (Bouliane et al., 1984). Gli anticorpi di seconda generazione o umanizzati invece sono formati dalle regioni che determinano la complementarità (CDRs) che derivano dal mAbs di topo e le regioni costanti e variabili rimanenti derivate da una fonte umana (Figura 4).

Sono stati descritti anticorpi “primatizzati”, con le regioni variabili provenienti da anticorpi di *Cynomolgus macaques* fuse alle regioni costanti umane.

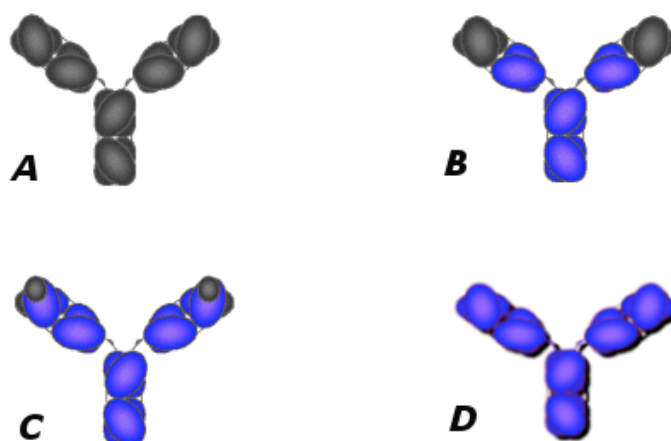


Figura 4:

- A) Anticorpo murino.
- B) Anticorpo chimerico.
- C) Anticorpo umanizzato.
- D) Anticorpo umano.

In grigio: sia singole parti sia l'intero anticorpo murino.

In blu: sia singole parti che l'intero anticorpo umano.

Fonte: <http://www.genmab.com>

La produzione di anticorpi umani interi o in frammenti è stata resa possibile dalla tecnologia del “display fagico”, descritta originariamente nel 1985 (Smith, 1985). Gli anticorpi ingegnerizzati bispecifici (bsAbs) possiedono doppia specificità, un sito di legame dell'antigene associato al tumore e l'altro per cellule effettrici antitumorali. Le tecnologie di chimerizzazione e umanizzazione sono importanti nel ridurre l'impatto immunogenico dei mAbs, per la loro capacità di mobilitazione di cellule citotossiche e del complemento e per la loro aumentata stabilità nel circuito circolatorio. Nonostante questi vantaggi innegabili questo tipo di anticorpi ha ancora la capacità di stimolare gli HACA (Anticorpi umani antichimerici) e gli HABA (anticorpi umani anti-umani), risposte immuni dirette contro la regione variabile dei mAbs, anche se l'incidenza di queste risposte in genere è bassa.

Il legame di anticorpi monoclonali può avere varie applicazioni in campo terapeutico.

Il legame di mAbs a recettori per fattori di crescita ha lo scopo di bloccare il loro sito di legame, con conseguente inibizione dell'attività tirosina chinasi. In alternativa il legame dell'anticorpo può impedire la dimerizzazione del recettore, rendendo impossibile l'innesco della cascata del segnale. Esempi di questo meccanismo d'azione sono illustrati dai casi di ErbB-2 (Erceptina), EGFR (C225), VEGFR (IMC-IC11). Il legame di un anticorpo a queste molecole introduce un cambiamento nel loro stato di fosforilazione con il risultato di inibire funzioni cellulari legate alla

trasmissione del segnale, come l'apoptosi, la resistenza alle terapie e l'angiogenesi (Baselga, 2000).

Una componente importante delle terapie basate su anticorpi monoclonali è dipendente dalla loro funzione Fc. Il meccanismo mediante cui avviene l'uccisione delle cellule tumorali è stata ampiamente descritta (Nimmerjaham and Ravetch, 2008). Brevemente, la distruzione (o soppressione o eliminazione) delle cellule tumorali può essere ottenuta attraverso la via classica dell'attivazione del complemento, la mobilitazione di effettori contro le cellule tumorali e l'induzione dell'apoptosi. Il contributo delle regioni anticorpali Fc è difficile da dimostrare in studi *in vivo*, ma in condizioni sperimentali è stato visto che esse hanno un ruolo fondamentale nell'azione dei mAbs (Clynes et al., 2000). In topi privi dei recettori Fc FCγRI e FCγRII gli effetti antitumorali del Trastuzumab (Erceptina) e del Rituximab (Rituxan) sono ridotti. Topi privi dei recettori inibitori FCγRIII presentano riduzione della crescita tumorale e un'aumentata citotossicità anticorpo-mediata (ADCC). Ci sono vari esempi di anticorpi con forte funzione Fc che hanno dimostrato efficacia in campo clinico, come i mAbs contro GD2 e GD3. Il Campath1H, la versione umanizzata dell'anticorpo murino anti-CD52, è stato messo in commercio negli USA per il trattamento della leucemia linfatica cronica. Esso è un potente stimolatore di effettori cellulari *in vitro*, e si pensa che questo sia il meccanismo con cui agisca in pazienti affetti da tumore. Negli ultimi anni sono stati pubblicati numerosi lavori che mettono in evidenza il ruolo delle regioni anticorpali Fc (Dall'Ozzo et al., 2004; Desjarlais et al., 2007; Musolino et al., 2008; Bibeau et al., 2009)

Gli anticorpi monoclonali possono essere utilizzati per lo sviluppo di vaccini anticancro. Gli anticorpi anti-idiotipo bloccano i siti di legame all'antigene di altri anticorpi mimando la struttura tridimensionale degli antigeni stessi. Per questo motivo essi possono essere usati come surrogati dell'antigene in un'immunoterapia specifica. Studi in modelli animali hanno dimostrato la loro efficacia nell'innescare risposte antitumorali e sperimentazioni cliniche in questo senso avvengono sui tumori come il melanoma o il cancro all'ovaio.

Alcuni anticorpi che hanno come bersaglio cellule neoplastiche non provocano la loro morte in maniera diretta, al contrario trasportano tossine naturali, radioisotopi, farmaci chemioterapici o citochine che, per essere attivi, richiedono l'entrata all'interno della cellula o comunque una notevole vicinanza fisica al loro bersaglio. Gli anticorpi coniugati o i frammenti anticorpali con queste caratteristiche, sviluppati per la cura di tumori solidi o del sangue, sono stati ben caratterizzati nella loro funzione sia *in vitro* che in animali modello.

I radioisotopi possono essere legati ai mAbs per via chimica e somministrati ai pazienti per indirizzare la radiazione solo nella zona dove risiede il tumore. I radioimmunoconiugati possono essere costituiti solo dal radioisotopo legato covalentemente all'anticorpo o dalle due componenti legate insieme da agenti chelanti. L'efficacia citotossica di uno specifico radioimmunoconjugato dipende dalla cinetica di localizzazione dell'anticorpo e dalla ritenzione del radioisotopo. Le cellule dei linfomi

sono particolarmente sensibili a queste tecniche. Il mAb anti-CD20 coniugato con l'ittrio 90 (Zevalin) ha dimostrato aumentare l'apporto di radiazione di 1000 volte verso le cellule tumorali rispetto a quelle normali (Wiseman et al., 2001) ed è stato approvato per il trattamento dei linfomi delle cellule B. Ancora non sono stati approvati immunoconiugati per il trattamento di tumori solidi, sebbene molti siano in fase di sperimentazione clinica.

Ai mAbs antitumorali è possibile legare anche altri tipi di sostanze come la ricina o la tossina difterica, oppure farmaci citotossici come la dextrorubicina o la calicheamicina.

Il legame della calicheamicina con un anticorpo anti-CD33 si è dimostrato un successo nel trattamento di alcuni pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (AML) ed il Mylotarg è stato approvato con questo tipo di indicazione. Un'altra strategia che utilizza l'anticorpo come vettore del farmaco è l' ADEPT (*Antibody directed enzyme-prodrug therapy*), approccio in cui gli anticorpi portano enzimi direttamente sugli antigeni superficiali di cellule cancerose. Una volta che il complesso anticorpo-enzima si è legato al suo bersaglio, e che l'immunoconiugato in eccesso è stato smaltito dalla circolazione sanguigna, vengono somministrate sostanze inattive che vengono convertite in farmaci attivi dall'enzima legato all'anticorpo.

La combinazione di terapie anticorpali con altri trattamenti, in particolare la chemioterapia e la radioterapia, in modelli *in vivo* ha mostrato di avere effetti additivi o sinergici. I meccanismi di questi effetti sono complessi, correlati all'interazione tra i meccanismi d'azione delle terapie convenzionali e l'effetto delle funzioni anticorpali Fc, dell'inibizione del segnale su cellule tumorali in proliferazione, sui meccanismi di riparo. La maggioranza dei dati a disposizione riguarda la combinazione di terapie basate sui Mabs e la chemioterapia. La combinazione della radioterapia con anticorpi diretti verso EGFR e la chemioterapia con la radioimmunoterapia, hanno dimostrato avere allo stesso modo effetto sinergico in modelli *in vivo* e nelle prime fasi della sperimentazione.

Nella tabella 4 sono mostrati alcuni anticorpi monoclonali anticancro approvati dalla FDA (Food and Drug Administration) ed altri che ancora sono in fase di sperimentazione.

TAB 4: Anticorpi monoclonali anticancro

Selected examples of monoclonal antibodies currently in clinical use and development					
Antigen Target	Cancer	Antibody	Antibody Type	Company / Institute	Trial Status
CD33	AML	Zamyl Mylotarg (Gemtuzumab ozogarricin)	Humanised Humanised	Protein Design Labs Wyeth-Ayerst	Phase III FDA approval 2000
CD20	NHL	Rituxan (Rituximab)	Chimeric	IDEC Pharm/Genentech	FDA approval 1997
		Zevalin (Ibritumomab Tiuxetan) Bexxar (Tositumomab)	Murine, radiolabelled (⁹⁰ Y) Murine, radiolabelled (¹³¹ I)	IDEC-Pharm/Schering AG Corixa Corporation	FDA approval Feb 2002 Phase III
CD22	NHL	LymphoCide (Epratuzumab)	Humanised	Immunomedics, Inc	Phase III
		LymphoCide Y-90	Humanised, radiolabelled (⁹⁰ Y)	Immunomedics, Inc	Phase I
HLA-DR	NHL	Srart1D10 (Remitogen)	Humanised	Protein Design Labs	Phase II
CD52	B-CLL	Campanth1H (Alemtuzumab)	Humanised	Millenium Pharm/ ILEX Oncology Inc	FDA approval 2001
HER2/neu (ErbB-2)	Breast, Colon, NSCLC	Herceptin (Trastuzumab)	Humanised	Genentech	FDA approval 1998 (breast cancer)
CEA	Solid Tumours	CEA-cide Y-90	Humanised, radiolabelled (⁹⁰ Y)	Immunomedics, Inc	Phase VII
EpCam	Colorectal	Panorex	Murine	Glaxo-Smith Kline	Approved in Germany in 1995
EGFR	Head and Neck, NSCLC, Colon	IMC-C225 (Erbix)	Chimeric	Imclone Sys	Phase VI/III
		ABX-EGF h-R3	Human Humanised	Abgenix CMI	Phase VII Phase VII
VEGF	Solid Tumours	Bevacizumab	Humanised	Genentech	Phase II/III
VEGFR-2	Solid Tumours	IMC-1C11	Chimeric	Imclone Sys	Phase II and III
A33	Colorectal	huA33	Humanised	LICR	Phase VII
Lewis^x	Solid Tumours	SGN-15 hu3S193	Chimeric Humanised	Seattle Genetics LICR	Phase VII Phase I
GD3	Melanoma	KW-2871	Chimeric	Kyowa Hakko Kogyo / LICR	Phase I
G250/MN	Renal, Biliary	cG250	Chimeric	LICR / Willex	Phase VII
PSMA	Prostate	MLN591	Humanised	Millenium Pharm	Phase VII
CTLA-4	Prostate, Melanoma	MDX-010	Human	Medarex	Phase VII

Abbreviations: AML – acute myeloid leukaemia; B-CLL – B-cell chronic lymphocytic leukaemia; CEA – carcinoembryonic antigen; CMI – Centre for Molecular Immunology, Cuba; CTLA-4 – cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; EGFR – epidermal growth factor receptor; FDA – US Food and Drug Administration; HLA – human leukocyte antigen; LICR – Ludwig Institute for Cancer Research; NHL – Non-Hodgkin's lymphoma; NSCLC – non-small cell lung carcinoma; PSMA – prostate-specific membrane antigen; VEGFR-2 – vascular endothelial cell growth factor receptor-2.

3.3 FRAMMENTI ANTICORPALI INGEGNERIZZATI.

Forme anticorpali più piccole sono state sviluppate nel tentativo di aumentare la loro penetrabilità all'interno di tumori vascolari.

Frammenti ingegnerizzati come gli Fv (domini variabili delle catene pesanti e leggere non associati in maniera covalente), scFv (domini variabili delle

catene pesanti e leggere legate covalentemente tra loro per mezzo di un peptide linker), Fab (domini di legame all'antigene delle catene pesanti e leggere non legati covalentemente), “diabodies” e “triabodies” (frammenti scFv ricombinanti legati insieme), mantengono la specificità degli anticorpi parentali e penetrano facilmente all'interno delle masse tumorali. Uno schema esemplificativo di questi anticorpi ingegnerizzati è presente in figura 5.

Essi sono spesso utilizzati per veicolare tossine o farmaci coniugati. Un grande ostacolo all'uso di queste sostanze è il fatto che esse generalmente possiedono una emivita breve, e sono rapidamente eliminate dal circuito circolatorio. Alcuni piccoli frammenti anticorpali sono stati modificati tramite in legame con sostanze come glicole polietilenico e albumina, con lo scopo di bloccare il riassorbimento all'interno del rene (Tsutsumi et al., 2000; Chen et al., 1987).

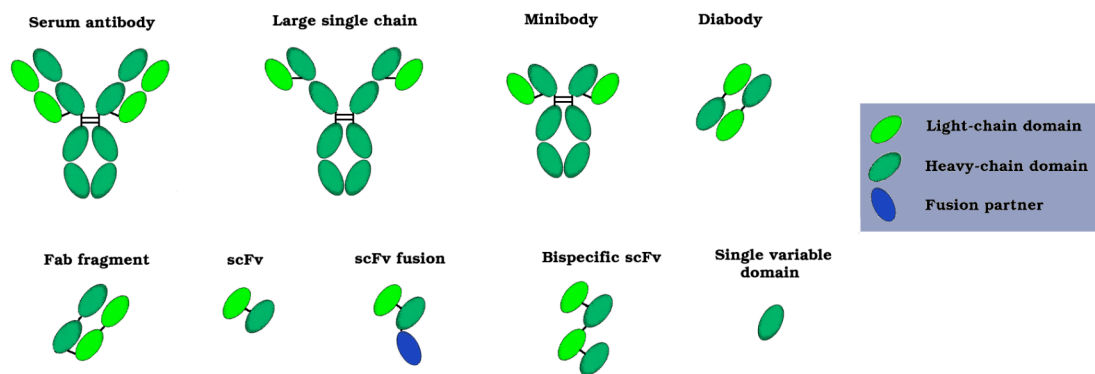


Figura 5:

Esempio di anticorpi ricombinanti utilizzati nella lotta contro il cancro. In verde chiaro le catene leggere, in verde scuro le pesanti. Il partner di fusione per gli anticorpi coniugati è rappresentato in blu.

Gli anticorpi bispecifici (bsAbs), i frammenti F(Ab)₂ e i “diabodies” possono influenzare la naturale specificità di una cellula effettrice nei confronti del proprio bersaglio, e indirizzare ad un destino di lisi una popolazione di cellule che naturalmente sarebbe ignorata. Le cellule effettrici che possono essere mobilitate da questi anticorpi bispecifici sono granulociti, macrofagi, cellule T e natural killer. Ad esempio linfociti T citotossici possono essere reindirizzati verso cellule tumorali ad opera di bsAbs che hanno specificità nei confronti della componente costante del complesso recettore per l'antigene delle cellule T (TCR), come il CD3, e una molecola espressa sulla superficie delle cellule tumorali. La combinazione della specificità per la cellula tumorale con i meccanismi di azione delle citochine (ad esempio IL-2, TNF) è un altro tipo di approccio che ha ottenuto soddisfacenti risultati preclinici.

4. ANTICORPI A SINGOLA CATENA

4.1 STRUTTURA DEGLI scFv.

Gli anticorpi a singola catena (*single chain antibody fragments*, scFv) sono costituiti dai due domini variabili VH e VL, provenienti dalle regioni variabili delle catene pesanti e leggere, tenuti insieme da un peptide *linker* di circa 15-25 residui aminoacidici (Bird et al., 1988).

Ciascun dominio variabile contiene le tre regioni ipervariabili che determinano la complementarità con l'antigene (CDR). In genere questi anticorpi ridotti all'essenziale mantengono la stessa specificità ed affinità dell'anticorpo parentale. Gli anticorpi a singola catena sono espressi a partire da un unico cDNA (costruito da due cDNA ottenuti dalla retrotrascrizione di due mRNA, uno codificante per la VH e l'altro per la VL), con il vantaggio evidente che qualora si voglia esprimere un anticorpo di questo genere è necessario il clonaggio di un solo transgene. Gli ScFv, essendo frammenti molto più piccoli di un'immunoglobulina intera (figura 6), hanno una maggiore capacità di penetrare all'interno delle masse tumorali solide; non possedendo inoltre il frammento Fc generano nei pazienti trattati una risposta immune ridotta. Nella lotta contro il cancro gli scFv sono strumenti molto utili anche per veicolare farmaci, tossine o radioisotopi direttamente sulla superficie di cellule bersaglio.

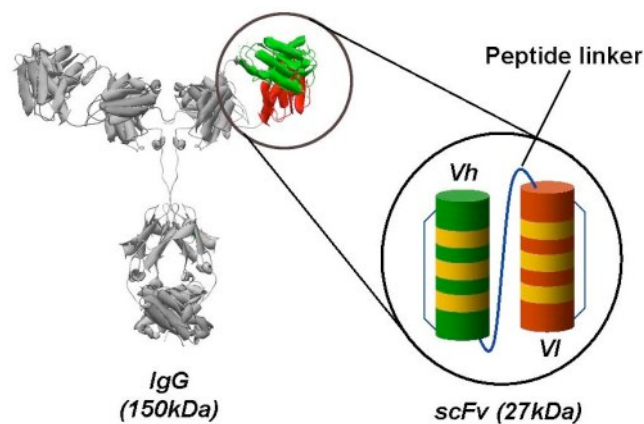


Figura 6: Anticorpo a singola catena.

Il frammento scFv è costituito dai domini variabili V_H e V_L delle catene

4.2 Costruzione ed espressione degli scFv.

I primi dati necessari per costruire un anticorpo a singola catena sono quelli riguardanti la sequenza della VH e della VL; in questo modo è possibile scegliere esattamente quale dovrà essere l'estremità carbossiterminale dei due frammenti.

Le regioni variabili delle immunoglobuline sono state amplificate tramite PCR (Sastry et al., 1986) e RACE (*rapid amplification of cDNA ends*), quest'ultima tecnica viene utilizzata in tutti i casi in cui non è possibile un'amplificazione con *primer* specifici per le regioni V (Ruberti et al., 1994).

Il peptide linker che dovrà legare i due frammenti viene scelto in maniera tale che non ostacoli il corretto ripiegamento dei frammenti stessi.

Un'osservazione interessante è quella che il legame dell'anticorpo con l'antigene non viene influenzato dalla polarità dei domini variabili: VH e VL possono essere posizionati in maniera indifferente all'estremità N-terminale dando luogo alle orientazioni VH -*linker*- VL o VL -*linker*- VH.

Il peptide che tiene uniti i due frammenti deve possedere una flessibilità e lunghezza tali da permettere la formazione, nell'anticorpo assemblato, di una cavità integra per il legame con l'antigene. Sebbene linker lunghi 12-18 residui conferiscano una maggiore stabilità al costrutto, in genere si utilizzano linker con una lunghezza compresa tra i 14 e i 25 residui (Whitlow et al., 1993). Linker molto piccoli (5-10 residui) favoriscono la formazione dei “*diabodies*” (frammenti anticorpali dimerici), o di frammenti multimerici funzionali ad alto peso molecolare (Hollinger et al., 1993; Desplancq et al., 1994).

Un altro fattore importante nella costruzione di un linker è la sua composizione aminoacidica: l'impiego di residui piccoli e polari come la glicina e la serina favorisce la formazione di legami idrogeno con il solvente, impedendo al peptide di entrare nell'interfaccia idrofobica costituita dall'associazione dei due domini V.

Molecole anticorpali a singola catena sono state espresse con successo in una varietà di organismi, come il lievito (Morrison et al., 1984; Ridder et al., 1995), nei funghi (Nyyssonen et al., 1993) e in cellule d'insetto (Putlitz et al., 1990). Finora comunque il sistema di espressione maggiormente utilizzato si è rivelato il batterio *E.coli*.

Perché un sistema di espressione possa essere considerato ottimale, è necessario che i frammenti anticorpali prodotti siano funzionali, quindi correttamente ripiegati ed assemblati. Il corretto ripiegamento di un scFv all'interno di *Escherichia coli* può essere garantito esprimendo l'scFv con una sequenza segnale che diriga la catena polipeptidica nel periplasma della cellula. In questo ambiente è favorita la formazione di ponti disolfuro e la purificazione è semplificata (Makrides, 1996). Una sequenza segnale tipica per l'indirizzamento periplasmico è la sequenza pelB, derivata dal gene pectasi liasi di *Erwinia carotovora* (Li et al., 1987). Modificando o omettendo il segnale di secrezione l'anticorpo può anche essere accumulato nel citoplasma della cellula o indirizzato in altri compartimenti cellulari (Marasco et al., 1997; Richardson et al., 1995). Gli anticorpi a singola catena espressi all'interno delle cellule vengono chiamati “*intrabodies*”; essi sono di particolare interesse per la loro capacità di modulare gli eventi molecolari che hanno luogo nelle cellule, ad esempio interferendo nelle interazioni tra proteine, permettendo così un'analisi delle funzioni proteiche *in vivo*.

In genere comunque l'espressione di questi anticorpi ricombinanti nel citoplasma è limitata dalla natura riducente di questo ambiente, che impedisce la formazione dei ponti disolfuro necessari per la loro stabilità (Proba et al., 1997; Biocca et al., 1995). Non è raro, infatti, trovare all'interno delle cellule batteriche corpi di inclusione che contengono una quantità di proteine pari al 30-50% delle proteine totali (Reiter et al., 1996; Barry and Lee, 1993; Huston et al., 1988).

4.3 scFv ESPRESSI IN PIANTA.

Anticorpi ingegnerizzati a singola catena sono stati espressi con successo in pianta, sia nello spazio apoplastico che nel citoplasma (Benvenuto et al., 1991; Benvenuto et al., 1991; Owen et al., 1992; Tavladoraki et al., 1993; Artsaenko et al., 1995; Fecker et al., 1997; Fiedler et al., 1997; Tavladoraki et al., 1999; Galeffi et al., 2002; Nejad et al., 2005; Galeffi et al., 2006; Xu et al., 2004)

I frammenti anticorpali a singola catena sono stati utilizzati per modulare il metabolismo della pianta ospite: nel 1992 Owen et al., hanno espresso nel citoplasma di cellule di tabacco un scFv diretto contro il fitocromo A, un fotorecettore implicato nelle risposte alla luce. L'espressione costitutiva di questo anticorpo provocava una forte diminuzione della germinazione in semi esposti alla luce.

Nel 1995, l'scFv specifico per l'ormone acido abscissico (ABA) è stato espresso da Artsaenko et al., e indirizzato nel reticolo endoplasmatico. Un fenotipo "avvizzito" era espresso sia dalle piante che presentavano la mutazione *ABA-deficient* sia in quelle che esprimevano l'anticorpo: questo fenotipo era una conseguenza dell'impossibilità degli stomi di chiudersi.

Gli anticorpi a singola catena sono stati utilizzati anche per proteggere la pianta da patogeni virali. Nel 1993 Tavladoraki et al., hanno dimostrato come piante transgeniche di *Nicotiana benthamiana* siano protette dall'infezione mediata dal virus AMCV (*Artichoke mottled crinkle virus*) attraverso una espressione costitutiva nel citoplasma di un anticorpo specifico per un epitopo della *coat-protein* virale.

Recentemente è stato evidenziato che questi anticorpi ingegnerizzati possono essere utili per una diagnosi precoce delle infezioni virali, come nel caso del CTV (*Citrus tristeza virus*), uno dei virus più distruttivi per gli agrumi (Terrada et al., 2000; Galeffi et al., 2002).

Negli ultimi anni gli scFv sono stati espressi in pianta per scopi farmaceutici. È stato prodotto un scFv specifico per un antigene di superficie del virus dell'epatite B in piante transgeniche di *Nicotiana tabacum* (Ramirez et al., 2002). L'anticorpo è stato indirizzato nel citosol, nell'apoplasto, nel vacuolo e nell'ER. La resa migliore è stata ottenuta quando esso era accumulato nell'ER (0,22% della frazione proteica totale solubile).

Kathuria et al., nel 2002 hanno costruito un anticorpo a singola catena contro la gonadotropina corionica umana (HCG), correlata ed espressa in vari tipi di cancro umano. Questo anticorpo è stato espresso in maniera transiente in foglie di tabacco con una resa di 40 mg di proteina purificata per chilo di materiale fogliare in peso fresco.

Un altro anticorpo a singola catena è stato sviluppato per il trattamento del linfoma non Hodgkin (McCormick et al., 2003). L'anticorpo in questione è stato clonato all'interno di vettore risultante da un virus del mosaico del tabacco (TMV) modificato per la secrezione all'interno di piante di *N. benthamiana* infettate. La resa della proteina nei liquidi interstiziali era compresa tra i 100 e gli 800 µg per ml.

Ehsani et al., nel 2003 hanno espresso due anticorpi a singola catena contro l'interleukina umana IL-4 e IL-6 in piante di tabacco transgeniche. In questo

caso la resa è stata dello 0,16-0,18% della frazione proteica totale solubile estratta dalle radici; solo l'8% delle piante trasformate produceva il scFv anti IL-4 e il 76% quello anti IL-6.

Nejad et al., nel 2005 hanno prodotto in piante transgeniche di tabacco, un scFv contro la *Salmonella enterica*, tale scFv, lega il lipopolisaccaride (LPS) di *S. enterica* e una volta purificato è stato dimostrato essere funzionale anche sotto forma di oligomero.

Nel 2006, Galeffi et al. hanno prodotto piante transgeniche di tabacco esprimenti un scfv contro l'antigene tumorale umano HER2, correlato al cancro del seno e dell'ovario. Il scfv in questione mostra un'ottima funzionalità e specificità di riconoscimento, sia in studi biochimici *in vitro* che in immunodiagnosi su reperti istologici da pazienti.

Infine, molto recentemente, nel 2007, Xu et al. hanno espresso in piante transgeniche di tabacco, il scFv19, un frammento anticorpale derivato dall'anticorpo monoclonale murino S19, allo scopo di produrre in pianta un anticorpo ricombinante anti-sperma per applicazioni farmacologiche.

5 ONCOPROTEINA HER2, TRASDUZIONE DEL SEGNALE ED ONCOGENESI.

5.1 LA FAMIGLIA ErbB.

I recettori tirosina chinasi (RTK) della famiglia Erb permettono l'accoppiamento del legame di fattori di crescita extracellulari con le vie di trasduzione del segnale, regolando numerose risposte biologiche come la proliferazione, il differenziamento, la motilità e la sopravvivenza cellulare. I quattro membri di questa famiglia RTK, elencati in tabella 5, sono il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR, anche chiamato ErbB-1 o HER1), ErbB-2 (HER2), ErbB-3 (HER3), e ErbB-4 (HER4). Questi recettori sono attivati in seguito al legame con il loro ligando, attraverso un meccanismo di omo- o etero-dimerizzazione.

TAB 5: La famiglia ErbB. Sono riportati i membri della famiglia con i rispettivi ligandi.

RECETTORE	LIGANDO
HER1 (ErbB-1)	Fattore di crescita epidermico Fattore di crescita trasformante alfa Beta cellulina Fattore di crescita che lega l'eparina Amfiredulina
HER2 (ErbB-2)	Eredulina?
HER3 (ErbB-3)	Eredulina Fattore di differenziamento neu 1+ 2
HER4 (ErbB-4)	Eredulina Fattore di differenziamento neu 1+ 2

Essi sono il risultato di un'evoluzione da un sistema di singolo recettore-ligando del verme *Caenorhabditis elegans* (Aroian et al., 1990) attraverso quello costituito da un recettore e quattro ligandi di *Drosophila melanogaster* (Wasserman and Freeman, 1998). La complessa rete che formano insieme ai più di dieci ligandi nei vertebrati superiori, rispecchia il loro alto grado di adattabilità attraverso una diversificazione del segnale, che permette il controllo delle risposte biologiche a vari livelli. Il legame del ligando ai recettori sulla superficie cellulare avvia la loro attività protein chinastica intrinseca: il risultato è una trasmissione del segnale attraverso la membrana e lo spazio citoplasmatico, fino al nucleo, dove avviene un'attivazione genica (figure 7 e 8). L'espressione dei recettori ErbB è comune in molti tessuti, nelle cellule epiteliali, mesenchimali e nei neuroni. Essi sono coinvolti nella determinazione del destino cellulare in vari organi (Burden et al., 1997), nel mantenimento dell'omeostasi e nello sviluppo delle ghiandole mammarie durante la pubertà e la gravidanza. Molte protein-chinasi sono implicate nello sviluppo di neoplasie (Blume-Jensen and Hunter, 2001)

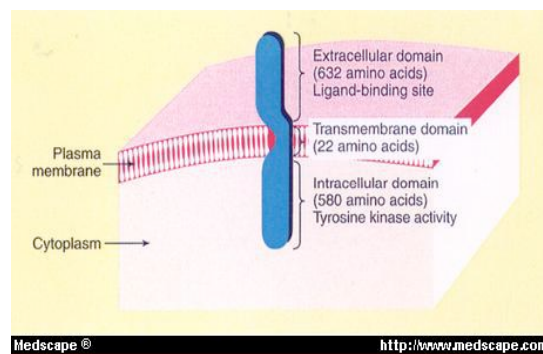


Figura 7: I recettori della famiglia ErbB sono proteine transmembrana che in assenza di ligando si trovano in forma di monomeri.

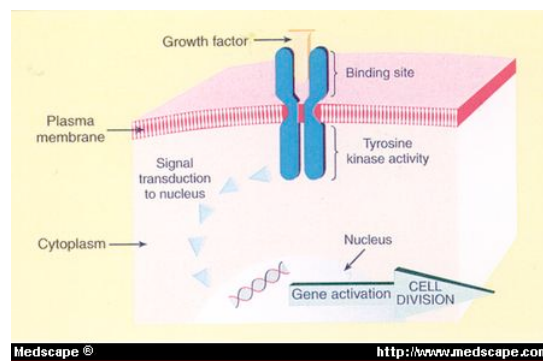


Figura 8: La dimerizzazione del recettore è innescata in seguito al legame con il ligando. La dimerizzazione porta all'attivazione dei recettori e all'innescare della cascata del segnale il cui effetto ultimo è l'attivazione genica nel nucleo che determina la proliferazione.

Per quanto riguarda la famiglia ErbB a questo riguardo è stato ben caratterizzato il ruolo di ErbB-1 e ErbB-2: questi due recettori infatti sono overespressi nel cancro al seno, all'ovaio, nel cancro del polmone "non a piccole cellule" (*non-small cell lung cancer*) e nel carcinoma coloretale.

I recettori ErbB sono composti da un dominio di legame extracellulare e un singolo dominio idrofobico transmembrana. La porzione intracellulare consiste di un dominio tirosina-chinasico altamente conservato, nonostante ErbB-3 contenga delle sostituzioni aminoacidiche tali da pregiudicarne l'attività chinasica (Guy et al., 1994).

Il legame con il ligando innesca una omo- o etero-dimerizzazione dei recettori, con conseguente transfosforilazione dei residui di tirosina all'interno di un "loop" di attivazione, un processo che comporta un aumento dell'attività chinasica. La successiva fosforilazione di residui tirosinici presenti sulla coda carbossiterminale del recettore permette l'attivazione degli effettori del segnale che contengono domini src di omologia 2 (SH2) e di legame alla fosfotirosina (PTB). ErbB-2 è l'unico membro di questa famiglia a non avere alta affinità di legame con nessuno dei ligandi conosciuti, pur essendo il partner eterodimerico favorito nel legame con gli altri recettori ErbB (Graus Porta et al., 1997). Sebbene sia l'omo- che l'etero-dimerizzazione risultino entrambe nell'attivazione della rete ErbB, il secondo fenomeno è in grado di sviluppare una risposta cellulare più potente e mitogenica.

5.2 L'ANTIGENE TUMORALE HER2 E LA SUA ATTIVAZIONE.

HER2 o ErbB-2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) è una glicoproteina di membrana di 185 kDa codificata dal proto-oncogene *c-erbB2*, localizzato sul cromosoma 17q. Il recettore ErbB-2 è normalmente espresso durante lo sviluppo fetale (Press et al., 1990), mentre è difficilmente visibile nei preparati immunoistochimici dell'adulto. *c-erbB2* è presente in singola copia nelle cellule normali. Sebbene in casi di cancro umano siano state trovate poche mutazioni del gene, grazie ad un meccanismo di amplificazione genica il recettore è over-espresso nel 20-30% dei casi di tumore al seno e all'ovaio. L'effetto oncogenico di ErbB-2 può essere correlato ad un'alta autofosforilazione basale (Lonardo et al., 1990); elevati livelli di espressione possono risultare nella formazione di omo-dimeri che si dimostrano promuovere la trasformazione di colture tissutali modello (Di Fiore et al., 1987). In topi trattati con un carcinogeno è stato osservata una omo-dimerizzazione in assenza di ligando della proteina *neu*, omologa a ErbB-2, in cui la mutazione *neuT* nel dominio transmembrana risultava in un'attivazione costitutiva del recettore con la conseguente formazione di neuroblastomi (Bargmann et al., 1986). Sebbene non occorra spontaneamente, una simile mutazione del gene umano *c-erbB2* provoca dimerizzazione e capacità trasformante aumentate (Segatto et al., 1988). In alternativa, una overespressione di ErbB-2 può promuovere la formazione del tumore come risultato di una etero-dimerizzazione con altri recettori ErbB, sia essa spontanea o promossa da ligando. A conferma di

questo sta l'evidenza che per ottenere la trasformazione mediata da *neuT* è necessaria la sua espressione congiunta con un altro membro ErbB (Zhang et al., 1996). La maggior parte dei tumori al seno, al polmone, dell'ovaio e della pelle esprimono ErbB-3 e/o ErbB-4; l'etero-dimerizzazione di questi due recettori con ErbB-2 è coinvolta in alcuni tipi di cancro come il carcinoma a cellule squamose e il medulloblastoma infantile. Molti tumori in cui si ha espressione del recettore ErbB-2 presentano parallelamente l'espressione di ErbB-1 e di uno dei suoi ligandi ed, in alcuni casi, si è osservato come la perdita di funzione di ErbB-2 inibisca la proliferazione delle cellule tumorali. Il potenziale trasformatore di ErbB-2 all'interno di un etero-dimero è da correlarsi ad un'amplificazione del segnale per mezzo di uno spegnimento dei meccanismi di attenuazione. La rapida internalizzazione del complesso recettore-ligando in genere pone fine al segnale attraverso l'indirizzamento di questi alla degradazione intracellulare. Il processo è avviato sulla superficie cellulare da proteine che legano i recettori ErbB in vescicole della membrana plasmatica ricoperte di clatrina. L'endocitosi, accelerata dalle due ubiquitina ligasi E3, chiamate c-Cbl e Nedd4, termina con la degradazione dei recettori attivi nei lisosomi. ErbB-2 ha un tasso di endocitosi relativamente basso e può ridurre il tasso di internalizzazione e successiva degradazione di ErbB-1, aumentando anzi la velocità con cui quest'ultimo viene riutilizzato (Lenferink et al., 1998).

Ad oggi il meccanismo molecolare attraverso cui l'espressione della proteina viene deregolata nello sviluppo tumorale non è chiaro. Non sono stati identificati ligandi diretti per il recettore, anche se la famiglia di proteine HRG/NDF/gp30 (eregulina $\beta 1$) è tra i possibili candidati (Hynes and Stern, 1994). Per quanto riguarda l'interazione con altre proteine della via del segnale, si è visto che l'attivazione di ErbB-2 è correlata con quella di altre componenti, come PLC γ (Fosfolipasi C γ), la protein chinasi C, Src, Shc e il complesso Grb2/SOS, direttamente associato con Ras.

In uno studio è stato dimostrato che HER2/*neu* è una proteina che lega la calmodulina e che la calmodulina stessa può avere un ruolo nella regolazione di questo recettore e nella via di trasduzione del segnale. (Li et al., 2004).

Inoltre il livello aumentato di proteina c-Myc in una linea stabile di cellule provenienti da un carcinoma ovarico overesprimenti ErbB-2 ha suggerito un ruolo per questo recettore nell'espressione di c-Myc. Un'analisi di cellule overesprimenti ErbB2 stimulate con eregulina $\beta 1$ (HRG) ha rivelato un'aumento dei livelli proteici di c-Myc senza però un corrispondente aumento del messaggero che lo codifica o l'evidenza di un incremento della sua emivita. Gli autori hanno dimostrato che la regione leader del messaggero di c-Myc è l'elemento in cis responsabile per la sua traduzione e che HRG in cellule over-esprimenti ErbB2 porta ad un'aumentata sintesi di c-Myc attraverso l'attivazione delle vie della chinasi PI3/Akt/mTOR. (Galmozzi et al., 2004).

5.3 TRASTUZUMAB, UN ANTICORPO MONOCLONALE APPROVATO PER LA TERAPIA CONTRO IL CANCRO AL SENO.

Il trattamento del cancro al seno, vista la natura sistemica della malattia, è basato su una combinazione di approcci tra cui la chirurgia, la radioterapia, la terapia ormonale e la chemioterapia. In molti casi però, soprattutto nelle fasi avanzate, il cancro non risponde in maniera soddisfacente ai trattamenti convenzionali. I maggiori ostacoli nella cura dei pazienti affetti da questo tipo di tumore sono da imputarsi allo sviluppo di resistenza ai farmaci e alla mancanza di selettività dei trattamenti. Gli agenti principali utilizzati nella lotta contro il cancro al seno hanno effetti citotossici ma non sono selettivi, distruggendo oltre alle cellule cancerose anche i tessuti sani.

L'alta frequenza di over-espressione di ErbB-2 sulla superficie cellulare di cellule trasformate nel cancro al seno (una posizione che rende le molecole accessibili agli anticorpi), ha permesso lo sviluppo di terapie biologiche che hanno come bersaglio la proteina stessa.

Come primo approccio di terapia anti-HER2 sono stati sviluppati anticorpi monoclonali di origine murina che legano specificamente la porzione extracellulare di ErbB-2. Molti di questi anticorpi erano in grado di inibire la crescita di cellule HER2-positive sia *in vitro* che *in vivo*, ma non avevano effetto sulle cellule tumorali HER2-negative (Lewis et al., 1993; Sarup et al., 1991). Inoltre la somministrazione a lungo termine di questi anticorpi in esseri umani era limitata dallo sviluppo di anticorpi umani neutralizzanti gli anticorpi estranei nei pazienti trattati.

Per superare questo problema, il più attivo fra gli anticorpi monoclonali murini, il 4D5, è stato umanizzato, producendo una molecola ricombinante che consiste nelle regioni anticorpali murine deputate al riconoscimento di ErbB-2, inserite nella struttura di un'anticorpo umano generico (Carter et al., 1992). Studi successivi hanno dimostrato che l'anticorpo monoclonale IgG1 risultante, il Trastuzumab (Genentech, San Francisco, CA) detto anche Erceptin, possedeva *in vitro* proprietà simili a quelle degli anticorpi parentali: alta affinità per ErbB-2, soppressione specifica della crescita delle cellule tumorali HER2-positive, ed effetti sinergici in combinazione con altri agenti chemioterapici come il Paclitaxel, la doxorubicina e la cisplatina (Baselga et al., 1998).

Il meccanismo d'azione dell'Erceptin nell'inibire la crescita cellulare e la divisione cellulare nel cancro al seno non è ancora del tutto chiaro. Il farmaco potrebbe agire attraverso diversi meccanismi. Il legame dell'Erceptin induce un'alterazione nella regolazione del recettore sulla membrana cellulare (figura 11) (Hudziak et al., 1989) che risulta in un'espressione ridotta dei livelli di ErbB-2 sulla superficie della cellula tumorale, inibendone la velocità di crescita e revertendone il "fenotipo maligno".

L'Erceptin può anche interferire più direttamente con le proprietà del segnale del recettore, alterando i segnali trasmessi al nucleo attraverso la cascata del segnale tirosina-chinasica. Un altro possibile meccanismo è avvalorato dall'osservazione che l'Erceptin è un potente attivatore della citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (Pegram et al., 1997). Questo meccanismo immunomediato gioca un ruolo nelle risposte cliniche, ma non spiega gli effetti inibitori del farmaco sulla crescita osservati *in vitro* in

assenza di cellule responsabili della risposta immune. In combinazione con la chemioterapia l'Erceptin può avere l'effetto di aumentare la citotossicità cellulare indotta dai chemioterapici attraverso l'inibizione dei meccanismi di riparo del DNA.

Figura 9: Funzionamento dell'Erceptina



Cellula normale

Cellule normali esibiscono il recettore sulla superficie cellulare. Questi recettori giocano un ruolo nella divisione e nella moltiplicazione cellulare.

Cellula cancerosa che overesprime HER2

Le cellule cancerose che overesprimono il gene per la proteina HER2 producono recettori extra e presentano una più alta densità di proteina sulla membrana. Approssimativamente il 25-30% dei casi di cancro al seno si ha overespressione di HER2.

Herceptin™ (Trastuzumab)

Si pensa che l'erceptina legghi numerosi siti recettoriali sulla superficie cellulare, bloccandoli e inibendo le vie di trasduzione del segnale mediate da HER2.

L'Erceptin è stata approvata dalla FDA (Food and Drug Administration) per uso clinico nel 1998 negli USA, successivamente in Europa ed in Giappone è disponibile dal 2001.

In generale la terapia appare sicura e ben tollerata, anche se sono stati riportati casi di disfunzioni cardiache e respiratorie emerse in seguito all'amministrazione del farmaco. Tra gli effetti clinicamente avversi sono stati registrati anche casi di ipotensione (7,4% dei pazienti), ipossia (3,7%), tossicità di grado 1-2 con conseguente febbre (11,1%) e diarrea (3,7%). In questo studio si dimostrava anche come la terapia ad agente singolo provocasse in certi pazienti una risposta duratura, ma priva di efficacia (Sawaki et al., 2004).

In occasione della conferenza "*Primary Therapy in Early Breast Cancer*" (Svizzera, Marzo 2009) sono stati presentati nuovi dati di uno studio ancora in corso, denominato HERA. Tali dati hanno messo in evidenza i risultati positivi ottenuti dopo il trattamento con trastuzumab (Herceptin) a distanza di anni.

Lo studio HERA (HERceptin Adjuvant), un trial internazionale di fase III condotto in collaborazione fra il Breast International Group e la Roche, ha arruolato oltre 5000 donne e ha confrontato un anno di trattamento adiuvante (dopo l'intervento chirurgico) con trastuzumab, verso placebo con un follow up medio di 4 anni. Lo studio HERA è tuttora in corso e i risultati finali sono previsti per il 2011, finora i risultati hanno evidenziato che a distanza di 4 anni, circa il 90% delle donne trattate con trastuzumab erano ancora in vita e che quasi il 79% delle donne che hanno ricevuto trastuzumab è rimasta libera dalla malattia. Ad oggi, quattro studi su vasta

scala - HERA, NSABP B-31, NCCTG N9831 e BCIRG 006 - hanno ripetutamente dimostrato che trastuzumab prolunga il tasso di sopravvivenza nelle donne affette da carcinoma mammario HER2 positivo in stadio iniziale.

Nel 2008 il farmaco ha generato vendite per 4,41 miliardi di dollari. Adesso dovrà fronteggiare un nuovo competitore, Lapatinib (Tyverb ®, GSK), sviluppato da GlaxoSmithKline, un farmaco molto promettente, ma non ancora accettato dall'SMC in quanto i costi di produzione risultano ancora troppo alti rispetto ai benefici previsti (<http://www.scottishmedicines.org.uk/>).

Il Lapatinib è un'inibitore dei domini inter-cellulari della tirosin-chinasi di entrambi i recettori, EGFR (ErbB1) e HER2 (ErbB2), che inibisce la crescita delle cellule tumorali *in vitro* e in modelli animali. Gli effetti di inibizione del Lapatinib sono stati valutati in combinazione con il trattamento con trastuzumab. Per il momento questo medicinale è stato autorizzato con un'approvazione di tipo "condizionale" così chiamata perché necessita di ulteriori aggiornamenti che l'EMA (European Medicines Agency) analizzerà ogni anno prima dell'effettiva autorizzazione, l'ultima fase di sperimentazione clinica è prevista per il Maggio 2013.

5.4 SCFV NELLA LOTTA AL CANCRO.

Un numero di fattori determina l'abilità di una molecola anticorpale di penetrare ed essere trattenuta all'interno di una massa tumorale che esprime un certo antigene. Alcuni fattori sono indipendenti dalla natura dell'anticorpo, ad esempio il tipo di tumore (solido o diffuso), l'abbondanza relativa dell'antigene sia nei tessuti cancerosi che in quelli normali, ed il grado di necrosi del tumore. In altri casi, proprietà intrinseche dell'anticorpo come l'affinità, la dimensione, la valenza hanno un ruolo diretto nell'interazione con le masse tumorali, e concorrono nel decretare il successo di una terapia basata sugli Abs.

Al confronto dell'immunoglobulina IgG intera, gli scFv sono molecole relativamente piccole (25-30 kDa) e questa caratteristica permette loro di diffondere rapidamente all'interno dei tumori solidi.

Ad oggi, sono stati sviluppati numerosi scFv che hanno come bersaglio molecole associate con i processi di cancerogenesi. Esempi sono costituiti da scFv contro l'oncogene *ras* (Werge et al., 1990), e da un altro scFv specifico per l'oncogene *c-myc* (Kasono et al., 1998), over-espresso nella leucemia mieloide, nel cancro al seno e al colon, nei neuroblastomi e nei melanomi.

6 PATOGENESI DELLA MALATTIA DI ALZHEIMER

La malattia di Alzheimer è la forma più frequente di demenza pre-senile o senile, caratterizzata da una progressiva perdita, prima della memoria, poi di altre funzioni cognitive, fino all'incapacità di assolvere in modo autonomo le funzioni più elementari.

L'AD è stata denominata così nel 1906, quando il Dr. Alzheimer analizzò sezioni di cervello di donne morte a causa di una malattia mentale sconosciuta. Egli notò delle strutture anormali, in seguito denominate placche amiloidi, e grovigli di neurofibrille (Alzheimer, 1907). Alzheimer non fu il primo a descrivere gli aspetti clinici della malattia né il primo a descrivere le placche (Redlich, 1898), ma sembra sia stato il primo a descrivere i grovigli e prese il suo nome in quanto fu il primo a descriverla come una malattia ben distinta da altre forme di demenza senile.

I primi casi autosomici dominanti di malattia di Alzheimer (AD) furono descritti da Schottky (1932), Van Bogaert and Maert (1940), and Essen-Moller (1946).

La rapida e crescente diffusione del morbo nella popolazione, e l'assenza di una valida terapia la rendono una delle patologie con impatto sociale più grave al mondo, per questo la ricerca di una terapia in questo campo si pone come obiettivo fondamentale negli studi ad esso correlati (Hardy and Selkoe, 2002; Dodel et al., 2003; Cummings, 2004; Mattson, 2004; Tanzi et al., 2004 and De Strooper, 2003).

Secondo uno studio della Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health di Baltimora, in Italia ne soffrono circa 800.000 persone, con una netta prevalenza di donne, dovuta a una vita media più lunga rispetto agli uomini (Bianchetti et al., 2010).

Generalmente la malattia, si presenta in tempi e modi che differiscono da paziente a paziente, esistono però delle fasi cui corrispondono dei sintomi che generalmente si trovano associati in tutti i casi di malattia.

La malattia viene spesso anticipata dal cosiddetto *mild cognitive impairment* (MCI), una lieve diminuzione delle prestazioni del paziente, in genere riguardanti la memoria, l'orientamento o le capacità verbali. Dopo questo primo campanello d'allarme, iniziano a manifestarsi le fasi iniziali della malattia vera e propria.

La prima fase si manifesta con una demenza caratterizzata da amnesia progressiva, generalmente circoscritta a semplici episodi di vita quotidiana, quali per esempio deficit di memoria, riguardanti azioni compiute durante il giorno, man mano poi il deficit aumenta e inizia a colpire la cosiddetta memoria retrograda, riguardante fatti di vita privata o eventi pubblici del passato. Insieme a questa si aggiunge la perdita di memoria semantica, ossia delle conoscenze acquisite nel tempo; nella fase intermedia, si inizia invece a dimenticare la memoria procedurale, ossia la capacità di compiere azioni in maniera automatica. Da questo momento in poi iniziano a sopraggiungere problemi di linguaggio, ricerca di parole, e disorganizzazione delle parole contenute nelle frasi che dunque iniziano a perdere significato logico. Si iniziano ad avere difficoltà riguardanti le attività lavorative, la guida di un'automobile, cucinare, gestire i propri soldi, tutte attività che iniziano a richiedere l'assistenza di un'altra persona.

Nelle fasi intermedie avanzate, possono manifestarsi anche problematiche

comportamentali, ripetizione di movimenti, vagabondaggio, disorientamento nel tempo e nello spazio, ansia, depressione e anche allucinazioni. Ai deficit comportamentali delle fasi avanzate, si aggiungono infine complicanze di tipo medico che compromettono la salute.

E' bene sottolineare che il problema della malattia riguarda in prima persona il malato, ma anche tutti coloro che lo circondano, è infatti una delle malattie più difficili da gestire.

Le cause della malattia sono ancora sconosciute. Nel 90-95% dei casi è sporadica e in una percentuale variabile tra il 5 e il 10 % la malattia può essere ereditaria.

A tutt'oggi non esistono indagini od analisi che consentano di confermare la diagnosi di Alzheimer.

Solo l'esame istologico del cervello mostra la presenza di placche amiloidi, reperto tipico della malattia. In ogni caso vengono utilizzati: esami di laboratorio, test neuropsicologici e tutta una serie di indagini sperimentali quali risonanza magnetica (RM), tomografia assiale computerizzata (TC), tomografia computerizzata mediante emissione di fotone singolo (SPECT) e in rari casi la tomografia per emissione di positroni (PET).

L'RM permette di ottenere un'immagine della struttura del cervello estremamente particolareggiata, sovrapponendo un'immagine con quella ottenuta qualche mese dopo, esiste la possibilità di riscontrare qualche cambiamento relativo alla fase iniziale della malattia.

La TAC, misura lo spessore di una parte del cervello, che rapidamente si assottiglia nei malati di AD.

La SPECT, misura il flusso del sangue nel cervello, tale misurazione indica l'inizio o no della malattia, in quanto è stato riscontrato che tale flusso è ridotto nei malati.

Infine la PET, il cui utilizzo è spesso limitato ai centri di ricerca, questa metodologia, può evidenziare cambiamenti nel modo in cui il cervello funziona, per esempio può evidenziare un abnorme utilizzo del glucosio da parte del cervello.

Attualmente le ricerche nel campo della diagnostica sono molto diffuse e si sono ottenuti discreti risultati negli ultimi anni. Recentemente è stato evidenziato un rapporto diretto tra due anticorpi specifici e i sintomi del morbo di Alzheimer, aumentando le speranze che un semplice esame del sangue possa diagnosticare per tempo questa malattia devastante (Jennifer et al., 2009). La concentrazione di due specifiche proteine è coinvolta nell'aumentata risposta immunitaria man mano che la gravità della demenza aumenta, ciò potrebbe permettere di sviluppare un esame del sangue che possa diagnosticare il morbo di Alzheimer o potenzialmente identificare se qualcuno è a più alto rischio di contrarre la malattia.

Sempre in tema di ricerca diagnostica, un altro gruppo di studiosi, molto di recente, ha messo in evidenza una connessione molto importante tra la produzione energetica del cervello e lo sviluppo della malattia (Vlassenko et al.,2010). Secondo questo gruppo di scienziati, esiste una relazione specifica tra la presenza di placche amiloidi e il processo di glicolisi aerobica, di cui si servono le cellule cerebrali per convertire il glucosio in energia. Ciò potrebbe permettere di mettere a punto degli screening specifici per una diagnosi precoce dell'Alzheimer.

6.1 BASI MOLECOLARI DELLA MALATTIA

Dall'analisi istochimica *post mortem* di cervelli affetti da AD, sono state messe in evidenza numerose anomalie: perdita di sinapsi, diminuzione di corpi cellulari neuronali e presenza di placche senili extracellulari e di grovigli neurofibrillari o NFT (neurofibrillary tangles) intracellulari.

Le aree del cervello che sono colpite inizialmente sono la corteccia entorinale e l'ippocampo, successivamente i lobi parietali e temporale subiscono una neurodegenerazione.

Gli ammassi neurofibrillari, sono composti da filamenti elicoidali appaiati (paired helically wound protein filament o PHF) situati nel citoplasma dei corpi cellulari, dei dendriti, dei neuroni e degli assoni. I filamenti elicoidali sono costituiti principalmente di una proteina microtubulo-associata (MAP) chiamata proteina *tau* e coinvolta nel trasporto assonale, il rilascio della proteina dai microtubuli, priva le cellule del suo effetto stabilizzante e da ciò ne derivano anche anomalie nel trasporto assonale. All'interno degli NFT Tau è presente in forma iperfosforilata (Selkoe., 2004), mutazioni del gene tau, sul cromosoma 17 causano demenza frontotemporale familiare con parkinsonismo.

Le placche senili sono composte principalmente dal peptide β -amiloide o A β .

I peptidi amiloidei, comprendono un gruppo eterogeneo di 39-43 residui aminoacidici, caratterizzati da discreta struttura terziaria e da un'elevata propensione a formare aggregati insolubili nell'organismo. I peptidi amiloidi e β -amiloidi sono il prodotto di due vie cataboliche della stessa molecola, mentre il primo, presente nelle persone sane, è solubile e dunque eliminabile, il secondo, tipico dell'Alzheimer è insolubile e si deposita in placche. Le placche possono essere di due tipi, placche diffuse o placche compatte (placche senili, placche neuritiche), quest'ultime sono probabilmente responsabili dei cambiamenti neurodegenerativi. Nelle placche diffuse A β è presente in uno stato amorfo mentre nelle placche senili forma aggregati di forma filamentosa, insolubili ed evidenziabili con coloranti Rosso Congo e trioilavina. Le placche diffuse, diversamente dalle placche neuritiche, non sono associate a neuriti distrofici, astrociti reattivi o micoglia attivata. Queste placche compaiono molto precocemente nei soggetti Down e possono essere presenti anche in soggetti anziani normali.

Il peptide β -amiloide (A β), principale componente delle placche senili, si forma a partire dalla proteina precursore dell'amiloide (APP, Amyloid precursor protein), una glicoproteina transmembrana di tipo 1, con funzioni di adesione e integrità della membrana. APP ha la tipica struttura di una proteina integrale di membrana, è composta da un largo dominio extracellulare aminoterminale, da un dominio transmembrana e da un dominio intracellulare all'estremità carbossilica. Il gene codificante l'APP è stato localizzato sul braccio lungo del cromosoma 21 ed è espresso nel cervello ed in altri tessuti non neuronali.

La produzione di A β avviene per opera di due enzimi: β -secretasi e γ -secretasi (De Strooper et al. 1998; Wolfe et al 1999; Vassar et al. 1999), che operano una serie di tagli all'APP generando la forma insolubile (β -amiloide), la quale si deposita aggregandosi in placche (Selkoe, 2004). Il

taglio mediato da un altro enzima, l' α -secretasi, genera invece un prodotto non tossico o addirittura neurotrofico.

Il meccanismo di formazione può essere spiegato brevemente così; la β -secretasi è l'enzima che crea l'estremità N-terminale di $A\beta$, la scissione di APP da parte di β -secretasi libera un frammento solubile $sAPP\beta$ e lascia un frammento C-terminale di 12 kDa nella membrana. Questo frammento C-terminale di 99 residui aminoacidici è il substrato dell'attività della γ -secretasi, che rilascia $A\beta$ 1-40 e $A\beta$ 1-42.

La forma $A\beta$ 42 ha una maggiore propensione a formare gli aggregati fibrillari riscontrabili nel cervello di soggetti AD (Iwatsubo T. et al. 1994), e si ipotizza che sia quindi la forma più patogena, paragonata alla forma più comune, ma meno prona alla fibrillogenesi $A\beta$ 40.

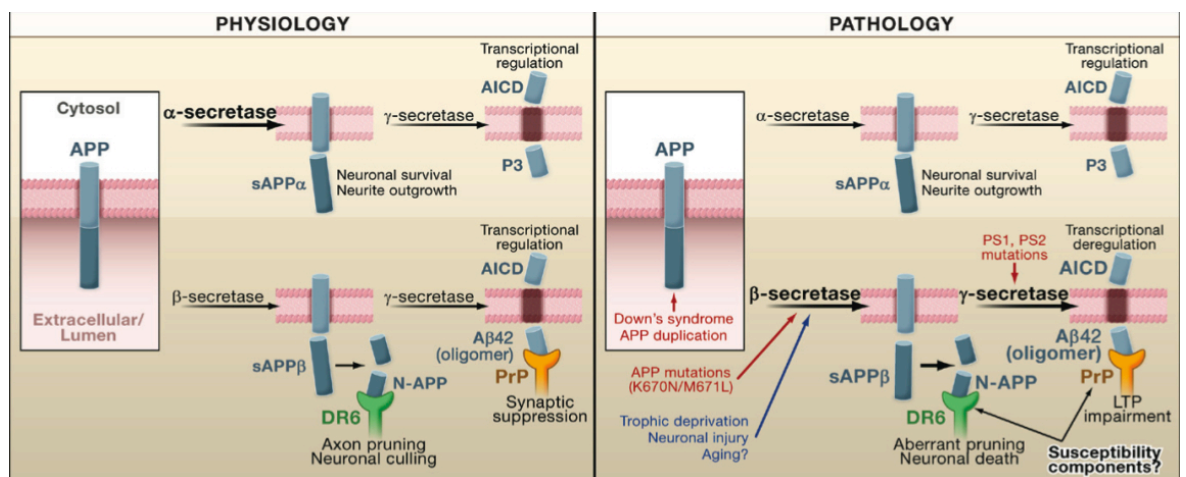


Figura 9. Processamento di APP in fisiologia e patologia (adattata da Kim & Tsai 2009).

Studi condotti su pazienti con malattia di Alzheimer familiare (FAD), che è una forma rara, ma aggressiva di AD, hanno mostrato un ruolo per il processamento di APP nella patogenesi.

Tutte le mutazioni che causano AD precoce (60-65 anni) sono localizzate nel gene di APP o nei geni che codificano le proteine del nucleo catalitico del complesso γ -secretasi, presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2), con l'effetto finale di incrementare un processamento di tipo β e/o la produzione di $A\beta$ 42 (Price et al., 1998). Forme familiari di AD sono determinate anche dall'aumento dell'espressione dell'APP.

Individui affetti da sindrome di Down, che presentano dunque una copia extra del gene di APP sul cromosoma 21, sviluppano una demenza identica alla patologia di Alzheimer (Price et., al 1998)

Purtroppo non si conosce il numero preciso di geni implicati nell'AD e neanche la loro identità, si sa però che la loro combinazione pone le basi per la predisposizione alla malattia e per l'età in cui si manifesterà (Gatz M. et al 2006). Nonostante siano stati condotti numerosi lavori di ricerca, allo scopo di individuare geni coinvolti nell'AD, attualmente tre sono i migliori candidati: APP, PSEN1 e PSEN2.

Il gene dell'APP (il precursore dell'amiloide), sul cromosoma 21, la cui mutazione come abbiamo precedentemente esposto, porta ad un aumento della produzione di questa proteina. Questo dato giustifica l'elevatissima prevalenza della malattia di Alzheimer nella sindrome di Down (trisomia del cromosoma 21) (Esler et al., 2001). Il gene della Presenilina 1, situato sul cromosoma 14, la cui mutazione aumenta l'attività delle secretasi β e γ e risulta responsabile del 4% dei casi precoci di malattia (con età d'insorgenza tra 28 e 50 anni). Il gene della Presenilina 2, sul cromosoma 1, responsabile del 1% dei casi con insorgenza tra 40 e 50 anni (Athas et al., 2002). Le mutazioni della presenilina aumentano i livelli di γ secretasi e sono associate ad una forma aggressiva ed ereditaria della malattia di Alzheimer.

Tra questi geni, il polimorfismo per l'allele $\epsilon 4$ del gene dell'apolipoproteina E (APOE) è stato dimostrato influenzare consistentemente il rischio di sviluppare la malattia e l'età della comparsa (Strittmatter W.J et al. 1993; Bertram L. et al. 2007). Recentemente, al polimorfismo APOE è stato affiancato un altro gruppo di nove geni che potrebbero predisporre alla comparsa della malattia (Beecham et al., 2009). In questo lavoro, 550 mila variazioni genetiche sono state analizzate in circa 500 pazienti con l'Alzheimer e 500 persone sane, da ciò sono state identificate una serie di alterazioni genetiche che sono presenti soltanto nei malati, e che potrebbero quindi predisporre alla comparsa della malattia. Tra le variazioni osservate ve ne è anche una che era già sospettata; una variazione del gene per il VDR, il recettore della vitamina D (Gezen et al., 2007; Przybelski et al., 2007), che si trova sul cromosoma 12, può predisporre alla demenza, ed in effetti nei malati si trovano bassi livelli di vitamina D.

6.2 INDIRIZZI TERAPEUTICI ATTUALI

Ancora non esiste una terapia specifica che possa fermare o far regredire i sintomi della malattia.

Attualmente si utilizzano dei farmaci inibitori della colinesterasi, ossia l'enzima che distrugge l'acetilcolina, una sostanza carente nei malati di AD. La neurodegenerazione e la perdita di dendriti causata dalla presenza di placche di β -amiloide produce, infatti, una diminuzione nella produzione di acetilcolina. Una perdita compresa tra 60-90% dell'attività colinergica è responsabile del deficit cognitivo e della perdita delle funzioni mnestiche.

Nella malattia di Alzheimer si osserva anche una diminuzione tra 50-70% dell'attività serotoninergica, somatostatina 40-60% e norepinefrina 30-70% (Cummings et al., 2001).

Il trattamento sintomatico della Malattia di Alzheimer è centrato sull'aumento della neurotrasmissione con un aumento delle scorte colinergiche. Il blocco dell'acetilcolinesterasi, l'enzima che elimina l'acetilcolina dalle sinapsi, si è dimostrato l'intervento di maggiore successo.

Tacrina, donepezil, rivastigmina e galantamina, tutti inibitori dell'acetilcolinesterasi, si sono dimostrati efficaci nel ritardare la progressione della malattia. Tra questi farmaci la Fisostigmina, la

Galantamina e la Neostigmina sono stati i primi ad essere stati utilizzati, attualmente però l'interesse è diretto su inibitori reversibili dell'acetilcolinesterasi, quali la Rivastigmina e la Galantamina stessa.

Attualmente è in commercio la Memantina, che ha dimostrato una buona attività terapeutica nella riduzione parziale del deterioramento cognitivo in pazienti con AD che va da moderato a grave.

a questa lista dobbiamo aggiungere, la Tacrina, oggi non più in commercio perché risultata epatotossica, e il Donepezil, inibitore non competitivo dell'acetilcolinesterasi.

Altri farmaci che trovano impiego nell'Alzheimer sono alcuni neurolettici atipici ed alcuni antiepilettici, il loro utilizzo trova applicazione nella gestione dei problemi comportamentali.

Una promettente alternativa ai farmaci, scoperta casualmente da poco e ancora da verificare, potrebbe essere rappresentata da una luce laser, in grado di identificare le placche β -amiloidi e in particolari condizioni di arrestare la loro crescita (Ozawa et al., 2009). Questi ricercatori, stavano studiando i depositi di amiloide, marcando le placche con un indicatore fluorescente, la tioflavina, che mostra affinità per l'amiloide. Successivamente l'amiloide marcato può essere rilevato con la luce laser. A questo punto non è ancora chiaro se la tioflavina, attivata dal laser, possa essere in grado di trasferire parte della sua energia all'ossigeno dei tessuti formando un composto capace di degradare le strutture proteiche o se il compito sia accreditabile semplicemente alla luce laser. Per arrivare ad una reale applicazione della scoperta saranno necessari molti studi per verificarne sicurezza, praticabilità *"in vivo"* ed efficacia, ma l'approccio rimane senza dubbio estremamente innovativo.

Molto interessanti sono anche le terapie non farmacologiche che generalmente si utilizzano come ausiliari ai farmaci, queste hanno lo scopo di preservare, potenziare, sviluppare quelle competenze carenti nel paziente Alzheimer. Dalla ROT alla musicoterapica, dalla danza agli esercizi di rilassamento ancora non è ben chiaro il loro effettivo beneficio sebbene vengano spesso riferiti dei giovamenti da parte dei familiari dei pazienti.

6.3 mAB E scFvs NELLA LOTTA CONTRO LA MALATTIA D'ALZHEIMER

L'utilizzo di anticorpi, per la terapia di Alzheimer, rappresenta un'ottima alternativa ai comuni sistemi farmacologici e di ricerca esposti precedentemente. Il farmaco per la cura della malattia, potrebbe infatti essere sostituito da un semplice anticorpo, diretto contro i componenti principali coinvolti nell'AD, e potrebbe rimuovere tutte le strutture anomale che vengono a formarsi. Inoltre, l'anticorpo ricombinante specifico contro un preciso target, potrebbe fornire indicazioni sul meccanismo di formazione delle placche senili e sul comportamento delle componenti principali che influenzano la malattia di Alzheimer.

Importanti progressi sono stati ottenuti, utilizzando i cosiddetti "neuroantibody" (Cattaneo et al., 2008) ossia l'espressione di anticorpi

ricombinanti nel SNC in grado di interferire con le funzioni neuronali. L'uso di questa nuova strategia sperimentale ha permesso di dimostrare che, interferire specificamente con la funzione degli NGF (Nerve growth factor) nel Sistema Nervoso Centrale adulto permette di studiare e analizzare le caratteristiche principali della malattia di Alzheimer (AD), tra cui placche amiloidi, deficit colinergico, perdita neuronale, grovigli neurofibrillari e anomalie tau, così come deficit sinaptici e comportamentali. Questo lavoro ha permesso di studiare il meccanismo di neurodegenerazione AD nel cervello dei roditori.

Attualmente quattro anticorpi monoclonali diretti contro differenti target sono in fase di sperimentazione clinica: il Bapineuzumab (la versione umanizzata de 3D6 dell' ELAN/WYETH) in fase III, l'LY2062430 (versione umanizzata del m266) di proprietà dell' Eli Lilly è in fase II, l'RN-1219 della Pfizer/Rinat in fase I e l'R-1450, un anticorpo contro le placche A β (Lichtlen and Mohajeri, 2008).

Il Bapineuzumab (AAB-001) è un anticorpo monoclonale che sembra ridurre in maniera significativa le placche senili, il limite di questo anticorpo è che dovrà essere somministrato durante gli stadi iniziali della malattia, per questo è necessario individuare dei marcatori biologici in grado di identificare la malattia ai primissimi stadi di sviluppo.

l'LY2062430 conosciuto anche come solanezumab, è un anticorpo monoclonale anti- β -amiloidi e sembra ridurre la progressione delle placche nei malati di AD, così come l'R-1450.

Infine l'RN1219, è un anticorpo C-terminale anti A β che oltre a ridurre le placche senili ha anche la funzione di migliorare l'attività cognitiva nei malati d' Alzheimer.

Uno studio iniziato nel 2004 (Dodel RC et al, J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004), ha identificato un anticorpo per il trattamento della malattia, attualmente in fase III di sperimentazione. Tale studio è stato condotto, somministrando a pazienti un'immunoglobulina umana l'IVIgG, per endovena, la gammagard, una o due volte al mese per un anno e mezzo. Lo studio del cervello effettuato con la risonanza magnetica ha mostrato che l'atrofia dei soggetti trattati si era fermata nell'1,6% contro il 2,2 % del gruppo di controllo. Lo studio ha anche mostrato che nei soggetti trattati non c'era la perdita di capacità che si è riscontrata negli altri. Attualmente è in atto uno studio in fase III, su un gruppo di pazienti più vasto, e nell'Aprile 2010 sono stati presentati alla riunione annuale presso l'American Academy of Neurology (AAN) nuovi dati riguardanti tale immunoglobulina denominata GAMMAGARD.

Sfortunatamente, la somministrazione di anticorpi monoclonali anti-Ab, ha riportato in pazienti trattati fenomeni infiammatori gravi come la microemorragia cerebrale (Pfeifer et al., 2002), mentre in altri casi possono non riuscire nella loro funzione se non riescono a superare le zone del cervello protette dalla barriera ematoencefalica (Banks et al., 2002) . Alla luce di ciò molte ricerche si stanno evolvendo nell'utilizzo di anticorpi ingegnerizzati quali scFvs (Frenkel et al., 2000; Liu et al., 2004; Fukuchi et al., 2006; Solorzano-Vargas et al., 2008; Yue et al., 2008). Tali frammenti anticorpali, infatti presentano una maggiore specificità di legame e la loro

piccola taglia permette una facile penetrazione nelle aree del cervello danneggiate, come le placche senili.

Molto progresso dunque è stato fatto in questo senso e molte ricerche sono rivolte all'analisi di scFvs in grado di interferire con le principali componenti della malattia. Tra gli studi più significativi troviamo un ScFv, denominato 508 (Fv), costruito a partire dal gene parentale del peptide anti-b-amiloide (IgM 508). Questo frammento anticorpale esibisce proprietà anti-aggreganti, e favorisce la disaggregazione delle placche e previene i loro effetti tossici su culture cellulari PC-12A (Danet al 1999).

Numerosi scFvs anti- β -amiloidi sono stati prodotti molto recentemente. Liu et al., 2004 hanno dimostrato che un ScFv può impedire l'aggregazione in un sistema cell-free (Liu et al., 2004) inibendo successivi stati di tossicità nelle cellule neuronali, un 'altro scFv è stato prodotto da Paganetti et al., 2005, che hanno dimostrato la capacità di tale ScFv, nello spazio intracellulare di inibire il taglio dell'APP e prevenire in tal modo la formazione delle placche. Recentemente Andleeb et al. hanno prodotto un ScFv anti-A β , in grado di riconoscere solo gli aggregati proteici, questo potrebbe rappresentare un buon sistema sia in diagnostica che in terapia. Un ulteriore progresso è stato fatto mediante l'utilizzo della tecnica IACT ("Intracellular Antibody Capture Technology", che ha permesso di indentificare una serie di scFv anti-A β espressi in batterio, una volta purificati è stata analizzata la loro specificità e funzionalità in tessuti cerebrali *post-mortem* ed ha avuto un esito molto positivo, per il riconoscimento e il legame sia intra- che extra-cellulare. Tali risultati li rendono ideali per nuovi approcci sperimentali per lo studio e l'elaborazione di immagini sul traffico intracellulare di A β oligomeri. (Meli et al., 2009). Tra i seguenti frammenti anticorpali individuati e analizzati in questo lavoro, è compreso il scFvADDLs, oggetto del presente lavoro sperimentale.

*INTRODUZIONE AL LAVORO
SPERIMENTALE*

7- STRATEGIA PER LA COSTRUZIONE DEI VETTORI PLASMIDICI

Lo scopo del presente lavoro sperimentale era di esprimere due anticorpi ricombinanti (scFv800E6; scFvADDLs) nel sistema vegetale per la loro produzione su larga scala. In particolare si voleva esplorare la possibilità che tali proteine potessero essere rizosecrete e quindi purificate in maniera più semplice e meno costosa. Per far questo è stato necessario costruire diversi vettori plasmidici (fig 18)

Il vettore di espressione pBIN19::LeExt1.1-SP/PHY-OCS (Zimmermann et al., 2003), contenente la cassetta di rizosecrezione per il gene codificante la fitasi (PHY) è stato il punto di partenza per la costruzione dei successivi plasmidi. Il primo componente di questo grande inserto è un promotore delle cellule dei peli radicali di pomodoro LeExt1.1 (Bucher et al., 1997, 2002). La sequenza polipeptidica del gene corrispondente, una volta tradotta, ha rivelato che essa è una proteina simile ad un'estensina. Le estensine sono proteine implicate in vari processi, tra cui la formazione della parete cellulare vegetale. A valle del promotore si trova una cassetta composta dal peptide segnale della β -glucanasi di orzo (Leah et al., 1991) fuso al gene sintetico di una fitasi termotollerante PHY, costruito sulla base della sequenza di 13 fitasi fungine (Lehmann et al., 2000). La β -glucanasi è un polipeptide con proprietà antifungine in quanto degrada l' (1 $\rightarrow$ 3)- β -glucano delle pareti cellulari di questi organismi. Insieme alla chitina e ad una proteina che inattiva i ribosomi è stata trovata nei semi di orzo ed è responsabile con le altre della difesa della pianta dai patogeni. Il peptide segnale di questa proteina consiste di una sequenza composta da 28 residui. Immediatamente a valle del gene della fitasi si trova la sequenza terminatrice del gene dell'octopina sintetasi (OCS).

Nel presente lavoro sperimentale, il gene della fitasi è stato sostituito dai geni codificanti i scFvs di interesse.

Tuttavia essendo il plasmide pBIN19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS difficile da manipolare sia per la sua grande dimensione (~ 14Kb) che per la mancanza di siti di restrizione utili per l'inserimento dei scFvs, è stato deciso di trasferire l'intera cassetta nel vettore pUC19, di dimensioni più ridotte (4.5 Kb) e contenente siti unici, per manipolare in modo più agevole i costrutti.

Il plasmide intermedio così ottenuto (pUC19:: LeExt1.1-SP/PHY/OCS) è stato utilizzato per sostituire il gene PHY con i geni codificanti i frammenti anticorpali scFv800E6 e scFvADDLs.

7.1 VETTORI PER LO STUDIO D'ESPRESSIONE DEL scFv800E6

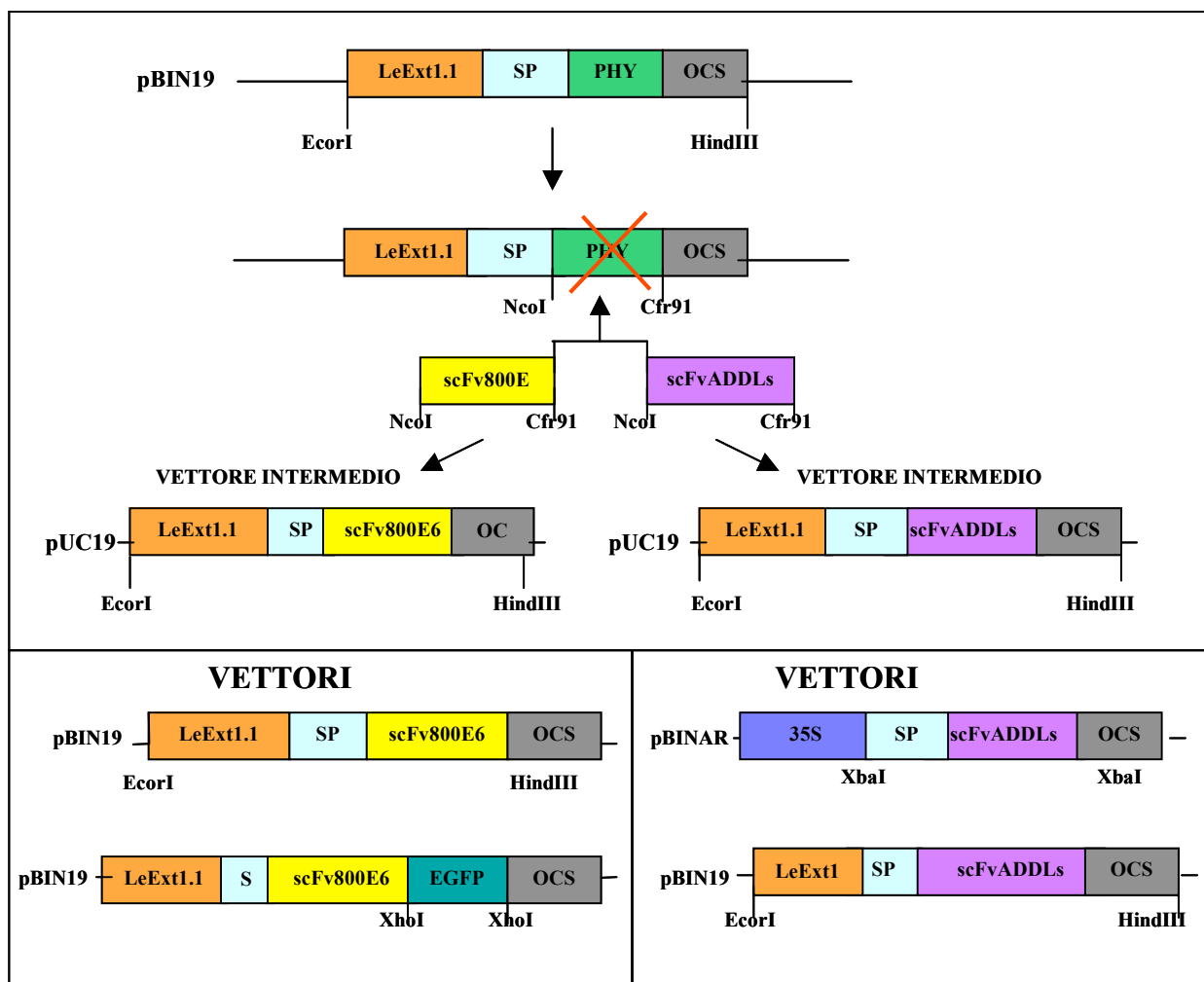
Dal momento che lo studio di espressione del scFv800E6 era focalizzato esclusivamente sulla possibilità di produrre questo scFv in radice e in particolare negli essudati radicali, dopo la costruzione del vettore intermedio pUC19::LeExt1.1-SP/800E6/OCS, la cassetta di rizosecrezione contenente il scFv800E6 è stata reinserita nel pBIN19. Il vettore pBIN19::LeExt1.1-SP/800E6/OCS è stato successivamente utilizzato per ottenere piante transgeniche. Per meglio analizzare il processo d'accumulo in radice e la rizosecrezione negli essudati radicali, il gene codificante la Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP) è stato inserito a valle del scFv800E6 sotto il

controllo dello stesso promotore LeExt1.1. La EGFP come è noto è ampiamente utilizzata come gene reporter in numerosi sistemi.

7.2 VETTORI PER LO STUDIO D'ESPRESSIONE DEL scFvADDLs

Per quanto riguarda il scFvADDLs, lo scopo principale era verificare la possibilità che tale anticorpo potesse essere espresso in pianta e successivamente ottenere piante transgeniche per la sua produzione su larga scala ottimizzando la metodologia di produzione e sfruttando il processo di rizosecrezione. Alla luce di questo è stato necessario costruire due vettori: il vettore pBINAR::35S-SP/ADDLs/OCS, ottenuto inserendo la cassetta contenente il peptide segnale (SP), la sequenza de scFv e la sequenza terminatrice (OCS) nel vettore pBINAR, sotto il controllo del promotore 35S (promotore pseudo-costitutivo di origine virale vegetale proveniente dal promotore 35S del virus del Cauliflower; Chua et al.,1985). Questo vettore è stato utilizzato sia per la trasformazione transiente che per la stabile. Infine è stato costruito il vettore pBIN19::LeExt1.1-SP/ADDLs /OCS per ottenere la sintesi in radice e possibilmente una proteina ricombinante rizosecreta.

Figura 18: Schema dei clonaggi e subclonaggi effettuati



8- STRATEGIE UTILIZZATE PER LA TRASFORMAZIONE DELLE PIANTE

L'espressione di proteine eterologhe nelle piante, come descritto precedentemente, può essere sia di tipo stabile (piante transgeniche) sia di tipo transiente.

Nel caso dell'espressione del scFv800E6, lo scopo era lo studio della rizosecrezione, o meglio la messa a punto di un sistema di produzione proteica in cui il scFv potesse essere accumulato in radice e secreto direttamente nel mezzo di crescita della pianta. Per raggiungere tale scopo avevamo bisogno di piante transgeniche, coltivabili in sistemi di crescita idroponica e areoponica. Tali piante sono state ottenute mediante trasformazione dei dischi fogliari con agrobatterio GV3101, in cui erano stati precedentemente inseriti il vettore pBIN19::LeExt1.1-SP/800E6-OCS e il vettore pBIN19::LeExt1.1-SP/800E6-EGFP-OCS entrambi aventi il promotore LeExt1.1 che promuove l'espressione in cellule dell'apparato radicale, e il peptide segnale SP che permette la secrezione dall'interno della cellula all'esterno, indirizzando le proteine nello spazio apoplastico.

Per quanto riguarda il scFvADDLs, la cui espressione in pianta non era mai stata ottenuta né studiata, è stato deciso di valutare entrambi i metodi di espressione, sia transgenico che transiente. Per questo, l'agrobatterio GV3101 trasformato con il vettore pBINAR::35S-SP/scFvADDLs/OCS contenente il promotore costitutivo 35S è stato utilizzato per entrambi i casi. Per l'espressione della proteina in radice è stato invece costruito il vettore pBIN19::LeExt1.1-SP/ADDLs/OCS, tale vettore sarà utilizzato in futuro per un'ulteriore trasformazione stabile delle piante.

Di seguito è mostrato uno schema riassuntivo delle trasformazioni effettuate su tessuto vegetale di diverso tipo (Fig 19)

Figura 19: Schema riassuntivo delle trasformazioni effettuate

	Piante transgeniche di <i>N.tabacum</i>	Piante transgeniche di <i>Solanum tuberosum</i>	Piante transienti di <i>N.tabacum</i>
<i>A.tumefaciens</i> pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6/OCS	×	×	
<i>A.tumefaciens</i> pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6/EGFP/OCS	×		
<i>A.tumefaciens</i> pBINAR::35S-SP/scFvADDLs/OCS			×

MATERIALI UTILIZZATI

Materiale vegetale:

- semi di *Nicotiana tabacum*, varietà Havana;
- semi di *Solanum tuberosum*

Ceppi batterici:

- *Escherichia coli* DH5 α ;
- *Escherichia coli* XL1-blu;
- *Agrobacterium tumefaciens* GV3101;

Plasmidi:

- pBin19::LeExt1.1-SP/PHY-OCS;
- pUC19;
- pIVEX2.4d::scFv800E6
- pAC-scFvADDLs
- pBINAR.

METODI

9 COSTRUZIONE DEI PLASMIDI INTERMEDI

9.1- COSTRUZIONE DEL PLASMIDE INTERMEDIO

pUC19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS.

Estrazione del DNA plasmidico.

Cellule di *E.coli* DH5 α contenenti il plasmide pBIN19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS (Zimmermann et al., 2003), sono state incubate per 16 ore a 37°C, 250 rpm in terreno LB (bactotryptone 1%, bacto yeast 0,5%, NaCl 1%, pH 7.5) in presenza dell'antibiotico Kanamicina ad una concentrazione di 100 μ g/ml. Cellule di *E.coli* DH5 α contenenti il plasmide pUC19 (Takara) sono state incubate nelle stesse condizioni in terreno LB contenente Ampicillina (50 μ g/ml).

Il DNA plasmidico in entrambi i casi è stato estratto utilizzando il protocollo standard mediante lisi alcalina (Sambrook et al., 1989).

Restrizione delle sequenze dell'inserto e del pUC19.

Il DNA plasmidico proveniente dal vettore binario è stato sottoposto a restrizione con gli enzimi EcoRI e HindIII (FermentasTM). Il risultato della restrizione è stato analizzato su gel di agarosio (1%). La banda di peso molecolare corrispondente all'inserto LeExt1.1-SP/PHY/OCS è stata estratta da gel e purificata con il kit Amersham GFXTM.

Il DNA del plasmide pUC19 (Takara) è stato tagliato con gli stessi enzimi. La banda corrispondente al plasmide linearizzato è stata estratta da un gel di agarosio (1%) e purificata mediante lo stesso kit Amersham GFXTM.

Ligazione e trasformazione.

La cassetta LeExt1.1-SP/PHY/OCS e il plasmide pUC19 linearizzato sono stati ligati mediante l'enzima T4 DNA ligasi (FermentasTM). Il prodotto di ligazione è stato utilizzato per la trasformazione di cellule di *E.coli* DH5 α rese competenti con CaCl₂ (Sambrook et al., 1989). I batteri trasformati sono stati piastrati su terreno selettivo LB/IPTG/Xgal contenente Ampicillina (50 μ g/ml). I cloni resistenti sono stati messi in incubazione per 16 ore a 37°C, 250 rpm in terreno LB contenente Ampicillina (50 μ g/ml). Il DNA plasmidico, estratto con lisi alcalina (Sambrook et al., 1989), è stato sottoposto ad una restrizione di verifica con gli enzimi NcoI, HindIII ed EcoRI (FermentasTM) e sequenziato presso il servizio di sequenziamento del laboratorio di genomica vegetale (ENEA, C.R. Casaccia-Roma)

9.2 COSTRUZIONE DEL PLASMIDE INTERMEDIO pUC19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS.

Estrazione del gene codificante scFv800E6 dal plasmide pIVEX2.4d.

Il gene dell'anticorpo a singola catena scFv800E6, è stato estratto dal plasmide pIVEX2.4d (Roche), vettore in cui era stato inserito per la sua espressione in vitro.

Cellule di *Escherichia coli* XL-1 Blu, contenenti il plasmide codificante il ScFv, sono state incubate 16 ore a 37 °C, 250 rpm in terreno LB in presenza di Ampicillina (100 µg/ml). Il DNA plasmidico, dopo estrazione dalle cellule, è stato digerito con gli enzimi HindIII e Cfr91 (Fermentas™) e sottoposto a corsa elettroforetica su un gel di agarosio (3%). La banda corrispondente alla dimensione del gene ricombinante per l'anticorpo è stata estratta e purificata con il kit Amersham GFX™.

Estrazione del gene della fitasi dal plasmide pUC19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS.

Il DNA estratto dalle cellule trasformate con il plasmide pUC19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS è stato sottoposto a digestione con gli enzimi NcoI e HindIII (Fermentas™), per eliminare il gene della PHY. Il risultato della digestione è stato visualizzato su gel di agarosio (1%). La banda corrispondente allo scheletro del vettore privo del gene della fitasi è stata estratta con il kit Amersham GFX™.

“Annealing” degli adattatori.

Per la ligazione del gene dell'anticorpo nel plasmide di clonaggio privo del gene della fitasi sono stati utilizzati tre oligonucleotidi adattatori diversi con lo scopo di ottenere la sua inserzione nel giusto schema di lettura.

Per la costruzione dei tre adattatori sono stati utilizzati sei diversi oligonucleotidi a singola catena (M-medical GENENCO).

Un volume pari a 25 µl dell'oligo Nco-Hind-for-frame1 avente una concentrazione di 10 pmol/µl è stato mescolato ad un volume uguale dell'oligo Nco-Hind-rev-frame1 avente la stessa concentrazione, così da ottenere una miscela equimolare delle due componenti. La miscela è stata riscaldata per 10 minuti a 95°C e successivamente è stata fatta raffreddare lentamente fino temperatura ambiente per consentire un adeguato allineamento degli oligo.

Il procedimento per l'annealing è stato lo stesso per tutti e tre gli adattatori. Di seguito è riportata la sequenza dei tre diversi adattatori utilizzati nel lavoro sperimentale:

Adattatore n.1

Oligo:	Nco-Hind-for-frame1	5'-CATGCCCCCGGG -3'
	Nco-Hind-rev-frame1	3'-GGGGGGCCCTCGA -5'

Adattatore n.2

Oligo:	Nco-Hind-for-frame2	5'-CATGGCCCCCGGG-3'
	Nco-Hind-rev-frame2	3'-CGGGGGGCCCTCGA-5'

Adattatore n.3

Oligo:	Nco-Hind-for-frame3	5'-CATGGCCCCCCCCGGG-3'
	Nco-Hind-rev-frame3	3'-CGGGGGGGCCCTCGA-5'

Gli adattatori sono stati ideati in modo da contenere al loro interno un sito di restrizione per l'enzima SmaI e una volta assemblati formano estremità coesive; in questo modo si sono formate estremità coesive e non è stato necessario un taglio enzimatico degli adattatori in funzione della successiva ligazione.

Ligazione del gene dell'anticorpo al plasmide nei tre differenti schemi di lettura.

La banda corrispondente allo scheletro del vettore privo del gene della fitasi, quella relativa all'anticorpo e ciascun adattatore sono stati ligati insieme contemporaneamente mediante l'utilizzo dell'enzima T4 ligasi (Fermentas™).

Sono state effettuate tre diverse reazioni di ligasi, una per ogni adattatore a disposizione. Il prodotto delle singole reazioni è stato utilizzato per la trasformazione di cellule di *E.coli* DH5α rese competenti con CaCl₂ (Sambrook et al., 1989). I batteri trasformati sono stati piastrati su terreno LB in presenza di Ampicillina ad una concentrazione di 50 µg/ml come agente di selezione. Dopo un periodo di incubazione di una notte a 37°C i cloni resistenti sono stati saggiati per restrizione enzimatica con gli enzimi EcoRI e XhoI (Fermentas™).

Sequenziamento dell'inserto.

Il DNA di un clone per ognuna delle tre reazioni di ligasi, risultato positivo all'analisi di restrizione, è stato sequenziato presso il servizio sequenziamento del laboratorio di genomica vegetale (ENEA, C.R. Casaccia-Roma).

I primer utilizzati erano i seguenti:

scFv800E6 5'endFOR	5'-CAGTCTGAAGACTTGGCA-3'
scFv800E6 3'endREV	5'-GCTTCACCCACTCTATCC-3'

9.3 COSTRUZIONE DEL PLASMIDE INTERMEDIO pUC19::LeExt1.1-SP/scFvADDLs/OCS.

Estrazione del gene codificante scFvADDLs dal plasmide pAC.

Cellule di *Escherichia coli* XL-1 Blu contenenti il plasmide pAC sono state incubate 16 ore a 37 °C, 250 rpm in terreno LB in presenza di Ampicillina (100 µg/ml). Il DNA plasmidico estratto (Sambrook et al., 1989), è stato amplificato per PCR con i primer NcoI-FOR e Cfr91-REV per inserire alle estremità del frammento i due siti NcoI e Cfr91, il prodotto amplificato è stato analizzato con un gel di agarosio al 3%. I frammenti purificati sono stati sottoposti ad un'ulteriore digestione enzimatica con gli enzimi NcoI e Cfr91 (Fermentas™) per avere le due estremità coesive. Le sequenze

digerite sono state purificate con il Kit Amersham GFX™ da gel di agarosio (1%)

Estrazione del gene della fitasi dal plasmide pUC19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS.

Il plasmide pUC19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS è stato sottoposto a digestione con gli enzimi NcoI e Cfr91 (Fermentas™), per eliminare dal plasmide il gene della PHY. La banda corrispondente al vettore privo del gene della fitasi è stata estratta e purificata da gel di agarosio (1%) con il kit Amersham GFX™.

Ligazione del gene dell'anticorpo al plasmide

Il plasmide linearizzato e privo del gene della fitasi e il frammento di scFVADDLs sono stati ligati con l'enzima T4 DNA ligasi (Fermentas™).

Il prodotto della reazione è stato utilizzato per la trasformazione di cellule di *E.coli* DH5α. I batteri trasformati sono stati piastrati su terreno LB contenente Ampicillina (50 µg/ml) come agente di selezione. Dopo una notte a 37°C i cloni resistenti sono stati saggiati per PCR, mediante il kit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) con i primer NcoI ADDLs-FOR e Cfr91 ADDLs-REV.

Il DNA di alcuni cloni, risultati positivi ad un'ulteriore analisi di restrizione con gli enzimi NcoI e NheI (Fermentas™) localizzati rispettivamente a monte e a valle della sequenza anticorpale, sono stati sequenziati presso il servizio sequenziamento del laboratorio di genomica vegetale (C.R. Casaccia-Roma).

10- COSTRUZIONE DEI VETTORI D'ESPRESSIONE DEL scFv800E6

10.1- VETTORE D'ESPRESSIONE pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6/OCS

Il plasmide pUC19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS è stato digerito con gli enzimi EcoRI e HindIII (Fermentas™) per estrarre la cassetta da reinserire nel plasmide pBIN19. Quest'ultimo è stato sottoposto a restrizione con gli stessi enzimi. Il materiale proveniente dalle due digestioni è stato estratto e purificato da gel di agarosio (1%) con il kit Amersham GFX™.

Il pBIN19 linearizzato e la sequenza LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS sono state ligate con l'enzima T4 ligasi (Fermentas™). Il prodotto della reazione è stato utilizzato per la trasformazione di cellule di *E.coli* DH5α. Le cellule trasformate sono state piastrate su terreno LB contenente Kanamicina ad una concentrazione di 100 µg/ml. I cloni ottenuti sono stati analizzati per PCR.

Il DNA plasmidico estratto dai cloni cresciuti in terreno selettivo è stato saggiato per PCR mediante il kit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes).

In una prima reazione è stato amplificato il frammento contenente il peptide segnale e l'intero gene codificante scFv800E6. I primer utilizzati sono i seguenti:

SPfor: 5'-GGATCCGTCATGGCTAG-3'

800E6 XhoI-rev: 5'-CTCGAGGAACGTTTTATTTC-3'

Un'altra amplificazione è stata fatta sulla sequenza che si estende dalla parte finale del gene dell'anticorpo alla parte terminale dell'inserto, costituita dal terminatore dell'octopina sintetasi (OCS). Di seguito sono riportati i primer impiegati:

scFv800E6-5'end-for: 5'-CAGTCTGAAGACTTGGCA-3'

M13rev: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

Come controllo positivo è stata eseguita una reazione di PCR anche sul DNA plasmidico pUC19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS.

Il programma di amplificazione prevedeva una denaturazione iniziale di 30 secondi a 98°C, una ripetizione per 35 volte del ciclo: 98°C per 30 secondi, 50°C per 30 secondi, 72°C per un minuto e venti secondi, e al termine un'estensione finale a 72°C per 10 minuti.

10.2- VETTORE D'ESPRESSIONE pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6-EGFP/OCS

Il plasmide pEGFP (Clontech) è stato amplificato con i primer seguenti, disegnati appositamente per isolare la sequenza genica della EGFP ed introdurre contemporaneamente il sito di restrizione XhoI a monte e a valle della sequenza :

XhoI EGFP-FOR 5'-GCTCGAGGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'

XhoI EGFP-REV 5'-CGCTCGAGCACTCGCGCCGCTTTA-3'

Il materiale ottenuto è stato sottoposto a corsa elettroforetica su un gel di agarosio (3%) e la banda corrispondente alla sequenza della EGFP è stata estratta e purificata con il kit Amersham GFX™.

Parallelamente il vettore pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS è stato digerito con lo stesso enzima XhoI (Fermentas™) over night a 37°C

Il risultato di entrambe le digestioni è stato analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio (1%) .

Il plasmide linearizzato e la sequenza codificante laEGFP, entrambi aventi estremità coesive XhoI, sono state purificate da gel e ligate con l'enzima T4 ligasi (Fermentas™). Il prodotto della reazione è stato utilizzato per la trasformazione di cellule di *E.coli* DH5α. Le cellule trasformate sono state piastrate su terreno LB contenente Kanamicina (100 µg/ml). I cloni ottenuti sono stati analizzati con due restrizioni enzimatiche, la prima con XhoI (Fermentas™) per accertare l'inserimento della cassetta nel vettore, la seconda con gli enzimi EcoRI e NotI posti rispettivamente a monte del promotore LeExt1.1 e a valle della EGFP, allo scopo di verificare la corretta direzionalità del gene della EGFP nel vettore.

Il DNA dei cloni, risultati positivi all'analisi di restrizione, sono stati sequenziati presso il servizio sequenziamento del laboratorio di genomica vegetale (ENEA, C.R. Casaccia-Roma).

Sono stati utilizzati i seguenti primer :

SP3'FOR
M13'REV

5'-GGATCCGTCATGGCTAG -3'
5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

11- COSTRUZIONE DEI VETTORI D'ESPRESSIONE DEL scFvADDLs

11.1- VETTORE D'ESPRESSIONE pBINAR::35S - SP/scFvADDLs/OCS

Il plasmide pUC19::LeExt1.1-SP/scFvADDLs/OCS è stato digerito con l'enzima XbaI (Fermentas™) per estrarre la sequenza SP-scFv da inserire nel plasmide pBINAR. Quest'ultimo è stato sottoposto a linearizzazione con lo stesso enzima. Il risultato di entrambe le digestioni è stato analizzato su gel di agarosio (1%). Nel primo caso è stata isolata la banda dell'inserto, nel secondo quella del plasmide; in entrambi i casi, il DNA è stato estratto e purificato con il kit Amersham GFX™.

Il plasmide pBINAR e l'inserto, entrambi aventi estremità coesive XbaI, sono state ligati con l'enzima T4 ligasi (Fermentas™). Il prodotto della reazione è stato utilizzato per la trasformazione di cellule di *E.coli* DH5α. Le cellule trasformate sono state piastrate su terreno LB contenente Kanamicina ad una concentrazione di 100 µg/ml. I cloni ottenuti sono stati saggiati con due restrizioni enzimatiche, la prima con XbaI per accertare l'inserimento dell'inserto nel vettore, la seconda con gli enzimi NheI e HindIII posti rispettivamente a valle di scFvADDLs e a valle della sequenza terminatrice OCS, allo scopo di individuare la corretta direzionalità dell'inserimento della cassetta nel vettore.

Il DNA del clone, risultato positivo all'analisi di restrizione, è stato sequenziato presso il servizio sequenziamento del laboratorio di genomica vegetale (C.R. Casaccia-Roma).

11.2- VETTORE D'ESPRESSIONE pBIN19::LeExt1.1 - SP/scFvADDLs/OCS

Per la costruzione di questo vettore è stata seguita la stessa procedura utilizzata per la costruzione del pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS.

La verifica dell'esatto inserimento del frammento anticorpale all'interno del plasmide è stata eseguita tramite sequenziamento con i seguenti primer:

scFvADDLs 5'intFOR 5'-GCAAGGCCACACTGACTGTA-3'

scFvADDLs 3'intREV 5'-GCCAAGTTGGACGTGCTATAA-3'

12- TRASFORMAZIONE E CRESCITA DI PIANTE TRANSGENICHE

Indipendentemente dal plasmide e dalla specie di pianta utilizzata, l'espressione stabile è stata eseguita esattamente nello stesso modo. In questa sezione è descritta in dettaglio la procedura relativa al plasmide pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6-OCS

12.1 TRASFORMAZIONE Di *A.tumefaciens* GV3101 CON IL PLASMIDE: pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6/OCS

Preparazione delle cellule di *Agrobacterium tumefaciens*.

I batteri provenienti da una coltura cresciuta over night sono stati inoculati in 10 ml di terreno LB in presenza di Gentamicina (25 µg/ml) Rifampicina (50 µg/ml) e sono stati fatti crescere a 28°C e a 250 rpm, fino ad un OD₆₀₀ compreso tra 0.4 e 0.7.

Le colture sono state in seguito poste in ghiaccio per 30 minuti e centrifugate a freddo (4°C) a 4000 g per 15 minuti. Il pellet ottenuto è stato lavato per due volte con 40 ml di acqua sterile bidistillata. Dopo ogni lavaggio il pellet è stato nuovamente centrifugato (4000 g, 15 minuti, 4°C). Un ultimo lavaggio è stato fatto in 40 ml di glicerolo (10%) freddo (4°C). Le cellule sono state risospese in 2 ml di glicerolo sterile ed aliquotate in frazioni di 40 µl per essere conservate a -80°C.

Trasformazione con il metodo “Freeze/thaw”

Prima della reazione di shock termico il DNA del plasmide è stato purificato dai contaminanti tramite cromatografia su DEAE Sepharose[®] CL-6B (Sigma-Aldrich).

Ad una sospensione di 40 µl di batteri competenti, fatta scongelare lentamente in ghiaccio, è stato aggiunto 1 µg di DNA plasmidico. Come controllo negativo è stata utilizzata una sospensione di 40 µl di batteri in cui non è stato aggiunto alcun DNA. Il tutto è stato posto in azoto liquido per meno di un minuto e poi a 37°C per 5 minuti. Subito dopo sono stati aggiunti 980 µl di LB liquido e le colture trasferite in falcon da 15ml sono state incubate a 30°C in agitazione per tre ore.

Le colture sono poi state centrifugate e il pellet risospeso in 100 µl di LB.

La sospensione è stata distribuita in piastre contenenti gli antibiotici di selezione: Gentamicina (25 µg/ml) , Rifampicina (50 µg/ml) e Kanamicina (100 µg/ml).

Dopo due giorni di incubazione a 30°C, le colonie sono state analizzate e selezionate.

12.2 TRASFORMAZIONE DEI DISCHI FOGLIARI

Preparazione delle piante di *Nicotiana tabacum* e *Solanum tuberosum* e loro trasformazione.

In entrambi i casi, ad un volume di 100 µl di semi contenuto in una provetta da 1,5 ml, è stato aggiunto 1 ml di etanolo (70%). La provetta è stata posta in agitazione per un minuto ed è stato poi rimosso il liquido.

Successivamente nella stessa provetta sono stati aggiunti 600 µl di acqua bidistillata sterile, 300 µl di ipoclorito di sodio e 90 µl di TritonX-100 (10%); il tutto è stato tenuto in agitazione per 10 minuti al termine il liquido in eccesso è stato aspirato via.

Dopo tre lavaggi con 1 ml di acqua bidistillata sterile i semi sono stati posti a germinare su terreno MS (Sigma-Aldrich M5519, saccarosio 1%, agar 0,8%, pH5.8).

Le piante cresciute in vitro per circa un mese sono state trasformate con *Agrobacterium* seguendo la procedura descritta da Gelvin et al., 2003. In particolare sono stati ritagliati 40 dischi fogliari del diametro di circa 1 cm sia da piante di *N. tabacum* sia da piante di *S. tuberosum*,

12 ml delle sospensioni cellulari di *A. tumefaciens* in MS, contenenti il plasmide binario sono state poste in piastre petri (100x15 mm). In ciascuna piastra sono stati posti 5 dischi fogliari, per un tempo di 3 minuti sotto continua agitazione in rotorshaker (40 rivoluzioni al minuto). In seguito i dischi fogliari trasformati con lo stesso clone di *Agrobacterium* sono stati asciugati velocemente su carta da filtro sterile e trasferiti capovolti su piastre MSIB (MS 4,4 gr/L, saccarosio 3%, IBA 1 mg/ml, BAP 1 mg/ml, agar 0,8%, pH5.8). Le piastre sono state poi incubate per due giorni al buio in camera di crescita (24°C, 30% umidità).

Come controllo positivo sono stati utilizzati 10 dischi fogliari sottoposti ad agitazione su rotorshaker (40 rivoluzioni al minuto) in un volume di 12 ml di terreno MS liquido privo di batteri. Dopo essere stati asciugati su carta da filtro sterile, i 10 dischi controllo sono stati posti in numero di 5 per piastra sullo stesso terreno e nelle stesse condizioni di crescita dei dischi trasformati.

Dopo due giorni di incubazione al buio i dischi trasformati e quelli controllo sono stati trasferiti su piastre fresche MSIB in presenza degli antibiotici Ticarcillina (125 µg/ml) e Kanamicina (100 µg/ml). Le piastre sono state incubate in una camera di crescita illuminata (3000 lux, 16 h fotoperiodo, 24°C, 30% umidità). Trascorse circa 5 settimane i germogli sono stati trasferiti in barattoli sterili (h x Ø; 7 x 3,5 cm) contenenti terreno di radicazione (MS 4,4 gr/L, saccarosio 1%, IBA 100 µg/L, agar 0,8%, pH5.8) con gli agenti selettivi Ticarcillina (125 µg/ml) e Kanamicina (100 µg/ml). Ogni settimana i germogli sono stati trasferiti su piastre di terreno fresco.

12.3 TRASFERIMENTO IN COLTURA IDROPONICA.

Le colture idroponiche delle piante di *N. tabacum* sono state allestite sterilmente mediante l'utilizzo di contenitori magenta di policarbonato con il coperchio in polipropilene, autoclavabili e trasparenti, delle dimensioni di 77 x 77 x 97 mm (Sigma-Aldrich). Al loro interno è stato inserito un supporto di policarbonato per accomodare la pianta, avente lo stesso diametro del contenitore ed un'altezza di 2 cm, anch'esso autoclavabile.

Ad ogni contenitore sterile è stato aggiunto un volume di 35 ml di terreno MS a cui sono stati addizionati Kanamicina (100 µg/ml) e Ticarcillina (125 µg/ml) come agenti selettivi.

Sono state propagate in questo tipo di coltura piante trasformate rigenerate in vitro in presenza di Kanamicina e piante controllo di *N. tabacum* non

trasformate, queste ultime inserite nello stesso sistema idroponico in assenza di antibiotici. Ogni settimana 20 ml del mezzo di coltura sono stati prelevati (come campioni utilizzabili per ulteriori analisi) e rimpiazzati con terreno fresco.

12.4 COLTIVAZIONE DELLE PIANTE TRANSGENICHE IN AREOPONICA.

Le piante di *N. tabacum* e *Solanum tuberosum* transgeniche e wild-type sono state cresciute per circa 8 settimane in serra. Le piante sono poi state estratte dal terreno, le loro radici sono state lavate in acqua accuratamente e inserite nell'apparato di crescita areoponica (aeroponic box).

L'aeroponic box è stato allestito secondo la procedura di Zobel *et al* 1976. Le piantine sono state posizionate ad una distanza di circa 12 cm l'una dall'altra.

I nutrienti sono stati forniti mediante la soluzione di Hoagland (Hoagland, 1938). Dopo circa tre settimane di crescita in aeroponica, le piante sono state messe nuovamente in idroponica.

13- TRASFORMAZIONE E CRESCITA DI PIANTE TRANSIENTI

I semi di *N. tabacum*, sono stati fatti germinare *in vivo* in plateau. Le piantine germinate, dopo circa 1 settimana, sono state trasferite in vaso e fatte crescere in camera di crescita in condizioni controllate (24 °C, umidità circa 30%, fotoperiodo 16 ore di luce e 8 ore di buio)

13.1 AGROINFILTRAZIONE DELLE PIANTE DI TABACCO

Per l'infiltrazione degli espianti fogliari di tabacco, è stato utilizzato il protocollo di agroinfiltrazione descritto da Voinnet *et al* (2003).

A. tumefaciens contenente il vettore pBINAR::35S_SP/scFvADDLs/OCS è stato fatto crescere in terreno liquido LB addizionato con l'agente selettivo Kanamicina, fino ad un O.D₆₀₀ che va da 0.5 a 0.6. Una volta verificata l'effettiva crescita del batterio, 2 ml di coltura sono stati centrifugati e il pellet risospeso con 100 ml di Buffer (Sodio Fosfato pH 7).

La coltura, è stata lasciata per almeno un'ora a temperatura ambiente e poi utilizzata per l'infiltrazione delle aree fogliari. L'agroinfiltrazione è stata effettuata in piante cresciute in condizioni controllate per circa tre settimane, due foglie per ogni pianta sono state infiltrate. L'infiltrazione è stata effettuata in due passaggi, dapprima le foglie sono state strofinate con bentonite, per creare delle microferite, poi una parte della coltura è stata infiltrata con una siringa da 1ml e una parte strofinata lungo la superficie fogliare. Le foglie infettate sono state marcate per distinguerle da quelle sistemiche. I tessuti fogliari sono stati prelevati dopo 5 giorni dall'agroinfiltrazione, congelati in N liquido e conservati a -80°C per le analisi molecolari.

14- ANALISI MOLECOLARI DEI TESSUTI FOGLIARI DI PIANTE TRANSGENICHE E TRANSIENTI

Le analisi molecolari dei tessuti fogliari, sono state eseguite con il medesimo protocollo in tutte le piante sia in quelle transgeniche che in quelle transienti. Le metodologie applicate ad ogni pianta differiscono solo per la coppia di primer utilizzati per le reazioni di PCR ed RT-PCR, che ovviamente sono relative al plasmide utilizzato.

Nella tabella sono elencate tutte le coppie di primer utilizzate nelle reazioni:

PRIMER	N. Tabacum transgeniche (pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6-OCS)	S. Tuberosum transgeniche (pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6-OCS)
FOR	800E6 SacI-FOR 5'GAGCTCATGACTCAGTCTCAC-3'	800E6-FOR 5'ATGAAGCCTGGGGCCTGG-3'
REV	800E6 XhoI-REV 5'CTCGAGGAACGTTTTATTTC-3'	800E6 XhoI-REV 5'CTCGAGGAACGTTTTATTTC-3'

PRIMER	N. Tabacum transgeniche (pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6/EGFP-OCS)	N. Tabacum transienti (pBINAR::35S-SP/scFvADDLs-OCS)
FOR	800E6 SacI-FOR 5'GAGCTCATGACTCAGTCTCAC-3'	ADDLs-FOR 5'ATGGCTAGAAAAGATGTTGC-3'
REV	EGFP XhoI-REV 5'GAGCTCCATGACTCAGTCTCAC-3'	ADDLs-REV 5'-CGAAACGCTAGCTGAGGA-3'

Di seguito, è descritto dettagliatamente l'analisi molecolare relativa al pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6-OCS

14.1 PIANTE TRANSGENICHE DI *N. TABACUM* E *SOLANUM TUBEROSUM* TRASFORMATE CON AGRO CONTENENTE pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6/OCS

Estrazione del DNA fogliare di piante putative transgeniche.

Il materiale di partenza, corrispondente a 100 mg di tessuto fogliare fresco, è stato congelato e macinato con mortaio e pestello in azoto liquido, fino ad ottenere una polvere sottile. L'estrazione del DNA è stata effettuata con il kit Nucleon PhytoPure (Amersham, RPN8510).

14.2 PCR.

Per la reazione di PCR è stato utilizzato il kit Pure Taq Ready-To-Go PCR beads (Amersham). Due primer specifici hanno permesso l'amplificazione della catena leggera dell'anticorpo:

800E6 SacI-for: 5'-GAGCTCATGACTCAGTCTCAC-3'

800E6 XhoI-rev: 5'-CTCGAGGAACGTTTTATTTC-3'

La reazione prevedeva una denaturazione iniziale a 98°C per 30 secondi, una ripetizione per 35 volte del ciclo: 98°C per 30 secondi, 49°C per 30 secondi, 72°C per un minuto e venti secondi, e un'estensione finale a 72°C per 10 minuti.

Il materiale risultante dalle reazioni è stato sottoposto a corsa elettroforetica su un gel di agarosio (2%) in presenza di bromuro di etidio. Il DNA delle bande ottenute su gel è stato purificato mediante il kit Amersham GFX™ e sequenziato utilizzando gli stessi primer impiegati nella reazione di PCR.

14.3 RT-PCR.

Estrazione dell'RNA totale da foglia e radice.

L'RNA totale è stato estratto da tessuto di foglia e radice di piante transgeniche mediante l'uso del kit RNA-fast II Isolation System (Molecular Systems).

I campioni di foglia e di radice, costituiti da circa 100 mg di materiale congelato, sono stati omogeneizzati con 1 ml di reagente RNAfast-II.

L'RNA è stato estratto con 200 µl di cloroformio e l'omogenato è stato centrifugato a 12000 g per 15 minuti. La fase acquosa è stata trasferita in provette pulite a cui sono stati aggiunti 0,5 volumi di isopropanolo e 0,05 volumi di resina legante l'RNA. Il pellet è stato sottoposto a due lavaggi con etanolo al 75%, centrifugato a 6000 g ed infine risospeso in 50 µl di acqua DEPC.

La qualità del materiale estratto è stata verificata mediante elettroforesi su un gel di agarosio (2%) in presenza di bromuro di etidio.

RT-PCR

Le reazioni di RT-PCR sono state effettuate utilizzando il kit RT-PCR READY-TO-GO PCR-BEADS (Amersham) su campioni di RNA di foglia e radice di piante transgeniche e wild-type.

I primer utilizzati per gli estratti di *N.tabacum* sono:

800E6 SacI-for (5'-GAGCTCATGACTCAGTCTCAC-3')

800E6 XhoI-rev (5'-CTCGAGGAACGTTTTATTTC-3')

I primer utilizzati per gli estratti di per gli estratti di *Solanum tuberosum* sono:

800E6-for (5'-ATGAAGCCTGGGGCCTGG-3')

800E6-XhoI-rev (5'-CTCGAGGAACGTTTTATTTC-3')

Il programma prevedeva un primo passaggio di retrotrascrizione a 42°C per 30 minuti, una denaturazione a 95°C per 5 minuti, 40 volte la ripetizione del ciclo: 98°C per 30 secondi, 49°C per 30 secondi, 72°C per un minuto. Nell'ultimo step avviene un'estensione finale a 72°C per 10 minuti.

I prodotti della reazione sono stati controllati tramite corsa elettroforetica su un gel di agarosio (2%) in presenza di bromuro di etidio.

15- ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA

La seguente procedura è stata applicata per tutte le analisi di espressione proteica eseguite nel presente lavoro sperimentale.

15.1- ESTRAZIONE PROTEICA DA FOGLIE E RADICI.

L'estrazione proteica è stata effettuata su campioni costituiti da 0,75 g di materiale proveniente da radici e 1,5 g da foglie. I campioni prelevati sono stati congelati e frantumati con mortaio e pestello in azoto liquido fino ad ottenere una polvere fine. Ad ogni campione sono stati aggiunti 5 ml del buffer di estrazione (Tris-HCl 50 mM pH8, benzamidina 1 mM, EDTA 1 mM, NaCl 300 mM).

L'omogenizzazione è stata realizzata a freddo mediante l'impiego di un turrax, compiendo due cicli da 1 minuto ciascuno, raggiungendo gradualmente la velocità massima. L'omogenato è stato sottoposto a sonicazione e poi centrifugato a 14.000xg a 4°C. IL supernatante è stato recuperato e posto in ghiaccio.

I campioni sono stati filtrati attraverso tubi Vivaspin 2, cutoff 100 e/o 50 KDa (Sartorius), ed in seguito concentrati circa 10 volte utilizzando tubi Vivaspin 2, cutoff 10 KDa (Sartorius).

15,2- CONCENTRAZIONE DELLE PROTEINE PRESENTI NEL MEZZO DI COLTURA.

Ogni settimana sono stati prelevati 20 ml del terreno di crescita liquido di piante transgeniche e di controllo e rimpiazzati con terreno fresco. Questo è stato eseguito sia per piante transgeniche di *N. tabacum* che per piante transgeniche di *S. tuberosum*. I campioni prelevati alla fine della terza settimana per entrambi i tipi di pianta sono stati prima filtrati in tubi Vivaspin 2, cutoff 100 KDa (Sartorius), e poi concentrati per mezzo di tubi Vivaspin 2, cutoff 10 KDa (Sartorius), fino ad un volume finale di 200 µl.

15.3- SDS-PAGE.

L'SDS-PAGE è stata preparata secondo la procedura descritta da Laemmli (1970); il gel di corsa era al 12% di acrilamide/bis 29:1.

Prima della corsa i campioni sono stati denaturati per 3 minuti a 95°C in Laemmli sample buffer con 2-mercaptoetanolo. Al gel di corsa è stata applicata una tensione costante di 30 mA per circa un'ora a temperatura ambiente. Il gel è stato successivamente colorato in alcuni casi con colorante Coomassie brilliant Blue G250 (Sigma-Aldrich) e in altri con il Kit PlusOne Silver Syaining (Amersham).

15.4- WESTERN BLOTTING.

Le proteine presenti sul gel dell'SDS-PAGE sono state trasferite O.N su una membrana Hybond™-P (Amersham) mediante l'utilizzo dell'apparato Transblot Biorad (30V, 40 mA; 30V, 90 mA finali), secondo il procedimento descritto da Towbin et al., 1979. Una volta terminato il trasferimento, la membrana è stata immersa in metanolo per 10 secondi e lavata per 5 minuti in acqua bidistillata sterile. Il blocco dei siti di legame non specifici è avvenuto tramite un'incubazione di un'ora in PBS-T (Na₂HPO₄ 80 mM, NaH₂PO₄•2H₂O 20 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%) in presenza di BSA 2% (Sigma-Aldrich).

La membrana è stata sottoposta ad un lavaggio di 5 minuti in PBS-T, al termine del quale è stata incubata per un'ora in PBS-T con l'anticorpo Mouse IgG, Cy TM5-Linked (from goat) diluito 1:3000 (Amersham).

La rilevazione di fluorescenza è avvenuta mediante il Typhoon 9400 (Amersham Biosciences).

15.5- IMMUNOPRINTING.

L'immunoprinting dei tessuti di foglia e radice è stato effettuato secondo la procedura descritta da Lin et al., 1990. Foglie e radici di piante trasformate e controllo sono state collocate su una membrana di nitrocellulosa e coperte con SaranWrap™. Il tutto è stato collocato tra due fogli di carta da filtro in un sistema per *gel drying* fornito di pompa a vuoto, in assenza di riscaldamento. Dopo un tempo di essiccamento di tre ore i tessuti vegetali sono stati rimossi e la membrana è stata velocemente sciacquata con acqua bidistillata sterile. I siti di legame non specifici sono stati bloccati tramite un'incubazione di un'ora in PBS-T con BSA 3% (Sigma-Aldrich). Dopo un lavaggio con PBS-T in eccesso della durata di 15 minuti la membrana è stata incubata in PBS-T con l'anticorpo Mouse IgG, Cy TM5-Linked (from goat) diluito 1:3000 (Amersham).

La rilevazione di fluorescenza è avvenuta mediante il Typhoon 9400 (Amersham Biosciences).

RISULTATI

16 COSTRUZIONE PLASMIDI INTERMEDI

16.1 PLASMIDE INTERMEDIO pUC19:: LeExt1.1-SP/PHY/OCS.

Il plasmide pBIN19 contenente la cassetta di rizosecrezione LeExt1.1-SP/PHY/OCS ha un elevato peso molecolare ed è difficile da manipolare. Per questi motivi è stato deciso di trasferire tutta la cassetta nel plasmide pUC19. L'inserto, contenente il promotore LeExt1.1, il peptide segnale (SP) fuso al gene fitasi (PHY) e il terminatore dell'octopina sintetasi (OCS), è stato estratto dal plasmide pBIN19 mediante una digestione con gli enzimi EcoRI e HindIII. In figura 11 è possibile vedere il risultato della reazione di restrizione. Come ci si aspettava, è visibile una banda di circa 3 kb, corrispondente alla cassetta di rizosecrezione e una banda di circa 11 kb, corrispondente al vettore vuoto.

Il plasmide pUC19 all'interno del quale andava inserito l'inserto di 3kb è stato digerito con gli stessi enzimi in modo da generare estremità utili al clonaggio. In figura 12 è visibile la banda di circa 2,6 kb, risultante da quest'ultima digestione.

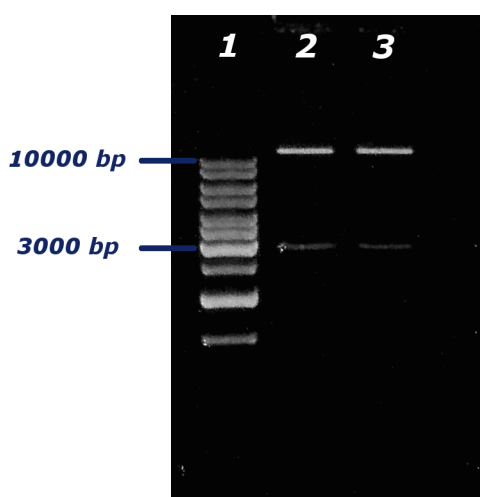


Figura 11: Digestione di pBin19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS con EcoRI e HindIII.

Lane1: Marker 1 Kb (Fermentas).
Lanes 2-3: Plasmide digerito con EcoRI, HindIII.

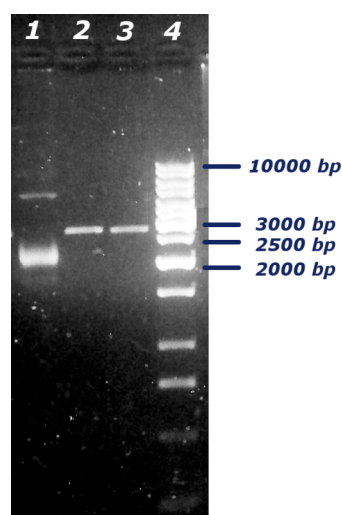


Figura 12 – Digestione di pUC19 con EcoRI e HindIII.

Lane1: plamide non digerito.
Lane 2: Plasmide digerito con EcoRI.
Lane 3: Plasmide digerito con EcoRI, HindIII.
Lane 4: Marker 1 Kb (Fermentas).

Il vettore pUC19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS ottenuto dalla ligazione delle due sequenze purificate da gel (3 kb e 2,6 kb), è stato utilizzato per trasformare cellule di *E.coli* DH5 α . La scelta dei cloni da sequenziare per verificare l'esatto clonaggio, è stata fatta sottoponendo il DNA plasmidico ad una prima analisi con gli enzimi di restrizione NcoI, HindIII ed EcoRI. Il sito

NcoI si trova a monte del gene PHY, per cui le bande attese erano tre: una di 2,650 kb corrispondente al pUC19 vuoto, una di 1,6 kb che va dal promotore al gene PHY e una di 1,250 kb che va dal gene PHY al terminatore dell'octopina sintetasi. In figura 13 è riportato il risultato delle reazioni relativo a tre cloni analizzati, in tutti i tre casi analizzati la presenza dell'inserto nel plasmide pUC19 è confermata.

I cloni risultavano identici anche al sequenziamento per cui si è scelto arbitrariamente di utilizzare il clone numero 2 per i successivi esperimenti.

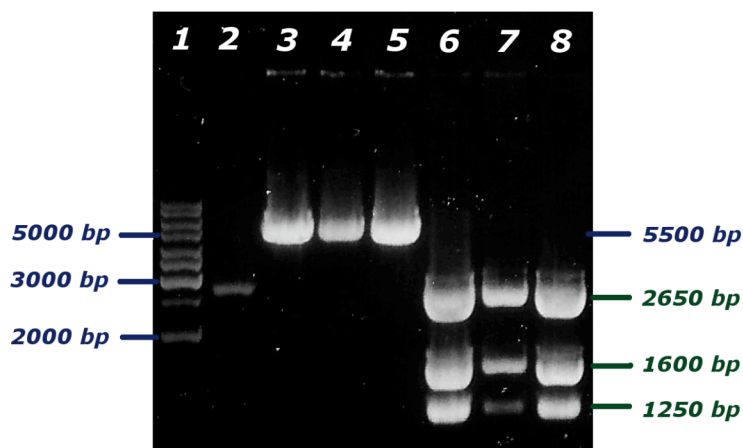


Figura 13 - Digestione di verifica del pUC19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS.

Lane 1: Marker 1 Kb (Fermentas).

Lane 2: plasmide pUC19 linearizzato con EcoRI.

Lanes 3-5: dna linearizzato con NcoI.

Lanes 6-8: dna ristretto con EcoRI, HindIII, NcoI.

16.2 PLASMIDE INTERMEDIO pUC19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS

Il gene dell'anticorpo a singola catena 800E6 è stato estratto da pIVEX2.4d. Il plasmide è stato sottoposto a restrizione con gli enzimi Cfr91 e HindIII, che hanno al loro interno rispettivamente uno e tre siti di taglio. La figura 14 mostra in un gel di agarosio le quattro bande risultanti dalla digestione. Il frammento di circa 870 bp, corrispondente alla sequenza del gene dell'anticorpo, è stato estratto e purificato.

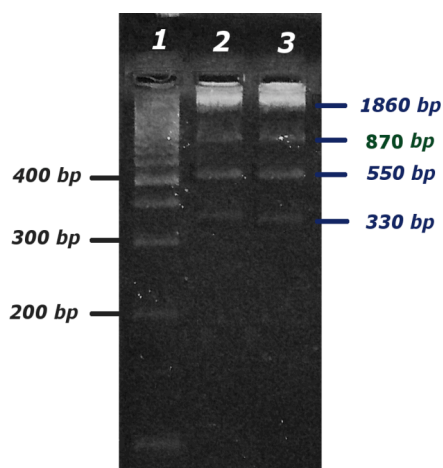


Figura 14 - Digestione di pIVEX2.4d::scFv800E6 con Cfr91 e HindIII.

Lane 1: Marker 100 bp (Fermentas).
Lanes 2-3: Plasmide digerito Cfr91, HindIII.

Parallelamente il plasmide pUC19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS è stato sottoposto a taglio enzimatico con gli enzimi NcoI e Cfr91 per eliminare il gene della fitasi (PHY) al posto del quale andava inserito il nostro scFv. L'enzima NcoI ha una sequenza di taglio immediatamente a valle del peptide segnale (PS), mentre l'enzima Cfr91 taglia in vari punti all'interno del gene PHY e prima del terminatore OCS. Tagliando con entrambi si genera una serie di bande, alcune delle quali composte da poche coppie di basi. Su un gel di agarosio (1%) se ne visualizzano 3, 4500, 730 e 300 bp (figura 15).

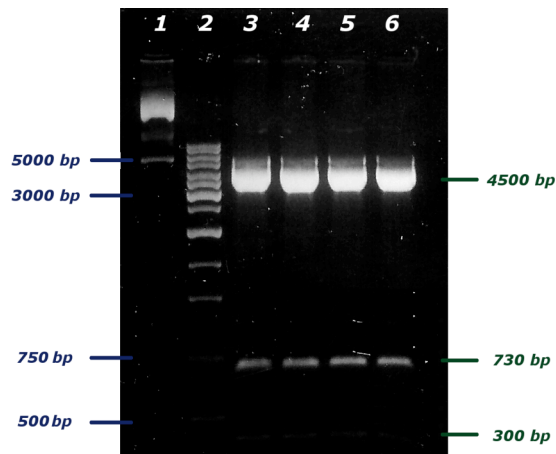


Fig 15 - Digestione del plasmide pUC19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS con NcoI e Cfr91.

Lane 1: Plasmide intero.

Lane 2: Marker 1 Kb Fermentas).

Lanes 3-6: Plasmide digerito con gli enzimi NcoI e Cfr91.

Il frammento di 730 bp corrisponde al gene PHY, quello di 4,5 kb è relativo al plasmide. Quest'ultimo è stato estratto da gel e purificato.

Nel passaggio successivo, come riportato in dettaglio in materiali e metodi, per avere l'anticorpo fuso al peptide segnale nei tre differenti schemi di lettura, le bande di 850 e 4500 bp precedentemente purificate sono state ligate con tre diversi oligo adattatore.

I cloni batterici DH5α ottenuti dalla trasformazione sono stati designati "frame 1-3" a seconda che essi fossero stati trasformati con i costrutti contenenti il primo, il secondo o il terzo adattatore.

Anche in questo caso prima di analizzare il costrutto mediante sequenziamento, il DNA plasmidico di tre cloni per ognuna delle reazioni è stato sottoposto a restrizione con gli enzimi EcoRI e XhoI. Il sito di taglio EcoRI si trova a monte del promotore LeExt1.1, mentre XhoI si trova a valle della sequenza codificante per il scFv800E6 ne segue che un clonaggio riuscito doveva dare due bande, una di circa 2 kb corrispondente al frammento contenente il promotore, il peptide segnale e il gene dell'anticorpo, e una di circa 3kb corrispondente al resto del vettore. Nella figura 16 è possibile vedere il risultato della digestione.

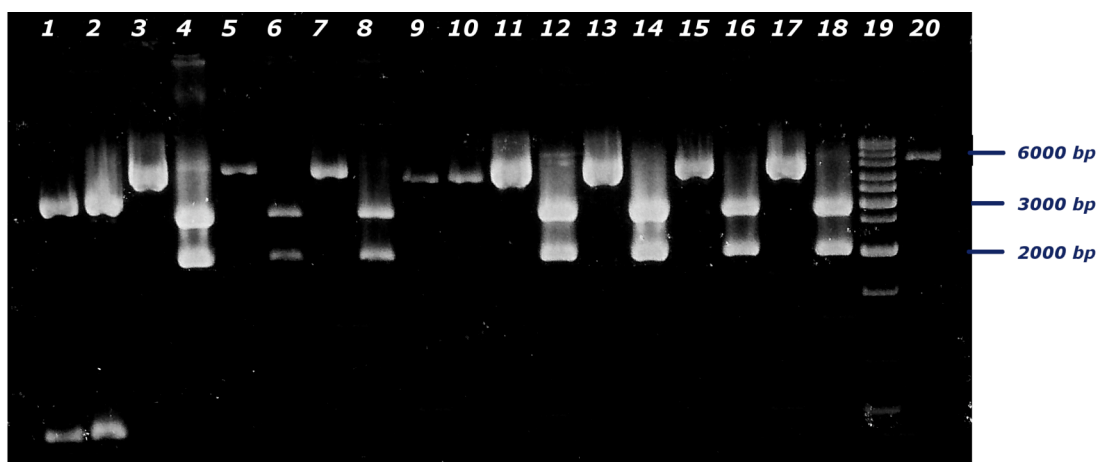


Figura 16 - Digestione del DNA plasmidico dei cloni trasformati con le ligazioni in differenti schemi di lettura.

Lane1: clone 1, frame 1, digerito EcoRI.	Lane11: clone 3, frame 2, digerito EcoRI.
Lane2: clone 1, frame 1, digerito EcoRI, XhoI.	Lane12: clone 3, frame 2, digerito EcoRI, XhoI.
Lane3: clone 2, frame 1, digerito EcoRI.	Lane13: clone 1, frame 3, digerito EcoRI.
Lane4: clone 2, frame 1, digerito EcoRI, XhoI.	Lane14: clone 1, frame 3, digerito EcoRI, XhoI.
Lane5: clone 3, frame 1, digerito EcoRI.	Lane15: clone 2, frame 3, digerito EcoRI.
Lane6: clone 3, frame 1, digerito EcoRI, XhoI.	Lane16: clone 2, frame 3, digerito EcoRI, XhoI.
Lane7: clone 1, frame 2, digerito EcoRI.	Lane17: clone 3, frame 3, digerito EcoRI.
Lane8: clone 1, frame 2, digerito EcoRI, XhoI.	Lane18: clone 3, frame 3, digerito EcoRI, XhoI.
Lane9: clone 2, frame 2, digerito EcoRI.	Lane19: Marker 1Kb (Fermentas).
Lane10: clone 2, frame 2, digerito EcoRI, XhoI.	Lane20: pUC::LeExt1.1-SP/PHY-OCS, digerito EcoRI.

I cloni, che non rispettano il profilo di restrizione atteso, sono il primo nel frame 1 (lanes 1-2) e il secondo nel frame 2 (lanes 9-10). In tutti gli altri casi, il clonaggio ha dato esito positivo. Il DNA plasmidico estratto dai cloni 3 (frame 1), 1 (frame 2) e 3 (frame 3), è stato sequenziato con i primer scFv800E6 3'endFOR e scFv800E6 5'endREV. Il sequenziamento ha permesso di verificare la sequenza corretta e la ricostruzione delle sequenze a monte e a valle del gene dell'anticorpo.

Di seguito è riportata la sequenza dell'inserto LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS.

La sequenza corrispondente al promotore LeExt1.1 è riportata in verde, quella del peptide segnale è di colore arancio. L'adattatore che permette il giusto clonaggio del gene dell'anticorpo è evidenziato in azzurro, mentre quest'ultimo è riportato in blu. La sequenza proteica corrispondente comprende le porzioni della catena pesante e della leggera, entrambe in viola, separate dal peptide linker, in grigio.

NUCLEOTIDE SEQUENCE AND TRANSLATION MAP OF LeExt1.1-SP/scFv800E6-OCs

Results for 2258 residue sequence "LeExt1.1-SPscFv-OCs" starting "TCTAAGTATG"

```

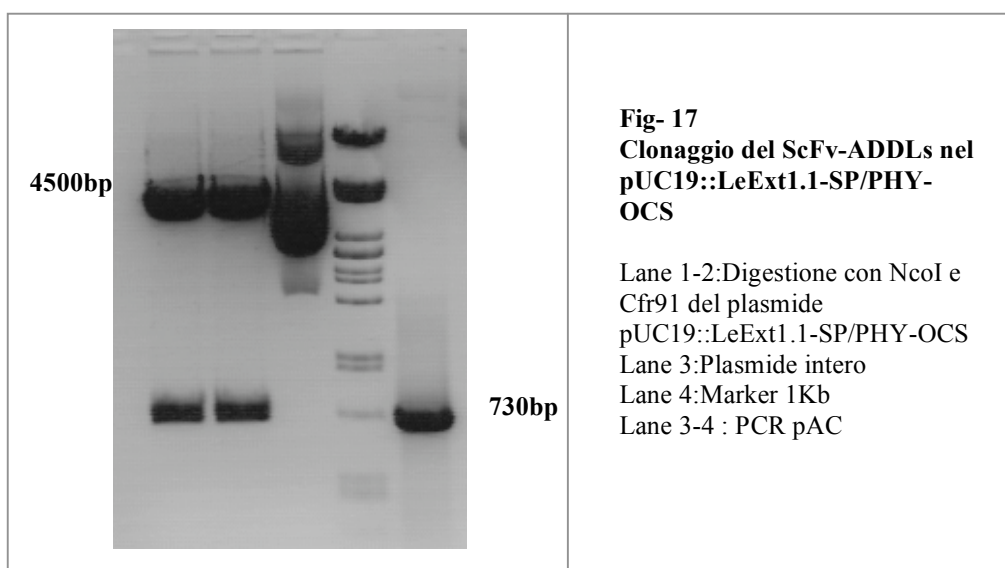
1  * V * I F L I S E L L K Y F Q K I F K I I * S T Q
1  TCTAAGTATGAATTTTTTTAATATCGGAACCTCTAAAAATATTTTCAGAAAAATTTTCAAAAAATTTTGATCTACTC
26  F F S G G V R Y S G M K * Y L I Q H F F L K T R S
76  AATTTTTTTCCGGTGGGGTTCGATATTCGGGAATGAAAGTAATATCTCATACAAACACTTTTTTCTCAAGACTAGAT
51  Y G T Q I * I I I I N N Q K Y E N M T L K T I A S
151 CATACGGGACACAAATTTGAATTATTATAATTAATAACCAAAAAATATGAAAAATATGACATTAACCAATAGCGT
76  N Y S R W Y H * L I K P K I L S F L V M K S M Y G
226 CTAATTATTTCCCGTTGGTATCATTAACCTAATCAAAACCCAAAAATATTGTCATTCTTGGTGTATGAAAAAGTATGTATG
101 T R K G T Q N N R Y N L S N L F E F K R K I N *
301 GTACTCGCAAGGGTACGCAAAAAATAATCGATACAATTTGTCTAATCTGTTGAATTTAAAAAGAAAGAAAAATAAATT
126 L L L L * T Y D S * E I K E I K R I V V N H F N Q
376 GATTGCTATTGTTATAAACATATGATTCTCGAGAGATAAAAGAAATAAAGCGAATCGTAGTGAATCATTTTAAATC
151 I K T N S * I N V P Q R * N I T I F F I S C I F
451 AAATAAAAAACAACTCGTAGATAAATGTTCCACAAAGATAAAAAATATTACGATTTTTTTTCAAGCCCTCAATAT
176 S E S I S S I N V F S V D L S Q R S C S K Q L L Y
526 TCAGTGAATCGATTTCTTCTATCAACGTTTTTTTCAGTTGATTGTCAACACGGAGTTGCTCAAAAGCAGCTTTTAT
201 D L Q V N A H E Q F I G G H P K N S L P R K I Y F F K
601 ATGATTGTGAAGTAAATGCACATGAGCAATTTTTCGGCGGGCACCCGAAAGAAATAGCTTACCCATTATTTTTTTA
226 K R L S T I P * C G L * V V L N K Y K * L I D T K
676 AAAAAAGATTAAAGTACAATACCATGATGTGGATTGTAAGTTGTGCTCAACAAAGTACAAAATAATTAATCGACACCA
251 * W T V F V K P T H I S T F K Y * F Y Q F T T K
751 AATAATGGACAGTATTTGTTAAGCCTACACATATCTCAACTTTTTAAATATTAAATTTTCAATTTTTTCAACACCA
276 R N E Q T T F L Q V N K * S I Q S L E I V S Q A N
826 AAAGAAATGAACAAACAACTCTTGCAGTCAACAAATAATCGATTCAAGTTTAAAGAAATAGTAGTCAAGCAA
301 V Y E * L * L P I I S N Q P * W T A L T K K R L I
901 ATGTGTATGAATAGTTATGACTTCCATTATCTCAAACCAACCTTAGTGGACAGCATTAACCAAAAAACGGGTGA
326 C W I I * F L I I K S H V S M L * K S * F L H S K
976 TATGTTGGATTATTTAATTTCTAATTATCAAAATCATGTTAGTATGTTATAAAAGTCCTAATTCCTCCATTCTA
351 T H K K K K K N K D I S S L R I H S S L D S R G S V
1051 AAACACACAAAGAAAAAGAAAAACAAAGATATATCTAGCCTTAGAATCCATTCTTCTCGACTCTAGAGGATCCG
376 M A R K D V A S M F A V A L F I G A F A A V P T S
1126 TCATGGCTAGAAAAGATGTTGCTCCATGTTTGCAAGTTGCTCTCTTCATTGGAGCATTGCTGCTGTTCTACGA
401 V Q S I G V S M A P R E L V D K F Y F K E T V I M
1201 GTGTGAGTCCATCGGCGTATCCATGGCCCCCGGAGCTTGTGCAAAATTTCTATTCAAGGAGACAGTCATAA
426 Q V Q L Q Q S G A E L M K P G A S V K I S C K A T
1276 TGCAGGTCCAACTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCTGCAAGGCTA
451 G Y T F S N Y W I E W V K Q R P G H G L E W I G E
1351 CTGGCTACACATTCACTAAGTACCTGATAGAGTGGGTGAAGCAAGGCTGGACATGGCCTTGAAGGATGGAG
476 I L P G S G S T N Y N E K L K G K A T F T A D T S
1426 AGATTTTACCTGGAGTGGTAGTACTAATCAATGAGAAGCTCAAGGGCAAGGCCACATTCACTGCAGACACAT
501 S N T A Y M Q L S S L T S E D S G V Y Y C A R G G
1501 CCTCCAAACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCTGACATCTGAGGACTCTGGCGTCTATTACTGTGCAAGAGGGG
526 G N Y P Y Y F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S
1576 GGGGTAACCTACCGTACTACTTTGACTACTGGGGCAAGGGACACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTT
551 G G G G S G G G G S D I E L M T Q S H K F M S T S
1651 CAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCGAGCTCATGACTCAGTCTCACAAATTCATGTCCACAT
576 V G D R V S I T C K A S Q D V G T A V A W Y Q Q K
1726 CAGTAGGAGACAGGCTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGA
601 P G Q S P K L L I Y W A S T R H T G V P D R F T G
1801 AACCAGGACAATCTCCTAACTACTGATTTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTACAG
626 S G S G T D F T L T I S N V Q S E D L A D Y F C Q
1876 GCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAATGTTCACTCTGAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTC
651 Q Y S S Y R T F G A G T K L E I K R S S S G E L C T S
1951 AGCAATATAGCAGTTATCGCACGTTCCGTTGAGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGTTCTCTGAGCGGACTCTGCA
676 P G I L * S R P A G M P C F N E I C E T P M I A *
2026 GCCCGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCCCTGCTTTAATGAGATATGCGAGACGCCTATGATCGCAT
701 Y L L S I L L C T L * K T * A C V A Q I L T A G G F
2101 GATATTTGCTTTCAATTCTGTTGTGCAGTTGTAACCAACCTGAGCATGTGTAGCTCAGATCCTTACCGCGGTT
726 G S F * * D I S P V T I V F L M N N I L R S I Y *
2176 TCGGTTCAATTCTAATGAGATATATCAACCGTTACTATCGTATTTTTAATGAATAATATTCTCCGTTCAATTTACT
751 L S
2251 GATTGTCC

```

16.3 PLASMIDE INTERMEDIO pUC19::LeExt1.1-SP/scFvADDLs/OCS

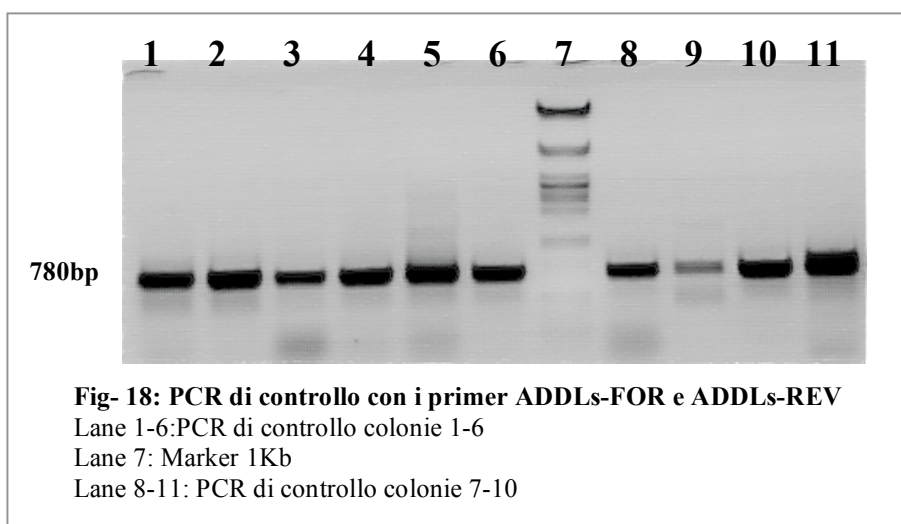
Il plasmide pAC, contenente scFvADDLs, è stato sottoposto a una reazione di PCR. I primer utilizzati per l'amplificazione sono stati disegnati in modo tale da inserire a monte e a valle della sequenza anticorpale i siti di restrizione NcoI e Cfr91.

Il plasmide pUC19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS in cui andava inserito il frammento è stato digerito come riportato per l'inserimento di scFv800E6. La figura 17 mostra il risultati della digestione di pUC e della PCR del plasmide pAC.



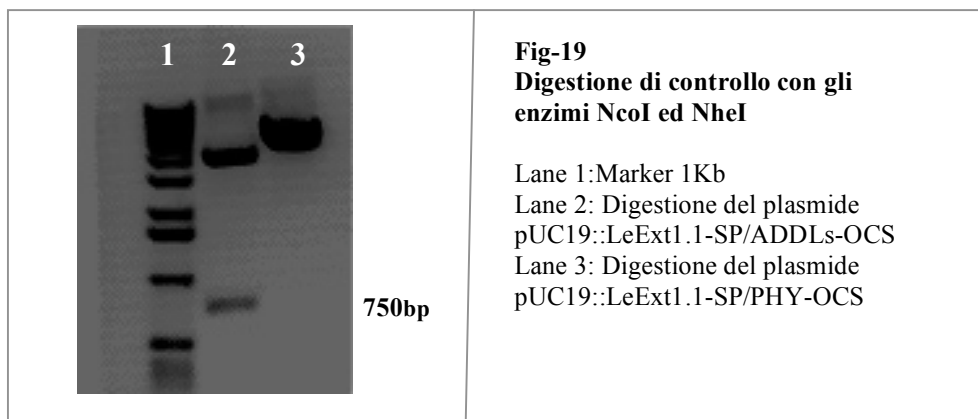
I due frammenti quello di 4,5 kb, corrispondente al plasmide privo del gene PHY e quello di 730 bp, corrispondente alla sequenza di ScFvADDLs estratti e purificati da gel sono stati ligati e il prodotto di ligazione è stato utilizzato per trasformare cellule DH5 α .

Il DNA di dieci delle colonie ottenute è stato sottoposto a una PCR di controllo con i primer ADDLs-FOR e ADDLs-REV per verificare la presenza del frammento anticorpale nel plasmide. In figura 18 è mostrato il risultato della PCR.



I risultati della reazione di PCR, mostrano la presenza del frammento anticorpale (780 bp) in tutte le colonie analizzate.

Uno dei cloni è stato sottoposto a un successivo controllo, mediante digestione enzimatica con gli enzimi NcoI e NheI, che tagliano rispettivamente a monte e a valle della sequenza nucleotidica codificante per il ScFv-ADDLs. Il risultato della digestione è mostrato in figura 19.



Questa nuova digestione in caso di clonaggio positivo avrebbe mostrato una banda di 750 bp corrispondente alla sequenza codificante il ScFv, diversamente il vettore sarebbe stato linearizzato a causa della mancanza del sito di restrizione NheI, come è dimostrato nella digestione controllo del pUC19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS presente nella terza corsia.

Il clone selezionato è stato poi sottoposto a una reazione di sequenziamento con i primers SP3'FOR e scFvADDLs 5'REV. Questo passaggio ha permesso la verifica della sequenza corretta e il controllo dei siti d'inserzione a monte e a valle del gene dell'anticorpo ADDLs.

17 PLASMIDI PER L'ESPRESSIONE DEL scFv800E6

17.1 PLASMIDE pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS.

La sequenza LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS è stata estratta dal pUC19 e trasferita nel pBIN19 per formare il plasmide per l'espressione stabile, pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS (Figura 20)

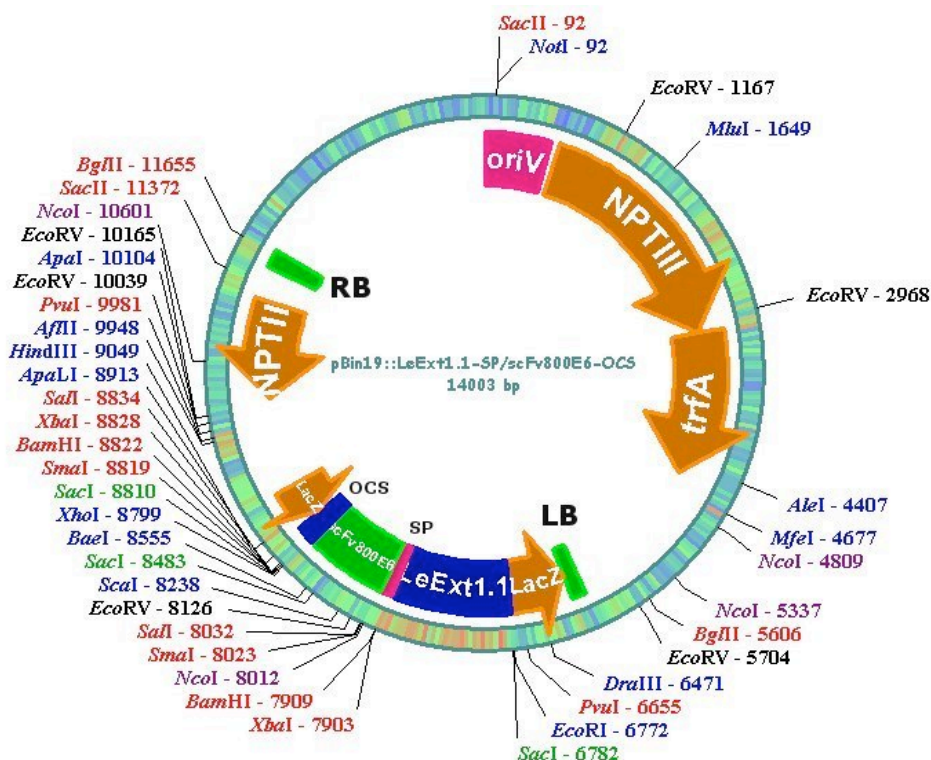


Figura 20: Mappa del plasmide pBin19::LeExt1.1-SP/scFv800E6, ottenuta mediante l'impiego del software pDraw (<http://www.acaclone.com/>).

Il plasmide pBIN19 contenente il gene della fitasi e il pUC19 intermedio sono stati digeriti con gli enzimi EcoRI e HindIII, per separare rispettivamente il frammento contenente lo scheletro del vettore ed il frammento con l'anticorpo. In figura 21 sono visualizzati i risultati delle reazioni.

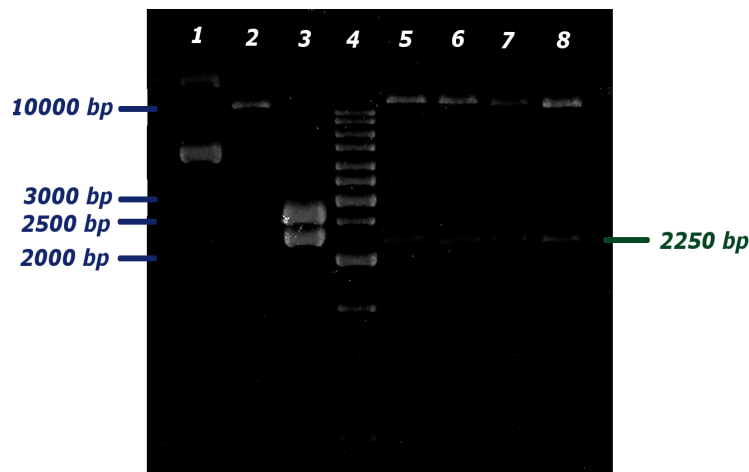


Figura 21: Digestione di pBin19::LeExt1.1-SP/PHY-OCS e pUC19::LeExt1.1-SP/scFv800E6-OCS con EcoRI e HindIII.

Lane 1: Plasmide pUC19::LeExt1.1-SP/scFv800E6 non digerito.
 Lane 2: Plasmide pBin19::LeExt1.1-SP/PHY non digerito.
 Lane 3: Plasmide pUC19::LeExt1.1-SP/scFv800E6 tagliato con EcoRI e HindIII.
 Lane 4: Marker 1 Kb (Fermentas).
 Lanes 5-8: Plasmide pBin19::LeExt1.1-SP/PHY tagliato con EcoRI e HindIII.

Nella terza corsia è mostrata la digestione del vettore intermedio, due frammenti sono visibili, uno di 2kb corrispondente alla cassetta di rizosecrezione e una di 3kb contenente il resto del plasmide. Nelle ultime 4 corsie sono mostrate le digestioni del plasmide pBIN 19, la banda superiore rappresenta il plasmide vuoto, da cui è stata isolata la cassetta contenente il gene PHY(banda da 2 kb circa). Il vettore vuoto e la banda da 2Kb sono state estratte e ligate e il prodotto di reazione è stato utilizzato per trasformare cellule di *E.coli* DH5 α . Quattro fra le colonie cresciute dopo un giorno sono state utilizzate per l'estrazione del DNA plasmidico.

L'esatto inserimento del gene dell'inserto nel plasmide binario è stato inizialmente verificato tramite PCR. Un controllo è stato effettuato amplificando gli stessi frammenti anche nel plasmide pUC19:LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS.

I primers utilizzati per l'amplificazione, SPfor e scFv800E6-3'end-for, sono stati scelti con l'ausilio del software Primer Express (Applied Biosystems). Inoltre, vista la lunghezza del plasmide binario, per verificare il loro corretto appaiamento sono state effettuate delle simulazioni con il software Amplify (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>). Questo programma una volta inserite la sequenza bersaglio e quella dei primers dà origine a un diagramma in cui sono riportati tutti gli appaiamenti possibili e la grandezza degli ampliconi. Nelle figure 22 e 23 sono riportati i risultati delle reazioni di PCR virtuale.

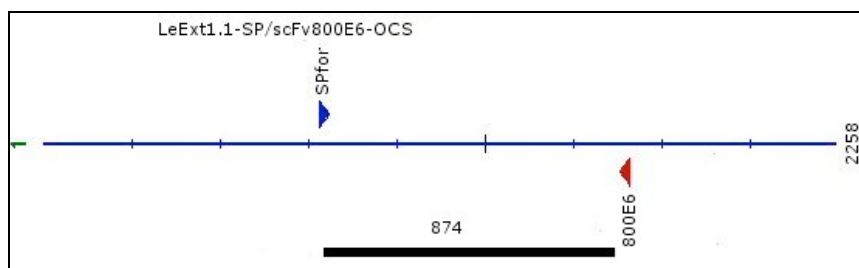


Figura 22: PCR virtuale con i primer SPfor e 800E6 XhoI-rev.

Il primer SPfor è costruito sulla sequenza del peptide segnale. L'altro primer si allinea con l'ultima parte del gene dell'anticorpo; insieme permettono l'amplificazione di un frammento di circa 900 bp.

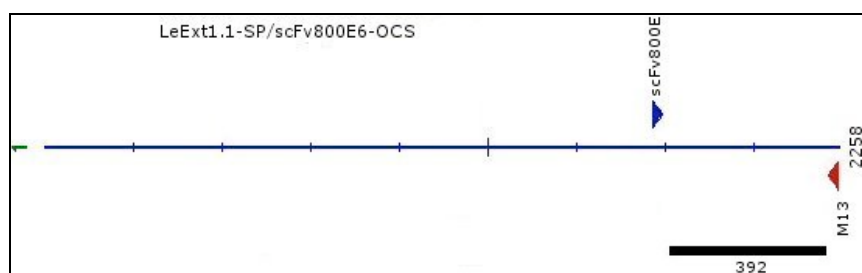
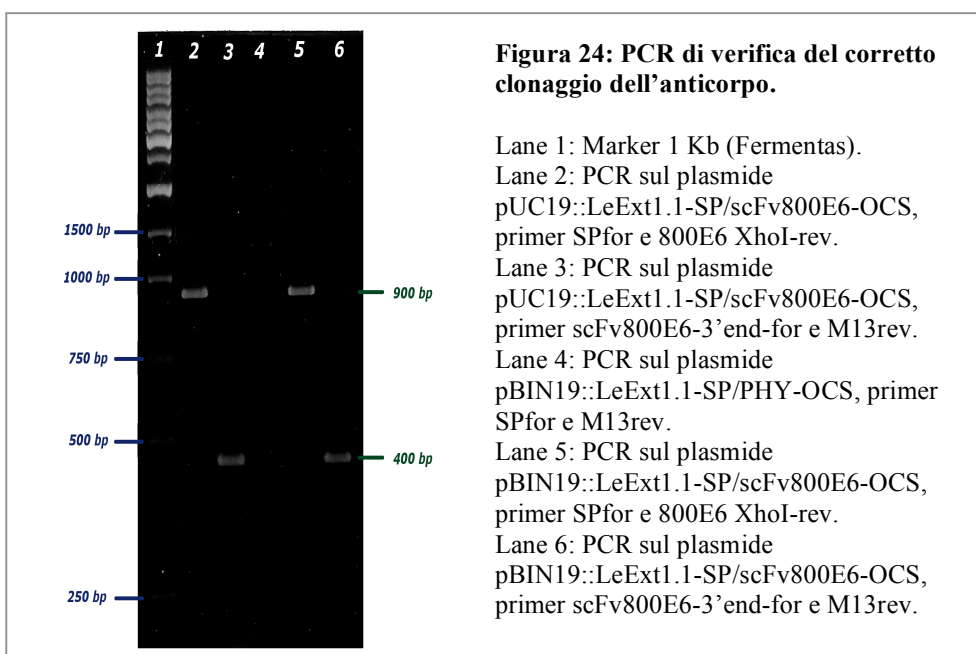


Figura 23: PCR virtuale con i primer scFv800E6-3'end-for e M13rev.

Il primo primer, quello forward, si appaia all'ultima parte della sequenza dell'anticorpo mentre il primer universale M13 riconosce una sequenza sui due plasmidi subito a valle dell'inserto. Il frammento amplificato è di circa 400 bp e contiene tutta la sequenza OCS.

I risultati delle amplificazioni reali sono riportati in figura 24. Come si può notare in tutte le digestioni indipendentemente dal plasmide digerito (pUC, pBIN19) sono presenti le due bande attese di circa 400 e di 900 bp. Questo dimostra il corretto clonaggio e la presenza dello stesso costrutto in entrambi i vettori.

L'ulteriore conferma in tal senso è stata ottenuta dal sequenziamento delle bande estratte dalle corsie 5 e 6.



17.2 PLASMIDE pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6-EGFP/OCS.

Per analizzare più dettagliatamente il processo di rizosecrezione, è stato deciso di inserire la sequenza codificante per l'EGFP nel vettore pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS, ponendola a valle del frammento anticorpale e sotto il controllo dello stesso promotore LeExt1.1. L'idea era di utilizzare le proprietà fluorescenti della proteina per seguire l'espressione e la localizzazione della proteina di fusione scFv-EGFP. La sequenza è stata estratta dal plasmide pEGFP (Clontech) mediante amplificazione con i primers XhoI EGFP-FOR e XhoI EGFP-REV per inserire nel contempo alle due estremità della sequenza il sito di restrizione XhoI, necessario per l'inserimento del gene nel plasmide. Il frammento in seguito è stato inserito nel vettore TOPO (Invitrogen) e da questo digerito nuovamente con l'enzima XhoI, per essere certi della corretta formazione delle due estremità. Parallelamente il plasmide pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS è stato linearizzato con lo stesso enzima, che presenta un solo sito di taglio a valle del gene codificante per il scFv800E6. In figura 25 è mostrato il risultato delle due digestioni

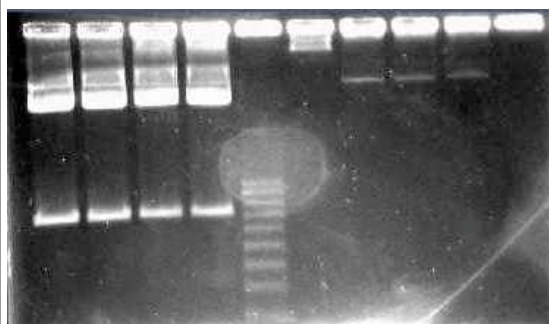


Figura-25: Digestione del plasmide TOPO (EGFP) e pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6-OCS con XhoI

Lane 1-4: Digestione del plasmide TOPO (EGFP) con XhoI

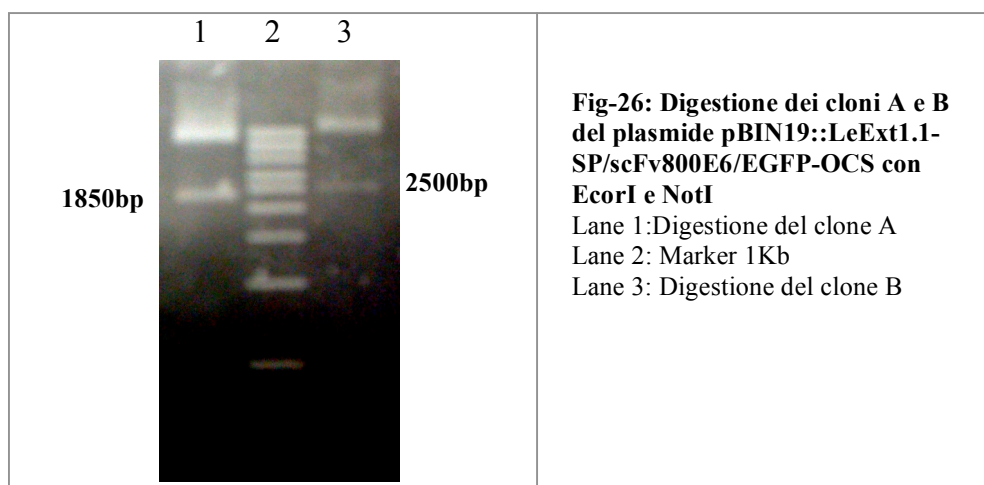
Lane 5: Marker 1000bp

Lane 6: pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6-OCS intero

Lane 7-8: Digestione di pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6-OCS

Le quattro bande da 750 bp, corrispondenti alla sequenza EGFP e le tre bande corrispondenti al vettore pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS linearizzato, sono state estratte e ligate. Il prodotto risultante dalla reazione è stato utilizzato per trasformare cellule di *E.coli* DH5 α . Sei delle colonie cresciute dopo un giorno sono state utilizzate per l'estrazione del DNA plasmidico. Il corretto clonaggio è stato verificato mediante digestione enzimatica con gli enzimi EcorI e NotI. Il primo sito si trova a monte del promotore LeExt1.1, il secondo a valle della sequenza EGFP e poco prima del terminatore OCS. Il sito NotI ha permesso di verificare la corretta direzionalità dell'inserimento. Un clonaggio nella giusta direzione dopo digestione con i due enzimi avrebbe dato un frammento da circa 2500 bp, mentre un clonaggio in direzione contraria avrebbe dato un frammento di circa 1850 bp, visto che in questo secondo caso il sito NotI sarebbe stato

posizionato a valle del scFv. La figura 26 illustra i risultati ottenuti da due colonie analizzate.



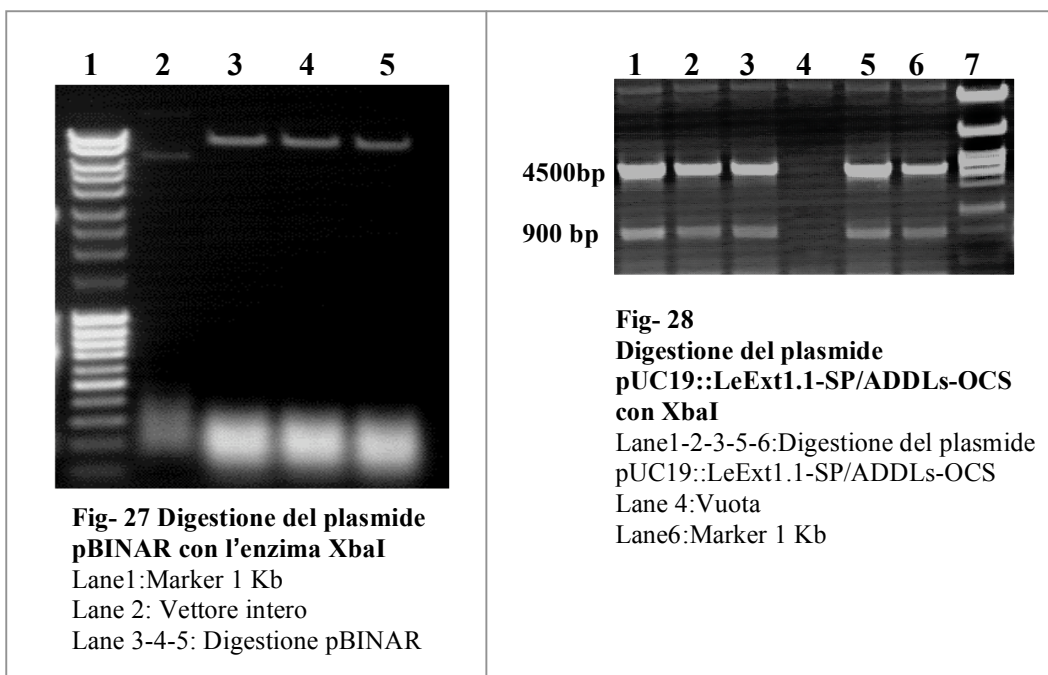
La colonia B che mostra il corretto inserimento del gene nel vettore, è stata sequenziata con i primers SP3'FOR e M13'REV per accertare, data la lunghezza del vettore, l'esattezza dell'intera sequenza.

18 PLASMIDI PER L'ESPRESSIONE DEL scFvADDLs

18.1 PLASMIDE pBINAR-35S-SP/scFvADDLs/OCS

Per verificare la possibile espressione in pianta del scFvADDLs, è stato deciso di inserire il frammento anticorpale nel vettore pBINAR. Tale vettore contiene il promotore costitutivo 35S, in grado di esprimere il gene eterologo in tutti gli organi vegetali della pianta, inoltre, ha offerto la possibilità di effettuare sia una trasformazione transiente, per ottenere una risposta più rapida, che una espressione stabile. Pertanto nel presente clonaggio si è scelto di inserire, a valle del promotore, pseudo-costitutivo, la sequenza nucleotidica codificante per il peptide segnale SP, il gene dell'anticorpo e la sequenza terminatrice OCS.

A questo scopo, il pUC19::LeExt1.1-SP/ADDLs/OCS è stato digerito con l'enzima di restrizione XbaI, che presenta due siti di taglio, uno a monte dell'SP e uno a valle dell'OCS. Parallelamente il vettore pBINAR è stato linearizzato subito a valle del promotore 35S. Il vettore pBINAR, essendo stato tagliato con un solo enzima, è stato sottoposto anche a defosforilazione per evitare che durante la reazione di ligasi tra inserto e vettore, potesse richiudersi su stesso. Nelle figure 27 e 28 sono mostrati rispettivamente la linearizzazione del vettore pBINAR e la digestione del frammento SP-ScFvADDLs dal vettore intermedio pUC19.



Le bande del plasmide linearizzato e le bande corrispondenti al frammento SP-ScFvADDLs (900 bp) sono state purificate e ligate. Il materiale proveniente dalla reazione è stato utilizzato per trasformare cellule di *E.coli* DH5 α

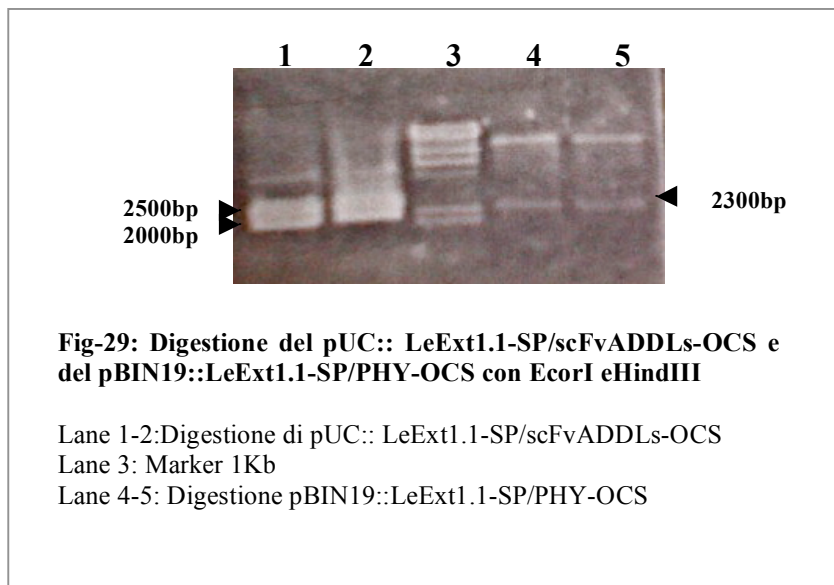
Il corretto clonaggio nel plasmide binario è stato verificato tramite digestione enzimatica con XbaI, le colonie positive dovevano rilasciare il frammento da 900bp. Una volta identificate le colonie positive è stato eseguito un controllo di direzionalità dell'inserto, infatti avendo digerito il plasmide con un solo enzima di restrizione c'era la possibilità che il frammento si fosse legato in direzione opposta. Per questo motivo, le colonie risultate positive dalla precedente digestione, sono state sottoposte ad un'ulteriore digestione con gli enzimi Ecor I, il cui sito di restrizione è presente a monte del promotore LeExt1.1, e NheI, il cui sito è localizzato nella regione terminale della sequenza del scFvADDLs. Se il clonaggio fosse riuscito avremmo ottenuto una banda, corrispondente alla sequenza che va dal promotore al scFv di circa 2 kb, nel caso in cui la cassetta SP-ScFvADDLs si fosse inserita in direzione opposta, il sito NheI sarebbe posizionato nella regione iniziale della sequenza, subito a valle del promotore, per cui avremmo ottenuto una banda di circa 1000 bp. Tre cloni degli 8 analizzati presentavano l'inserimento del frammento nella giusta direzione e sono stati sequenziati con i primers scFvADDLs- 5'intFOR e scFvADDLs-3'intREV per un'ulteriore verifica.

Tali primers sono stati disegnati internamente alla sequenza del scFv e diretti verso l'esterno della sequenza, in questo modo è stato possibile sequenziare l'intera cassetta del transgene, dal promotore fino alla sequenza terminatrice.

18.2 PLASMIDE pBIN19::LeExt1.1-SP/scFvADDLs/OCS

Per verificare la possibilità di esprimere anche il scFvADDLs in radice, la cassetta di rizosecrezione LeExt1.1-SP/scFvADDLs/OCS, presente nel vettore intermedio pUC19 precedentemente costruito, è stata inserita nel pBIN19. Pertanto il vettore intermedio pUC19:: LeExt1.1-SP/scFvADDLs/OCS e il pBIN19:: LeExt1.1-SP/PHY /OCS, sono stati digeriti con gli enzimi EcorI e HindIII. Nel primo caso per isolare la cassetta contenente il scFv e nel secondo per eliminare il pBIN19 dell'intera cassetta contenente il gene PHY.

La figura 29 mostra i risultati delle digestioni:



Il frammento da 2Kb delle prime due corsie del gel in figura 7, rappresenta la cassetta di rizosecrezione contenente il scFvADDLs, mentre nelle corsie 4 e 5 la banda più alta corrisponde al vettore pBIN19 privato della cassetta di rizosecrezione contenente il gene PHY (banda da 2,3Kb). La cassetta contenente il scFvADDLs e il vettore vuoto sono stati ligati e il prodotto dalla reazione è stato utilizzato per trasformare cellule di *E.coli* DH5 α . Sono state ottenute pochissime colonie, indicando una bassa efficienza di legazione, probabilmente dovuta alla grandezza del vettore, tutte le colonie ottenute sono state analizzate per sequenza allo scopo di verificare il

19 TRASFORMAZIONE E CRESCITA DELLE PIANTE TRANSGENICHE E TRANSIENTI PER L'ESPRESSIONE DEL scFv800E6

19.1. TRASFORMAZIONE DI *A. TUMEFACIENS* CON IL PLASMIDE: pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6/OCS

Le cellule competenti di *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 sono state trasformate, come riportato in materiali e metodi, con il DNA plasmidico purificato di pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS. 140 cloni erano ottenuti dopo piastramento dei batteri trasformati, parte di essi scelti random, sono stati analizzati per PCR utilizzando i primers SPfor e 800E6 XhoI-rev. Il risultato riportato in figura 30 mostra otto campioni positivi che presentano una banda di circa 900 bp, corrispondente all'amplicone atteso.

Le colonie positive all'analisi per PCR sono state designate con lettere alfabetiche dalla A alla H.

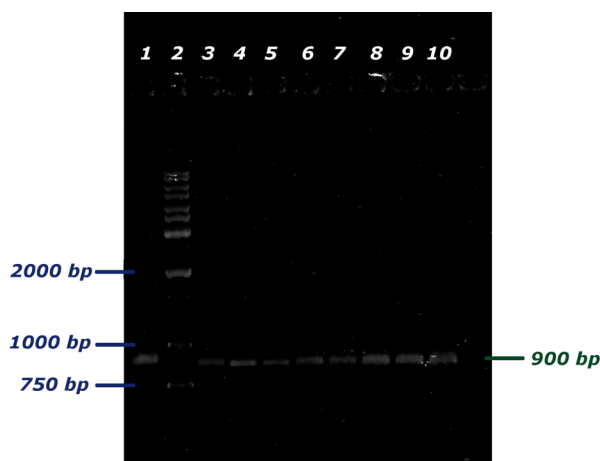


Figura 31: Gel di corsa (agarosio 1%) con i campioni di PCR da colonia di agro trasformati.

Lane 1: PCR controllo con oligo SPfor e 800E6 XhoI-rev sul DNA plasmidico contenente il gene dell'anticorpo.

Lane 2: Marker 1Kb (fermentas). Corsie 3-10: PCR con oligo SPfor e 800E6 XhoI-rev su 8 cloni analizzati.

19.2 TRASFORMAZIONE E RIGENERAZIONE DI *N. TABACUM*

La trasformazione delle piante è stata eseguita utilizzando materiale fogliare proveniente da piante di *N. tabacum* micropropagate in vitro. Sono stati ritagliati un totale di 50 dischi da foglie centrali di piante "wild type" di circa quattro settimane di crescita. Ognuna delle otto colonie (A-H) positive di *Agrobacterium* è stata utilizzata per trasformare cinque dischi fogliari, per un totale di 40 dischi trasformati. Dieci dischi dei 50 sono stati utilizzati come controlli negativi della trasformazione.

Dopo due giorni di crescita nessun disco presentava segni di deterioramento. Nell'arco delle prime due settimane alcuni dischi sono andati perduti a causa di un'eccessiva proliferazione del batterio, anche se in molti casi essi portavano segni evidenti della prima formazione di un callo

di circa 2-millimetri di grandezza. In figura 24 vengono mostrati dischi fogliari di due settimane di sviluppo, stadio nel quale è visibile la formazione iniziale dei calli.

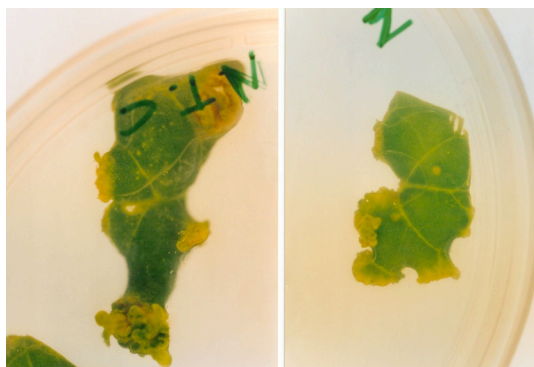


Figura 32:
Aspetto dei dischi
fogliari di
N. tabacum a due
settimane dalla
trasformazione.

I germogli appena formati sono stati separati dal corpo del disco per discriminare tra i singoli eventi di trasformazione ne segue che il numero delle piante rigenerate varia da disco a disco.

Al termine della quinta settimana, i germogli di circa 1 cm di altezza sono stati tagliati e trasferiti in barattoli sterili contenenti terreno fresco di radicazione e antibiotici. Trascorsa una settimana dal trasferimento, le piante presentavano un discreto sviluppo radicale, come mostrato in figura 33.

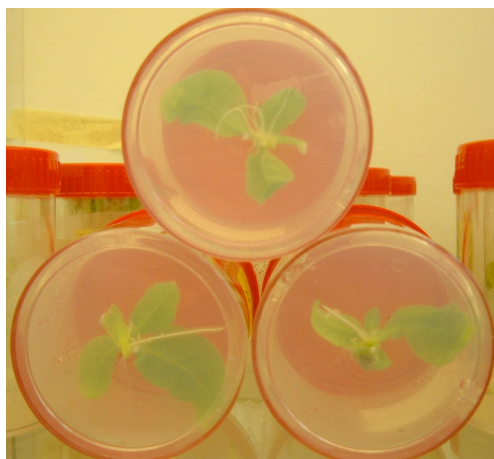


Figura 33:
Sviluppo radicale
delle piante dopo
una settimana dal
trasferimento su
terreno solido.

Dopo sei settimane, le piante provenienti dai dischi trasformati con le colonie batteriche G e H, sono andate perdute, in alcuni casi per l'impossibilità di rimuovere il batterio, in altri per lo stress indotto dal trasferimento da un terreno selettivo di rigenerazione a quello di crescita e radicazione.

Il primo sintomo della morte del germoglio è stato il progressivo ingiallimento delle foglie e la mancata formazione di radici nel mezzo di crescita. Questo fenomeno si è verificato sia per alcuni dei germogli derivanti da dischi trasformati sia in tutti i controlli negativi, le cui piante hanno cominciato a morire subito dopo il trasferimento in terreno solido

(Figura 34), dimostrando quindi una risposta fisiologica non adeguata allo stress del cambiamento di terreno e delle condizioni di crescita *in vitro*.

La perdita di piante putative transgeniche è un fenomeno frequente correlato molto probabilmente sia allo stato fisiologico e di salute generale della pianta, che alle sue caratteristiche genetiche, nonché alla sua intrinseca capacità di rispondere ai diversi stress ambientali.



Figura 34: Confronto tra due piante putative transgeniche resistenti alla Kanamicina (sulla sinistra) ed una pianta controllo (sulla destra) ad una settimana dal trasferimento in terreno solido.

Trascorse sette settimane la maggior parte delle piante rigenerate presentava un'altezza di circa 5-6 cm ed un discreto sviluppo radicale.

I dati riguardanti la trasformazione e la rigenerazione sono riassunti nella tabella 6.

Clone batterico	Numero di dischi trasformati	Numero di dischi andati perduti	Numero di piante rigenerate
A	5	0	9
B	5	2	5
C	5	0	11
D	5	0	14
E	5	3	5
F	5	1	6
G	5	5	0
H	5	5	0

Tabella 6: Analisi della rigenerazione di dischi fogliari di *N.tabacum*.

Trascorse otto settimane dalla trasformazione, tra le piante in cui la rigenerazione aveva avuto esito positivo, ne sono state selezionate 12 rappresentative dei cloni impiegati per la trasformazione. Le piante sono state designate con le lettere corrispondenti al clone batterico con cui era stato trasformato il loro disco fogliare di provenienza e con un numero identificativo progressivo, pertanto le piante ottenute erano: A1, A2, B1, B3, C1, C3, D1, D5, E1, E3, F1, F2. Le piante in esame sono state trasferite sia in coltura idroponica (figure 35, 36) che in terreno solido.

Fin dal giorno successivo al loro trasferimento in coltura liquida le piante hanno dimostrato un eccellente adattamento e una maggiore velocità di crescita rispetto a quelle cresciute in terreno solido.

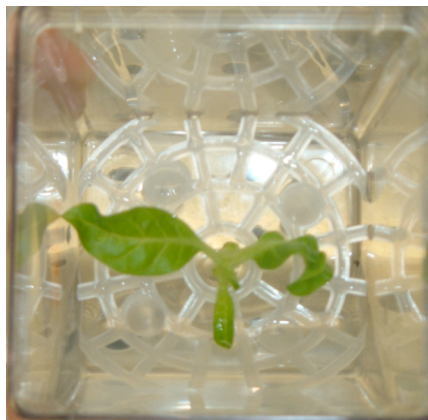


Figura 35: Una pianta appena trasferita nel sistema di crescita idroponica (vista dall'alto).



Figura 36: Una pianta appena trasferita nel sistema di crescita idroponica (vista dal basso).

Un identico sistema idroponico è stato adibito per la crescita di una pianta “wild-type”, controllo necessario per le analisi molecolari successive.

Dopo circa una settimana dal trasferimento in idroponica le plantule hanno cominciato a sviluppare radici, e nel giro di altre due settimane l'apparato radicale mostrava uno sviluppo maggiore rispetto a quello in terreno solido. Nelle figure 37 e 38 viene mostrato un confronto tra una pianta trasferita in idroponica da una settimana e un'altra a tre settimane di distanza dal trasferimento.



Figura 37: Una pianta trasferita in coltura idroponica da una settimana.



Figura 38: La stessa pianta dopo una permanenza di tre settimane in coltura idroponica sviluppa radici di circa 4 cm di lunghezza.

Alcuni cloni delle precedenti piante transgeniche, sono stati rigenerati in vitro e cresciuti per alcune settimane in aeroponica per ottenere un maggiore

accrescimento radicale.

Nella figura 39 è mostrata l'immagine dell'apparato radicale di due piante cresciute in coltivazione aeroponica.



Fig-39

Aspetto delle radici di
N. tabacum dopo 10 giorni
dalla crescita in aeroponica

Come possiamo vedere, l'apparato radicale di queste piante, è decisamente più esteso, rispetto a quello delle piante cresciute in idroponica. Trascorse tre settimane dalla coltivazione aeroponica, le piante sono state nuovamente poste in idroponica, per permettere il rilascio degli essudati e la loro analisi proteica.

19.3 TRASFORMAZIONE E RIGENERAZIONE DI *SOLANUM TUBEROSUM*.

La trasformazione dei dischi fogliari è stata eseguita esattamente come per le piante di *N. tabacum*, Nella figura 40 sono mostrate le immagini dei dischi dopo 1 settimana dalla trasformazione e la formazione dei primi calli.



Fig 40-Aspetto dei dischi fogliari di *Solanum tuberosum* ad una settimana dalla trasformazione

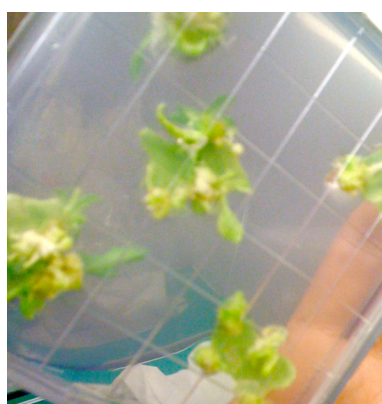


Fig 41-Aspetto dei dischi fogliari di *Solanum tuberosum* a quattro settimane dalla trasformazione

Dopo otto settimane dalla trasformazione sono state scelte 10 piante rappresentative dei cloni che erano stati utilizzati nella trasformazione e in cui la formazione dei calli e la crescita dei germogli era stata ottenuta senza alcun problema. Le piante ottenute (A1, A2, B1, B2, C1, C3, E1, E2, F2, F3) sono state tutte messe in crescita in un sistema aeroponico. In parallelo anche due piante wild-type sono state messe a crescere nello stesso modo. In figura 42 viene mostrato l'apparato radicale delle piante dopo circa tre settimane dal trasferimento in aeroponica



Fig-42

Aspetto delle radici di *Solanum tuberosum* in aeroponica poco prima della raccolta

19.4 TRASFORMAZIONE DI *A. TUMEFACIENS* CON IL PLASMIDE: pBIN19::LeExt-SP/scFv800E6-EGFP/OCS

La procedura di trasformazione delle cellule di *A. tumefaciens* è avvenuta esattamente come descritto sopra. Le colonie ottenute sono state saggiate mediante PCR di controllo con i primer scFv800E6-FOR e EGFP-XhoI-REV e tutte le colonie ottenute presentavano l'integrazione del vettore.

Sono state scelte 4 colonie batteriche, denominate A, B, C e D, che sono poi state utilizzate per la trasformazione dei dischi fogliari

19.5 TRASFORMAZIONE E RIGENERAZIONE DI *N. TABACUM*

Le colonie A, B, C, D sono state cresciute come descritto precedentemente e le colture sono state utilizzate per la trasformazione dei dischi fogliari. Anche in questo caso sono stati trasformati 5 dischi per clone e 10 dischi sono stati utilizzati come controllo negativo.

In alcuni casi, la trasformazione non è andata a buon fine, alcuni dischi sono infatti andati perduti per la mancata eliminazione dell'agrobatterio. In tabella è mostrato il risultato dei dischi ottenuti.

Clone batterico	Numero di dischi trasformati	Numero di dischi andati perduti	Numero di piante rigenerate
A	5	1	11
B	5	0	14
C	5	4	2
D	5	0	14

Di seguito sono mostrate le immagini dei dischi (43), dei primi germogli (44) e delle piantine rigenerate (45)



Fig 43: Aspetto dei dischi fogliari ad una settimana dalla trasformazione



Figura 44: Aspetto dei dischi fogliari a quattro settimane dalla trasformazione



Figura 45: Aspetto delle piantine generate dai calli dopo sei settimane dalla trasformazione

20 TRASFORMAZIONE E CRESCITA DELLE PIANTE TRANSIENTI E TRANSGENICHE PER L'ESPRESSIONE DI scFvADDLs

20.1 TRASFORMAZIONE DI *A. TUMEFACIENS* CON IL VETTORE pBINAR:35S-SP/ScFvADDLs/OCS

Agrobacterium tumefaciens GV3101 è stato trasformato con il plasmide pBINAR:35S-SP/ScFvADDLs/OCS seguendo la stessa procedura utilizzata per inserire il plasmide contenente scFv800E6. Dei circa 40 cloni ottenuti in seguito al piastramento dei batteri trasformati, gran parte sono stati analizzati per PCR utilizzando i primers ADDLs-FOR e ADDLs-REV e tranne poche eccezioni, quasi tutti presentavano un frammento di circa 800bp corrispondente al peso molecolare del scFvADDLs. La figura 46 mostra otto dei cloni risultati positivi.

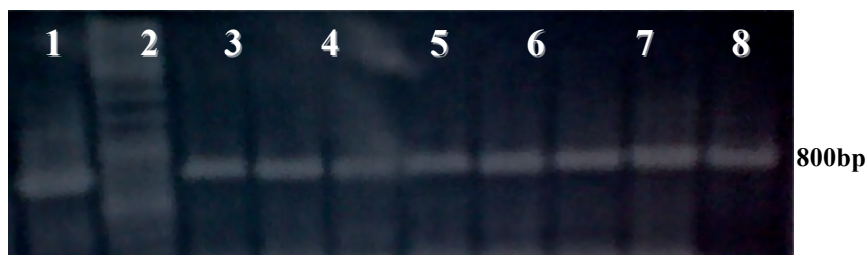


Figura 46: Gel di corsa (agarosio 1%) con i campioni di PCR da colonia di agro trasformati.

Lane 1:PCR Plasmide pBINAR con oligo ADDLs.FOR e ADDLs-REV

Lane 2: Marker 1kb (fermentas)

Corsie 3-10:PCR con oligo ADDLs.FOR e ADDLs-REV

20.2. TRASFORMAZIONE TRANSIENTE DELLE PIANTE DI *N.TABACUM*

Quattro cloni di *Agrobacterium* positivamente trasformati (denominati A, C, D, F) sono stati scelti per la procedura di agroinfiltrazione (vedi materiali e metodi) delle foglie di *N. tabacum*. Ogni pianta è stata agroinfiltrata solo su alcune foglie e sono state distinte le foglie infettate da quelle sistemiche. La figura mostra piante di *N. tabacum* trattate e non trattate.



Figura 47 :Piante di *N.tabacum* cresciute in serra per 3 settimane



Figura 48:Piante di *N.tabacum* 6 giorni dopo l'agroinfiltrazione

20.3 TRASFORMAZIONE DEI DISCHI FOGLIARI DELLE PIANTE DI *N. TABACUM*

Le stesse cellule di agrobatterio, utilizzate per l'agroinfiltrazione sono state utilizzate per la trasformazione dei dischi fogliari. La procedura utilizzata è stata identica a quella esposta precedentemente, in figura sono mostrate le foto dei dischi fogliari e dei germogli ottenuti a diverse settimane dalla trasformazione.

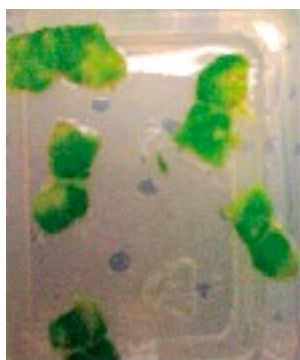


Figura 49: Aspetto dei dischi fogliari ad una settimana dalla trasformazione



Figura 50: Aspetto dei dischi fogliari a cinque settimane dalla trasformazione



Figura 51: Aspetto delle piantine generate dai calli dopo sei settimane dalla trasformazione

21 ANALISI MOLECOLARE DEI TESSUTI DI PIANTE TRANSGENICHE (scFv800E6)

21.1 ANALISI MOLECOLARE DEL DNA ESTRATTO DA PIANTE DI TABACCO TRANSGENICHE TRASFORMATE CON AGRO CONTENENTE IL pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6-OCS

Il DNA delle piante è stato estratto da circa 100 mg di tessuto fogliare ed è stato amplificato con i primers 800E6-SacI-for e 800E6-XhoI-rev il prodotto atteso dall'amplificazione è un frammento di circa 320 paia di basi, corrispondente alla catena leggera VL dell'anticorpo ingegnerizzato 800E6.

In figura 52 (corsie 3-14) è possibile vedere il prodotto ottenuto da PCR su tutti i campioni di DNA estratto dalle piante putative transgeniche. Inoltre la lane 2 riporta il risultato della stessa reazione sul DNA di una pianta controllo non trasformata. Come controllo positivo per la reazione è stata effettuata un'amplificazione del DNA di una colonia di *A. tumefaciens* contenente il plasmide binario con cui sono state precedentemente trasformate le piante.

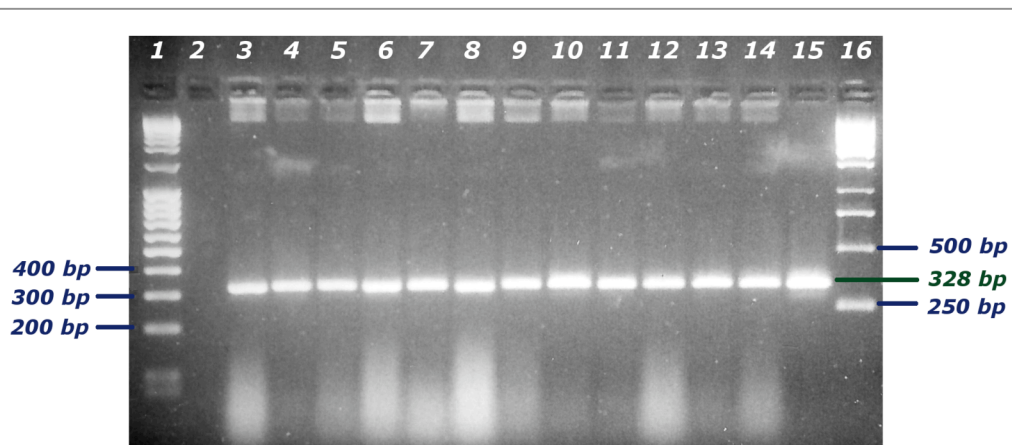


Figura 52: Gel di agarosio (2%) con i campioni di PCR su DNA di piante trasformate.

Lane 1: Marker MassRuler 100 bp (Fermentas).

Lane 2: PCR su DNA di una pianta non trasformata.

Corsie 3-14: PCR sul DNA delle 12 piante selezionate.

Lane 15: PCR da colonia di *A.tumefaciens* GV3101 contenente in vettore binario con il gene anticorpale.

Lane 16: Marker Marker 1 Kb (Fermentas).

Come si evince dalla figura tutte le piante in coltura idroponica risultano aver integrato il transgene: le reazioni di PCR sulle 12 piante producono un'amplificazione di un frammento di circa 320 bp; lo stesso frammento si ottiene tramite una PCR da colonia di uno dei cloni utilizzati per la loro trasformazione (lane 15). Non si osserva alcuna amplificazione sul DNA estratto da una pianta controllo non trasformata (lane 2).

Una conferma ulteriore è stata ottenuta dal corretto sequenziamento dalla banda purificata in corsia 13 (pianta F1) con gli stessi primer impiegati nella reazione di PCR.

21.2 ANALISI MOLECOLARE PER RT-PCR

Per verificare il profilo di espressione delle piante transgeniche è stata condotta un'analisi molecolare mediante RT-PCR.

L'RNA totale estratto da 100 mg di radici e di foglie delle piante A1, C3, D5 ed F1 e di due piante controllo è stato sottoposto ad una reazione di RT-PCR con i primer 800E6-SacI-for e 800E6-XhoI-rev. L'amplicone atteso anche in questo caso è di 328 bp e corrisponde al frammento anticorpale VL. La figura 53 mostra il risultato della reazione.

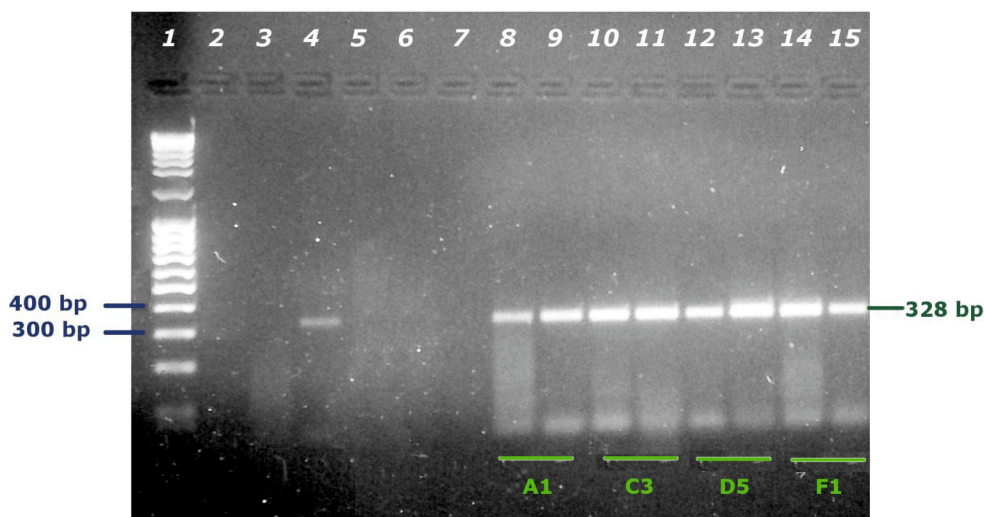


Figura 53: Gel di corsa (agarosio 2%) delle reazioni di RT-PCR.

Lane 1: Marker MassRuler 100 bp (Fermentas).

Corsie 2-3 e 5-6: PCR su foglie e radici di due piante wild-type.

Lane 4: RT-PCR su colonia batterica GV3101 con il plasmide vettore della trasformazione.

Lane 7: corsia vuota.

Lane 8: RT-PCR su RNA di foglia, pianta A1.

Lane 9: RT-PCR su RNA di radice, pianta A1.

Lane 10: RT-PCR su RNA di foglia, pianta C3.

Lane 11: RT-PCR su RNA di radice, pianta C3.

Lane 12: RT-PCR su RNA di foglia, pianta D5.

Lane 13: RT-PCR su RNA di radice, pianta D5.

Lane 14: RT-PCR su RNA di foglia, pianta F1.

Lane 15: RT-PCR su RNA di radice, pianta F1.

Le bande nelle corsie 8,9,10 e 11 sono state estratte e sequenziale con gli stessi primer utilizzati per la reazione: in tutti i casi la banda dominio anticorpale VL.

21.3- ANALISI MOLECOLARE PER RT_PCR DELLE PIANTE DI *SOLANUM TUBEROSUM* TRASFORMATE CON AGRO CONTENETE IL pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6-OCS

Per verificare il profilo di espressione delle piante transgeniche è stata condotta un'analisi molecolare per RT_PCR su alcune delle piante cresciute in areoponica: A1,B1,C1,E1. L'RNA totale estratto da 100 mg di foglie delle piante e di una pianta di controllo è stato sottoposto ad una reazione di RT-PCR con i primer 800E6-for e

800E6-XhoI-rev. L'amplicone atteso era di 700 bp, corrispondente all'intero frammento anticorpale. La figura 54 mostra il risultato della reazione ottenuta dalle piante analizzate.

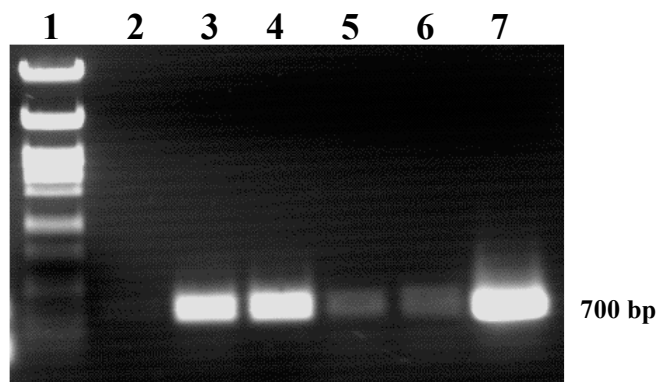


Figura-54: Gel di corsa (agarosio 2%) delle reazioni di RT-PCR

Lane 1:Marker 1Kb (Sigma)

Lane 2: RT-PCR su RNA di foglia, pianta wild –type

Lane 3:RT-PCR su RNA di foglia pianta A1

Lane 4:RT-PCR su RNA di foglia pianta B1

Lane 5:RT-PCR su RNA di foglia pianta C1

Lane 6:RT-PCR su RNA di foglia pianta E1

Lane 7:RT-PCR su colonia batterica GV3101 con il plasmide vettore della trasformazione.

22- ANALISI MOLECOLARI DEI TESSUTI FOGLIARI DI PIANTE TRANSIENTI (scFvADDLs)

22.1- ANALISI MOLECOLARE PER RT_PCR DELLE PIANTE TRANSIENTI:

Per verificare il profilo di espressione delle piante transienti è stata condotta un'analisi molecolare mediante RT-PCR, i primer utilizzati sono l' ADDLs-for e l' ADDLs-rev, e gli estratti provengono dalle piante A, C, D ed F.

La figura 55 mostra il risultato della reazione effettuata sulle piante A ed D.

Le bande nelle corsie 3-4-5-6 sono state estratte e sequenziate con gli stessi primer utilizzati per la reazione: in tutti i casi la banda corrispondeva al frammento anticorpale atteso

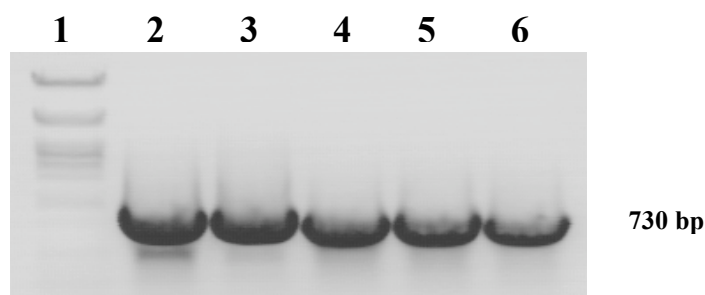


Fig-55 Gel di corsa (agarosio 2%) delle reazioni di RT-PCR

Lane 1:Marker 1Kb

Lane 2: PCR su colonia batterica GV3101 con il plasmide vettore della trasformazione.

Lane 3:RT-PCR su RNA di foglia infetta pianta A

Lane 4:RT-PCR su RNA di foglia sistemica pianta A

Lane 5:RT-PCR su RNA di foglia infetta pianta D

23- ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA

23.1- WESTERN BLOTTING DEL scFv800E6 ESTRATTO DA PIANTE TRANSGENICHE DI N.TABACUM CRESCIUTE IN IDROPONICA.

Per verificare il profilo di espressione proteica delle piante trasformate è stata fatta un'estrazione proteica da radici e foglie delle piante A1, C3, D5, e F1. Gli estratti sono stati analizzati mediante western blotting insieme ad un'aliquota del mezzo di coltura rizosecreto, concentrato 100 volte.

Nelle figure 56 e 57 sono riportati i risultati dell'esperimento.

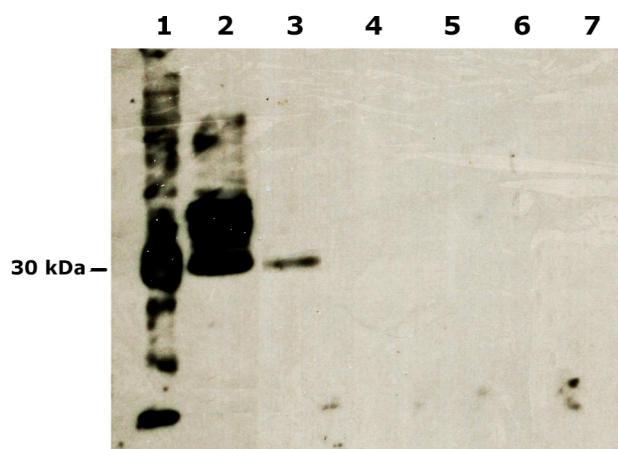


Figura 56: Western Blotting dei campioni di una pianta transgenica e di un controllo.

Lane 1: Marker Rainbow (Amersham RPN800).
Lane 2: Estratto proteico da radice, pianta A1.
Lane 3: Estratto proteico da foglia, pianta A1.
Lane 4: Mezzo di coltura, pianta A1.
Lane 5: Estratto proteico da radice, pianta non trasformata.
Lane 6: Estratto proteico da foglia, pianta non trasformata.
Lane 7: Mezzo di coltura, pianta non trasformata.

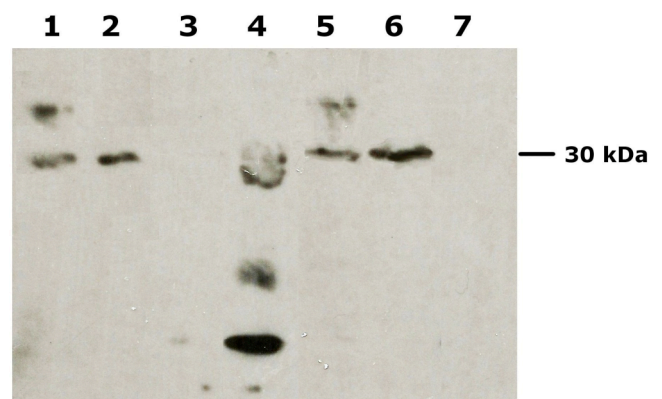


Figura 57: Western Blotting dei campioni di due piante transgeniche.

Lane 1: Estratto proteico di foglia, pianta F1.
Lane 2: Estratto proteico di radice, pianta F1.
Lane 3: Mezzo di coltura, pianta F1.
Lane 4: Marker rainbow (Amersham RPN800).
Lane 5: Estratto proteico di foglia, pianta C3.
Lane 6: Estratto proteico di radice, pianta C3.
Lane 7: Mezzo di coltura, pianta C3.

Come mostrato nelle figure 56 e 57, in tutti gli estratti proteici di foglie e radici delle piante transgeniche sono state evidenziate bande all'altezza di 30 kDa, il peso atteso per l'anticorpo a singola catena. Si notano bande più intense negli estratti proteici di radice (figura 33, lane 2; figura 34, lanes 2 e 6), suggerendo una espressione o un accumulo preferenziale dell'anticorpo in questo tessuto.

Negli estratti proteici dalla pianta controllo non sono presenti bande, mentre invece l'evidenziazione del marcatore di peso molecolare è probabilmente a

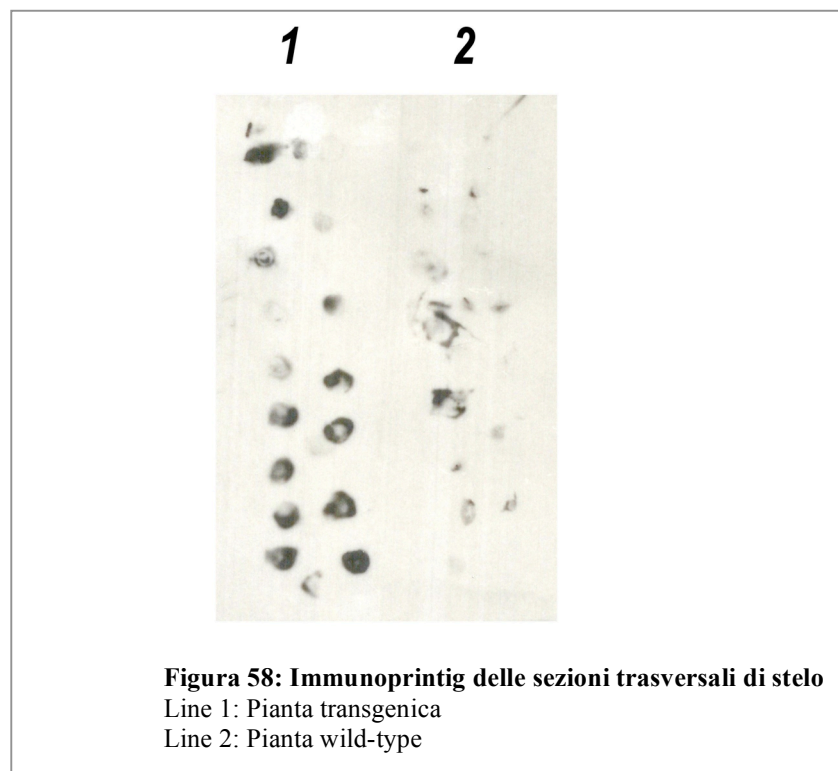
causa di un legame aspecifico dello stesso marcatore con l'anticorpo utilizzato per sviluppare la reazione.

In figura 57, corsie 1 e 5, è evidente la presenza di bande doppie, una di circa 30 kDa e un'altra di peso molecolare maggiore, circa 60 kDa, possibilmente ascrivibile all'associazione di due frammenti scFv nel formare spontaneamente un dimero, come avviene negli anticorpi completi, fenomeno già osservato da noi e da altri autori (Ma et al., 1974; Ma et al., 1998; McCormick et al., 1999; Giritch et al 2006)

In nessun caso gli esperimenti effettuati hanno dimostrato la presenza dell'anticorpo negli essudati radicali delle piante transgeniche, suggerendo che esse o non sono in grado di effettuare correttamente la secrezione di queste molecole ricombinanti, o che i livelli di anticorpo nel mezzo siano al di sotto della sensibilità del metodo utilizzato.

Un'ulteriore analisi dell'espressione proteica nei diversi organi delle piante transgeniche è stata effettuata mediante la tecnica dell'immunoprinting.

In figura 58 è mostrato l'immunoprint delle sezioni trasversali di stelo di una pianta transgenica (1) e di una non trasformata (2). La colorazione nel primo caso è molto più intensa e specifica; la pianta wild-type risulta negativa, come aspettato e la flebile colorazione è probabilmente imputabile all'aspecificità dell'anticorpo utilizzato.



I risultati dell'immunoprinting dei tessuti di fogliari e radicali delle piante transgeniche e di controllo sono mostrati in figura 59.

Tutti i campioni su cui è stato effettuato il blotting sono costituiti da frammenti di radice e tre foglie di circa sei settimane di sviluppo.

Nei campioni 1-3 sono presenti tessuti di tre piante transgeniche: rispettivamente D5, E1 ed F2. Nel campione numero 4 le foglie e le radici appartengono ad una pianta controllo non trasformata.

Dalla figura 59 (1-3) è possibile notare che le piante transgeniche esibiscono una colorazione molto intensa a livello delle radici, suggerendo che in questi organi vegetativi avvenga una espressione del transgene maggiore rispetto a quella delle foglie, che infatti vengono colorate meno intensamente nonostante abbiano una superficie di esposizione al colorante maggiore. Nel caso della pianta di controllo wild-type (figura 36-4) l'anticorpo coniugato alla perossidasi sembrerebbe legare debolmente in maniera aspecifica i componenti presenti nelle radici mentre non presenterebbe alcuna affinità per il tessuto fogliare, nonostante la maggiore concentrazione di proteine risultando praticamente un vero controllo negativo, cioè zero segnale.

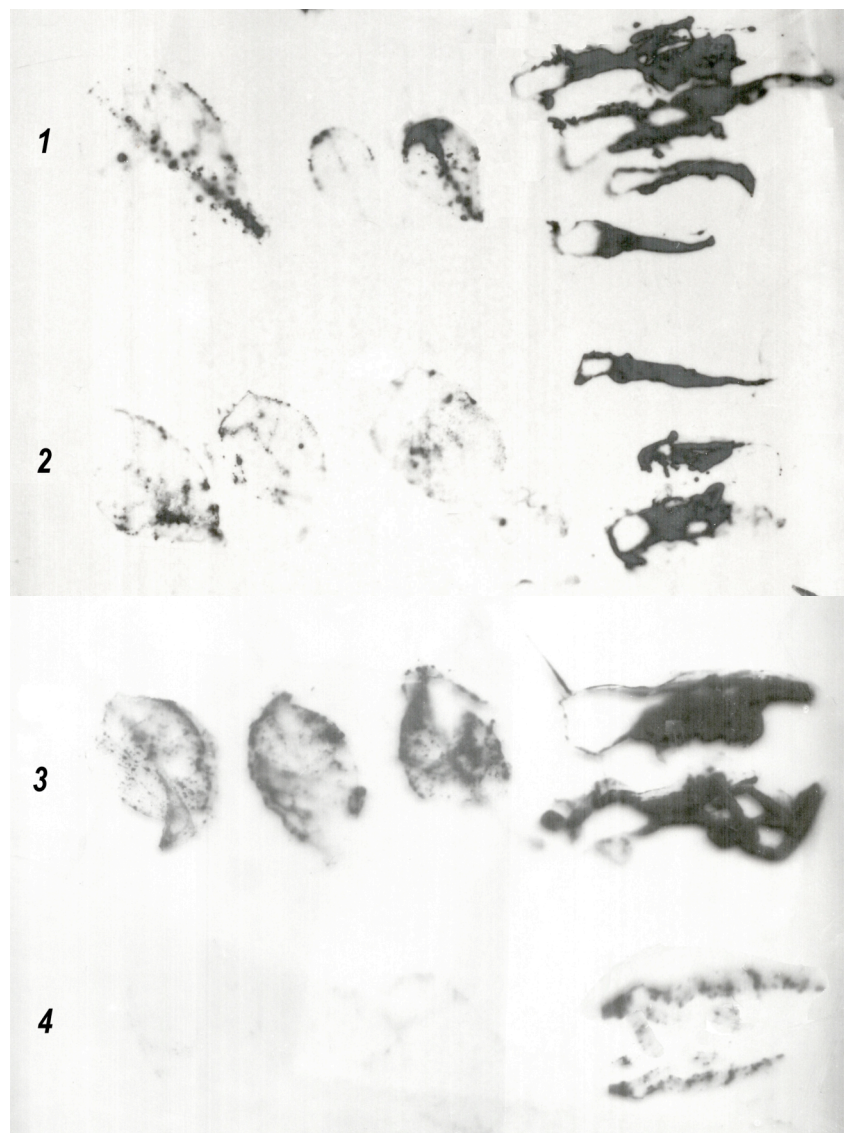


Figura 59: Immunoprinting di foglia e radice

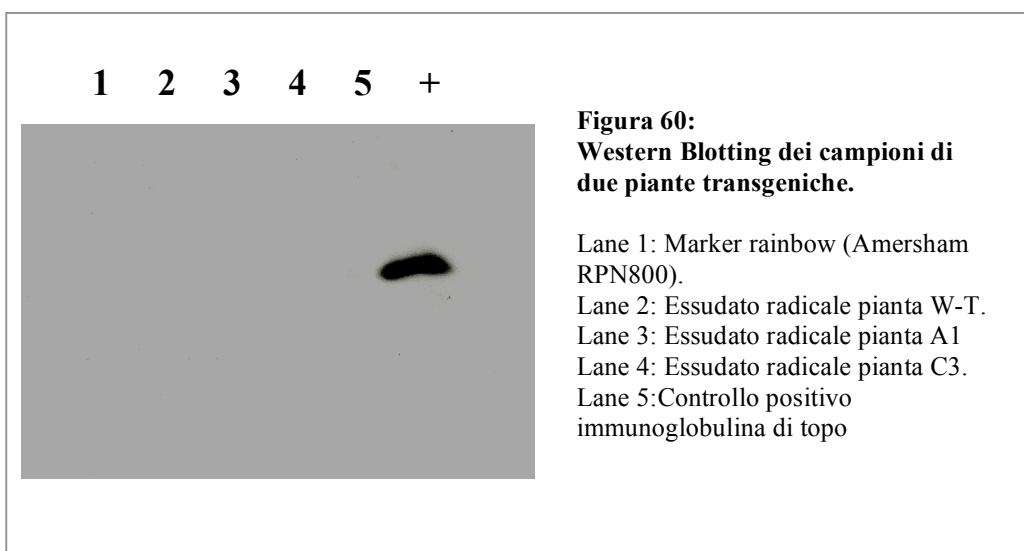
- 1: Pianta D5
- 2: Pianta E1
- 3: Pianta F2
- 4: Pianta wild-type

23.2 WESTERN BLOTTING DEL scFv800E6 ESTRATTO DA PIANTE DI *N.TABACUM* CRESCIUTE IN UN SISTEMA DI COLTIVAZIONE AREOPONICO.

Le stesse piante su cui è stata effettuata l'analisi dell'espressione proteica sono state micropropagate e raggiunti i 5 cm di estensione radicale, sono state messe in crescita in un sistema di tipo areoponico.

Le piantine dopo 10 giorni mostravano un'enorme estensione radicale e una volta raggiunto il massimo accrescimento sono state nuovamente messe in coltura idroponica, allo scopo di verificare la presenza del transgene nel mezzo di crescita della pianta.

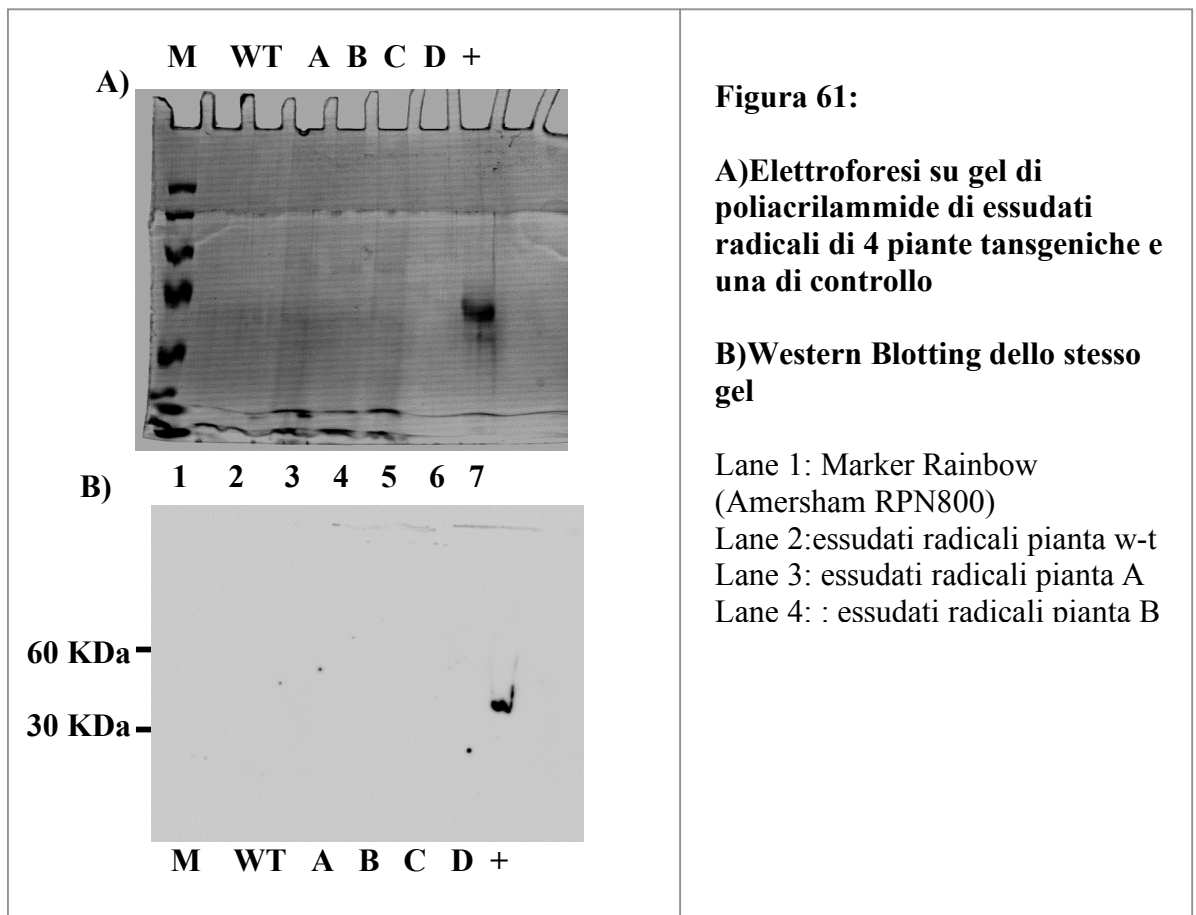
Gli essudati radicali sono stati prelevati a distanza di due cinque e dieci giorni. In figura 60 è mostrato l'esperimento eseguito sulle piante A1 e C3 a cinque giorni dal trasferimento in idroponica.



23.3- WESTERN BLOTTING DEL scFv800E6 ESTRATTO DA PIANTE TRANSGENICHE DI *S. TUBEROSUM* CRESCIUTE IN UN SISTEMA DI COLTIVAZIONE AREOPONICO.

Di seguito è mostrata la figura del Western Blotting effettuato in essudati radicali di piante di patata transgeniche esprimenti il scFv800E6.

Nelle figure 61 e 62 sono riportati i risultati dell'esperimento effettuato su una pianta w-t e le piante A,B,C,D transgeniche. Nell'ultima Lane è stato caricato un controllo positivo, IGg di topo, allo scopo di accertarsi della corretta riuscita dell'esperimento di Western Blotting.



L'SDS-PAGE fornisce un risultato preliminare, dal gel infatti è perfettamente visibile, la bassa concentrazione proteica estratta dagli essudati.

Negli estratti proteici dalle piante transgeniche infatti non sono state rilevate bande relative al scFv800E6, probabilmente a causa del peptide segnale non sufficientemente efficiente, o di un sistema esocitotico della pianta non adatto al frammento anticorpale in esame o ad una concentrazione proteica troppo bassa.

Un' ulteriore analisi è stata effettuata in foglia e radice mediante la tecnica dell'immunoprinting. In figura 62 è mostrato l'immunoprint di foglie e radici, di piante trasformate e piante di controllo.

I tessuti sono stati raccolti dopo circa quattro settimane di crescita in areoponica.

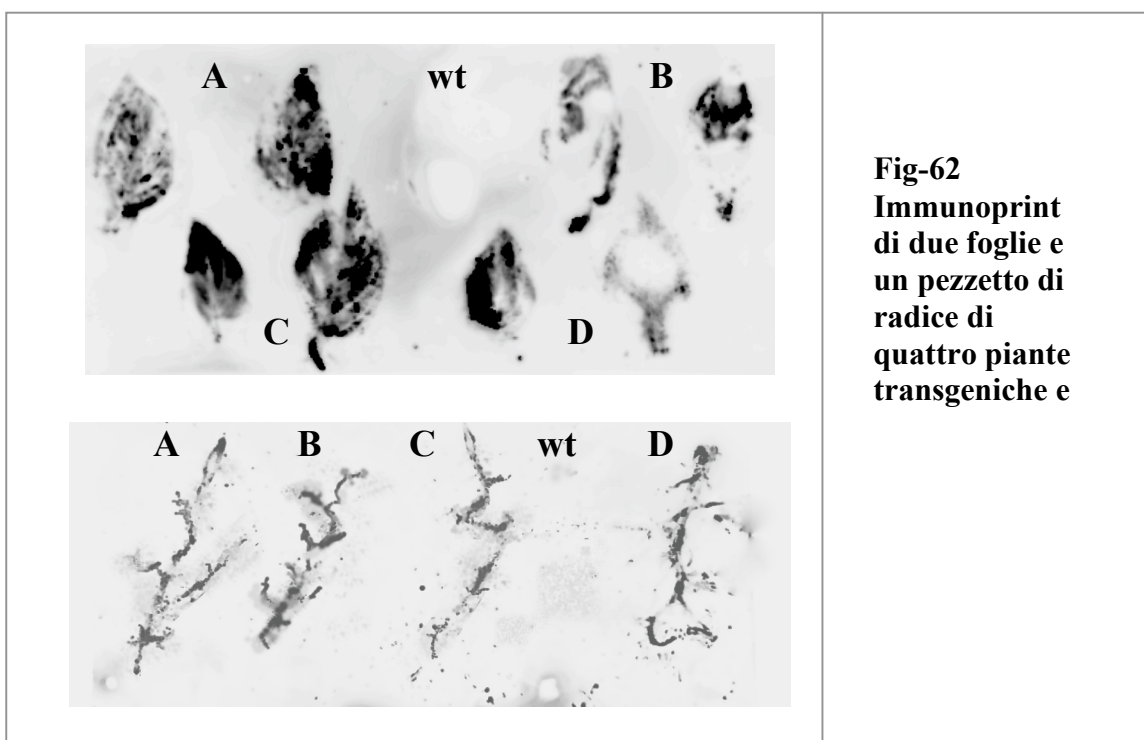


Fig-62
Immunoprint
di due foglie e
un pezzetto di
radice di
quattro piante
transgeniche e

Come è mostrato nella figura le foglie presentano un segnale molto forte, ma meno intenso nell'immunoprint eseguito nei tessuti radicali. In entrambi gli immunoprint non sono presenti legami "aspecifici" tra l'anticorpo di rilevamento e le proteine della pianta di controllo wild-type.

23.4 WESTERN BLOTTING DEL scFvADDLs ESTRATTO DA PIANTE TRANSIENTI DI *N. TABACUM* CRESCIUTE IN SERRA SOTTO CONDIZIONI CONTROLLATE

Prima di procedere con il Western Blotting, gli estratti proteici delle piante trasformate e delle piante wild-type sono stati preparati accuratamente.

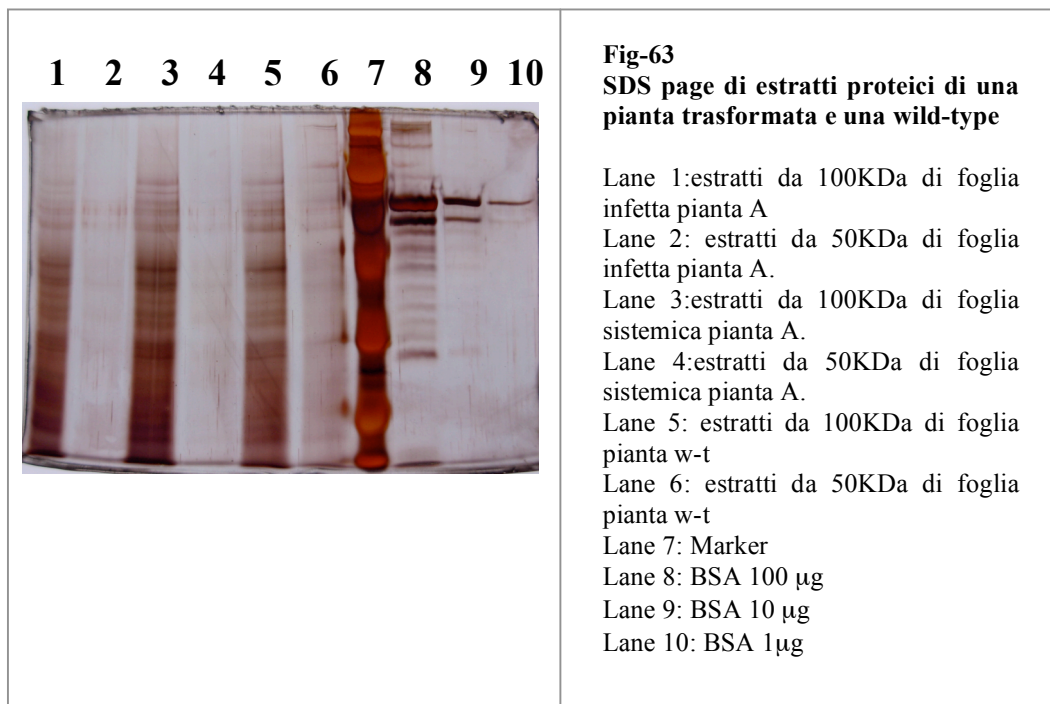
E' stata effettuata una purificazione con colonnine allo scopo di arricchire e purificare la miscela di proteine estratte, in un caso abbiamo utilizzato cutoff da 100 KDa, in modo da ottenere solo proteine con un peso molecolare inferiore ai 100 KDa.

La miscela proteica ottenuta da questa prima scrematura è stata nuovamente arricchita e purificata utilizzando colonnine con resina a cutoff 50KDa in modo da ottenere solo proteine con peso molecolare massimo di 50KDa, considerato che il frammento anticorpale è di 30 KDa,

Gli estratti proteici, ottenuti sia da foglie infette che da sistemiche sono stati visualizzati su gel di poliacrilammide. In parallelo sullo stesso gel abbiamo caricato tre concentrazioni note di BSA per confrontare a livello quantitativo l'intensità delle bande proteiche.

In una pianta trasformata, la percentuale di proteina eterologa espressa si aggira generalmente tra lo 0.1 e l'1%, ed è importante caricare una quantità proteica tale che, la piccola percentuale rappresentata dall'eterologa possa essere visualizzata con il Western.

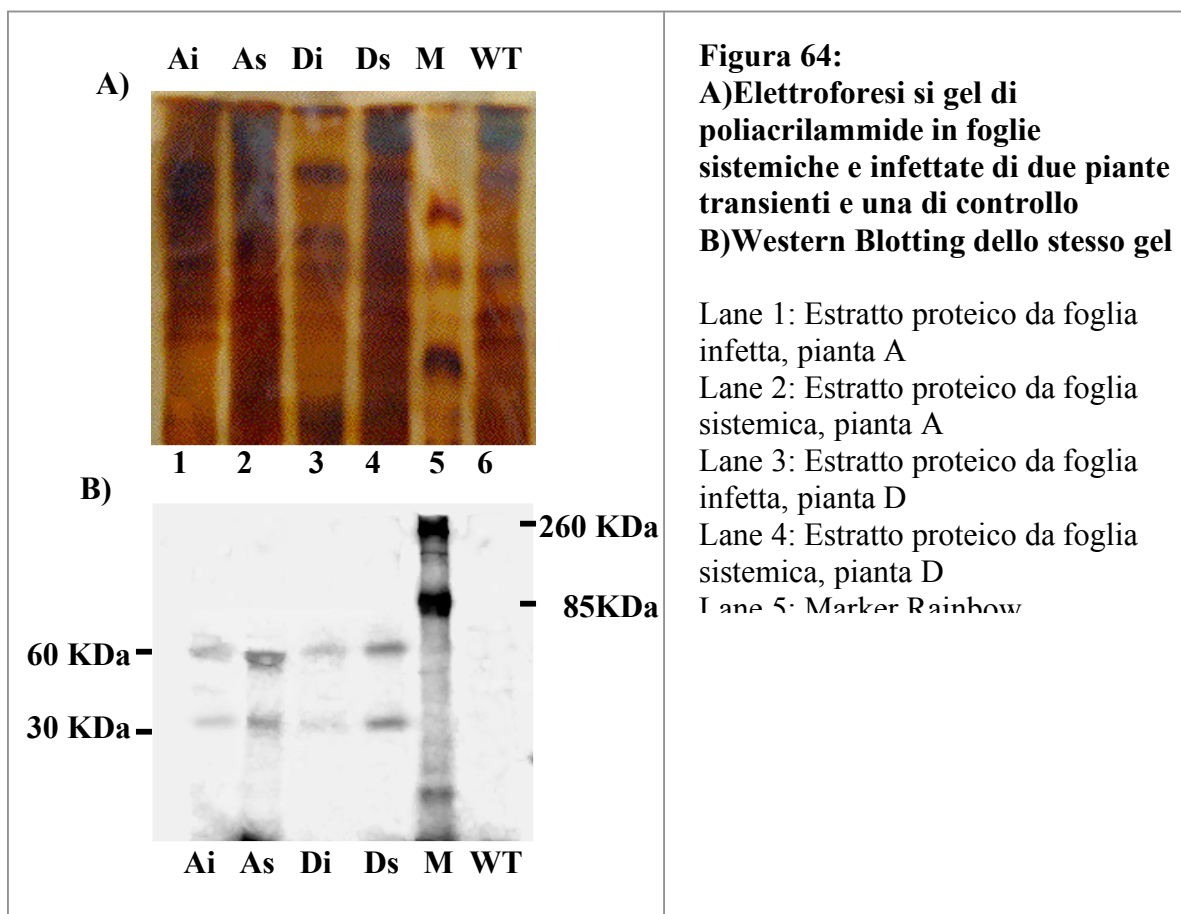
In figura 63 sono mostrate le migrazioni di estratti proteici di diverso tipo di una pianta trasformata, la pianta A e di una wild-type.



Dalla figura è molto evidente che gli estratti proteici da cutoff 50 sono molto poco concentrati rispetto a quelli da cutoff 100. Tenendo conto di questo e soprattutto del fatto che i frammenti anticorpali possono formare oligomeri, cioè il scFv può formare dimeri o trimeri ad un peso di 60 o 90 KDa, abbiamo deciso quindi di utilizzare esclusivamente estratti da cutoff 100. Inoltre tenendo conto delle tre quantità fisse di BSA caricate e della loro rispettiva visibilità da gel, è stato deciso di caricare 450 µg di estratto proteico totale. Tenendo conto di tutte le precedenti osservazioni, ci si aspettava di ottenere la proteina eterologa ad una concentrazione compresa tra 0.5µg e 4.5µg perfettamente visibile su gel e rilevabile dalla tecnica del blotting.

Per verificare il profilo di espressione proteica delle piante trasformate è stata condotta un'estrazione proteica da foglie sistemiche e foglie infettate delle piante A, C, D ed F. Gli estratti sono stati analizzati mediante Western Blotting .

Nella figura 64 sono riportati i risultati dell'esperimento effettuato sugli estratti proteici della pianta A e della pianta D.



Come mostrato nelle figure 64 A e 64 B, in tutti gli estratti proteici di foglie sistemiche e infettate, sono presenti bande evidenti all'altezza di 30 kDa, il peso atteso per l'anticorpo a singola catena. Si notano bande più intense negli estratti proteici di foglie sistemiche, Figura 13 B, lane 2; lane 4).

Negli estratti proteici della pianta di controllo non sono presenti bande, mentre invece l'evidenziamento del marcatore di peso molecolare è dovuto da una reazione aspecifica come già osservato e discusso nei paragrafi precedenti. Nelle corsie 1, 2, 3 e 4, è evidente la presenza di bande doppie, una di circa 30 kDa e una di circa 60 kDa. Quest'ultima, come già descritto, potrebbe rappresentare l'associazione spontanea di due frammenti di scFv in un dimero, come avviene negli anticorpi completi.

DISCUSSIONE

La tecnica degli ibridomi per la produzione di anticorpi monoclonali risale al 1975 (Kohler and Milstein, 1975). Da quella data in poi queste proteine sono state e continuano ad essere oggetto di numerosi studi, volti allo sviluppo di sistemi diagnostici e terapeutici *in vivo* ed *ex vivo* sempre più innovativi. La tecnologia del display fagico (Smith, 1985) che ha permesso la costruzione di anticorpi monoclonali perfezionati, come quelli “umanizzati”, la costruzione di anticorpi “chimerici” e soprattutto i frammenti anticorpali come i scFv, sono alcuni dei risultati derivati dall’interesse nei confronti di queste proteine. Particolare importanza hanno i frammenti anticorpali scFv queste proteine risultano meno immunogeniche e possiedono dimensioni ridotte rispetto all’anticorpo parentale, quest’ultima caratteristica permette loro sia di penetrare nelle masse tumorali solide, sia di veicolare farmaci come tossine o radioisotopi direttamente nelle cellule bersaglio.

L’obiettivo dell’attività di ricerca qui illustrata era la produzione in pianta di due nuovi frammenti anticorpali ingegnerizzati, il scFv800E6 (anti-HER2, anticorpo specifico per l’antigene tumorale umano HER2 correlato al tumore del seno e dell’ovario) e il scFvADDLs (anti-oligomeri b 1-42 coinvolti nel morbo d’Alzheimer). I geni codificanti le proteine di interesse sono stati clonati in differenti plasmidi in relazione alla strategia di produzione scelta.

L’anticorpo a singola catena scFv800E6 è una molecola particolarmente stabile considerato che è stata espressa con successo in *E.coli* sia in ambiente ossidante (periplasma), ottimale per la formazione dei ponti disolfuro stabilizzanti la molecola, sia in ambiente riducente (citoplasma) (Lombardi et al., 2005). Lo stesso frammento è stato espresso anche in piante di tabacco mediante sistemi di espressione stabile (basati su *Agrobacterium* ed il vettore pBG) e transiente (con il vettore pP2C2S, derivato dal virus X della patata) (Galeffi et al., 2005). L’attività funzionale della proteina prodotta dai vari sistemi di espressione, è stata verificata con metodi biochimici e immunodiagnostici (Galeffi et al., 2006). Recentemente è stato anche pubblicato un lavoro di dinamica molecolare (Arcangeli et al., 2008) fatto per valutare la stabilità di scFv800E6 fuso con una tossina batterica. In questo lavoro, per la prima volta, è stata verificata la capacità dell’anticorpo ad essere secreto negli essudati radicali di piante di tabacco ingegnerizzate.

Il gene anticorpale è stato clonato nel plasmide pBin19::LeExt1.1-SP/PHY/OCS utilizzato con successo per l’espressione in radice dal Dott. Bucher, Federal Institute of Technology, Zurich (Bucher et al., 1997) Il primo componente di questo grande inserto è un promotore delle cellule dei peli radicali di pomodoro LeExt1.1. La sequenza polipeptidica codificata da questo gene corrisponde ad una proteina simile ad un’estensina. Le estensine sono proteine implicate in vari processi, tra cui la formazione della parete cellulare vegetale. In questo caso l’espressione del gene LeExt1 era associata alla formazione delle cellule dei peli radicali ed era controllata dall’etilene. Il gene reporter GUS, fuso al promotore della proteina LeExt1.1 è stato espresso con successo sia in pomodoro che in patata, e si è visto che la sua espressione tessuto specifica è relativa ai tricoblasti radicali, anche se un discreto accumulo era presente anche nel polline (Bucher et al., 2002).

Questo costrutto era stato già utilizzato in un lavoro sperimentale che dimostrava come le piante con esso trasformate, esprimendo una maggiore quantità di fitasi (PHY) nella rizosfera rispondessero positivamente allo stress da deprivazione di fosfato. (Zimmermann et al., 2003).

La presenza della proteina, termotollerante, negli essudati radicali era stata determinata misurando l'attività fosfomonoesterasica di radici di piante transgeniche in cui tutte le altre fosfatasi erano state inattivate al calore. Il risultato di questo saggio mostrava un'attività tre volte maggiore negli essudati radicali di piante transgeniche rispetto a quella delle piante controllo.

Nel presente lavoro sperimentale la cassetta LeExt1.1-SP/PHY/OCS è stata modificata e il gene della fitasi è stato sostituito con il gene dell'anticorpo a singola catena scFv800E6, per verificare se tale proteina venisse correttamente espressa, indirizzata nello spazio apoplastico e infine secreta in un terreno di crescita liquido (coltura idroponica). Le piante transgeniche trasferite in idroponica hanno dimostrato da subito un eccellente adattamento e una velocità di crescita maggiore rispetto alle piante cresciute in terreno solido, probabilmente a causa della maggiore facilità nell'assorbimento delle sostanze nutritive e degli ioni presenti da una soluzione liquida, rispetto ad una semisolida, quale può essere il terreno MS (Murashige et Skoog, 1962) e agar.

Considerata la difficoltà tecnica collegata all'introduzione di un sistema di aereazione in ambiente sterile si è scelto di ovviare a questa richiesta; questa decisione è stata anche supportata da lavori precedenti in cui si dimostrava come questo accorgimento non fosse comunque necessario in colture idroponiche di *Arabidopsis thaliana* mantenute in piccoli volumi (Arteca and Arteca, 2000; Tocquin et al., 2003; Schlesier et al., 2003).

Le piante cresciute in queste condizioni sono state in seguito analizzate con varie tecniche per dimostrare la presenza del transgene (tramite PCR) e della proteina codificata (SDS-PAGE, Western Blotting, Immunoprinting).

La PCR condotta sul DNA estratto dal tessuto fogliare di ogni pianta putativa transgenica con primers specifici per l'amplificazione del dominio VL del scFv800E6 ha confermato la corretta inserzione del DNA esogeno nel genoma di tutte le piante analizzate (efficienza del 100%). Anche la RT-PCR effettuata su RNA estratto da 0,75 g di materiale proveniente da radice e da 1,5 g proveniente da foglia (peso secco) ha dato esito positivo.

L'analisi proteica degli essudati radicali è stata fatta su un campione prelevato dal mezzo di crescita a tre settimane dal trasferimento in coltura idroponica.

Questa scelta è stata dettata dalla necessità di permettere la rigenerazione e la crescita della radice fino ad una lunghezza di circa 4 cm, e dai risultati di un lavoro precedente (Drake et al., 2003) che dimostravano come la quantità di un anticorpo secreto raggiungesse il massimo dell'accumulo nel mezzo di crescita tra il settimo e il decimo giorno di crescita in idroponica. L'analisi di Western Blotting eseguita su gli estratti proteici provenienti dalle radici e dalle foglie delle piante trasformate ha evidenziato una banda di peso molecolare di circa 30 kDa confermando così la presenza dell'anticorpo. Entrambi gli esperimenti, Western Blotting e immunoprinting, mostrando un maggiore livello di espressione in radice, confermano il corretto funzionamento del promotore LeExt1.1.

Purtroppo non è stata rilevata la presenza della proteina nel mezzo di crescita. A questo proposito tre ipotesi sono state fatte: (1) una concentrazione proteica troppo bassa, non rilevabile con la tecnica del Western Blotting; (2) un errore nella scelta della pianta ospite; (3) un'inefficienza del sistema secretorio cellulare della pianta.

Nel primo caso, per incrementare la concentrazione del scFv negli essudati radicali si è pensato di coltivare le piante prima in un sistema aeroponico, per aumentare l'apparato radicale e quindi la superficie di secrezione e successivamente di trasferire le stesse in un sistema di crescita idroponico. La coltura aeroponica è stata allestita secondo la procedura di Zobel *et al.*, 1976 ed è stata effettuata in collaborazione con il laboratorio del prof. Bucher presso l'Istituto di Botanica dell'Università di Colonia. Dopo circa tre settimane di crescita in aeroponica le piante sono state trasferite in idroponica, l'analisi proteica del mezzo di crescita è stata effettuata come descritto precedentemente. Anche in questo caso non è stata rilevata la presenza di proteine corrispondenti ad un peso molecolare di circa 30 kDa.

Per quanto riguarda la seconda ipotesi, in letteratura sono riportati numerosi lavori, che mettono in evidenza l'importanza della specie di pianta scelta per l'espressione, proteine secrete da alcune specie non sono secrete da altre semplicemente per un diverso sistema di secrezione (Saxena et al., 2004). Alla luce di questo è stato deciso di trasformare con *Agrobacterium tumefaciens* contenente il vettore pBin19::LeExt1.1-SP/scFv800E6/OCS dischi fogliari di *Solanum Tuberosae*. Le piante trasformate sono state analizzate con la stessa procedura utilizzata in precedenza. Purtroppo anche in questo caso non è stata rilevata la proteina nel mezzo di crescita. Tuttavia è stato molto interessante il risultato dell'immunoprinting effettuato sulla foglia e sulla radice di patata, in questa specie vegetale il segnale ottenuto in foglia è molto più intenso rispetto a quello presente in radice.

Questo risultato è esattamente opposto a quello ottenuto nel precedente esperimento eseguito con piante di tabacco, in cui il maggior accumulo della proteina è stato riscontrato nell'apparato radicale. Tutto ciò conferma i risultati riportati in letteratura che i vettori di trasformazione si adattano in maniera diversa al patrimonio genetico della pianta che li ospita.

Per quanto riguarda il terzo ed ultimo punto, un'altra ipotesi è che il sistema secretorio delle cellule nel tessuto radicale, pur riconoscendo un segnale peptidico specifico, non sia così efficiente da poter secernere tutta la mole di proteina over-espressa, sintetizzata ed accumulata, in quanto sistema fisiologicamente organizzato per secernere una bassa quantità di proteine.

La secrezione di proteine attraverso la parete cellulare prevede il coinvolgimento di numerosi complessi proteici di trasporto, con meccanismi ancora poco conosciuti (Rose and Lee.,2010)

Data l'enorme complessità del processo di secrezione attraverso la parete cellulare e la grande quantità di proteine coinvolte (Lee et al., 2004; Jamet et al., 2006, 2008), la mancata rivelazione della proteina negli essudati, potrebbe dipendere da tanti fattori. A questo scopo, andrebbero verificate diverse ipotesi: l'utilizzo di un altro peptide segnale; un'indagine del sistema esocitotico (forse non adatto alla secrezione del scFv); l'accumulo in radice, l'adesione del scFv sulla superficie esterna dei peli radicali ma non rilasciato nel mezzo.

Per rispondere ad alcune di queste domande, è stato deciso di inserire nel vettore d'espressione, un gene reporter, la Enhanced Green Fluorescence

Protein (EGFP), a valle della sequenza del scFv800E6 e sotto il controllo dello stesso promotore specifico per l'indirizzamento in radice (LeExt 1.1) allo scopo di seguirne il destino e la localizzazione cellulare post-traduzionale.

La fusione del scFv800E6, con la EGFP era già stata utilizzata con successo, nei laboratori dell'ENEA per l'espressione in batterio. I risultati ottenuti mostravano un scFv funzionale nonostante il legame con la EGFP, e attestavano il fatto che la proteina fluorescente non interferisce in nessun modo con il corretto folding del frammento anticorpale. Il gene reporter fuso con scFv800E6, dovrebbe fornire informazioni sulla localizzazione del frammento anticorpale nella radice.

Il nuovo vettore d'espressione, pBIN19::LeExt1.1-SP/scFv800E6-EGFP/OCS, è stato utilizzato per trasformare cellule di *Agrobacterium* GV3101, che in seguito sono state utilizzate per la trasformazione dei dischi fogliari, i germogli ottenuti sono stati quindi posti in un terreno di radicazione, contenente l'antibiotico di selezione Kanamicina. L'apparato radicale una volta raggiunto un adeguato accrescimento sarà analizzato, grazie alla presenza della proteina fluorescente, con varie tecniche di microscopia e di fluorescenza, per verificare la presenza, la localizzazione e la eventuale secrezione avvenuta dell'anticorpo.

Al momento possiamo concludere che il costrutto che ha permesso la rizosecrezione dell'enzima fitasi (PHY) (Zimmermann et al., 2003), non ha portato allo stesso risultato per quanto riguarda il scFv. Questo potrebbe dipendere dal fatto che il scFv è una proteina estranea al sistema vegetale. Infatti, nel caso della fitasi, la trasformazione con il costrutto ha enormemente aumentato la secrezione di una proteina che già fisiologicamente viene secreta dalla pianta. Un'altra ipotesi è riportata da un lavoro in cui si riportano bassi livelli di secrezione di una immunoglobulina secretoria (SIgA) in protoplasti di tabacco (Frigerio et al., 2000). L'efficienza della secrezione è un processo controllato a livello del reticolo endoplasmatico, in cui avviene sia il ripiegamento delle proteine neoformate, che l'indirizzamento alla secrezione di quelle con la corretta struttura molecolare. Allo stesso modo le proteine riconosciute come difettose sono indirizzate verso la degradazione (Vitale and Denecke, 1999). Questo è proprio quanto accadeva nel caso dell'anticorpo secretorio SIgA, che si accumulava nel vacuolo dei protoplasti e veniva lentamente degradato. Questa ipotesi però sarebbe in contrasto con quanto pubblicato in precedenza, in quanto il scFv800E6 si è dimostrato un anticorpo stabile a tutti gli effetti come riportato negli articoli Galeffi et al. 2006, Arcangeli et al. 2008.

Nel caso in cui la proteina, pur se non secreta, risulti funzionale ed i suoi livelli di espressione in radice siano alti, come suggeriscono i nostri dati sperimentali, essa potrebbe essere comunque ottenuta mediante le tecniche classiche di estrazione di proteine eterologhe accumulate nell'apoplasto, cioè attraverso la distruzione meccanica o la digestione enzimatica della parete cellulare (Fischer et al., 1999).

Diversamente dal scFv800E6, ampiamente studiato nei laboratori dell'ENEA, l'altro frammento anticorpale scFv-ADDLs, anche esso oggetto di questa attività sperimentale, è stato sintetizzato nei laboratori del prof. Cattaneo con il metodo della IACT. La IACT ("Intracellular Antibody

Capture Technology”), si basa sul sistema del doppio ibrido per l'isolamento di scFvs di interesse. In questa tecnica, l'interazione intra-cellulare tra due proteine ibride, un antigene fuso ad un dominio di legame al DNA (LexA o Gal4) ed un anticorpo (scFv) fuso ad un dominio di attivazione trascrizionale (B42), ricostituisce un complesso trascrizionale in grado di attivare l'espressione di specifici geni marcatori.

Tale tecnica è stata utilizzata per selezionare ed ottenere il scFv candidato al riconoscimento del peptide β 1-42 relativo alle placche β -amiloidi presenti nei malati di Alzheimer (Meli et al., 2009).

Il scFv-ADDLs è stato analizzato con il microscopio confocale su una biopsia di cervello umano malato di Alzheimer ed è stata appurata la sua localizzazione all'interno di cellule neuronali malate, dimostrando la sua capacità di riconoscere gli oligomeri β . Il scFv-ADDLs in questione, così come altri 18 isolati nello stesso lavoro, sembrano essere dei buoni candidati per lo sviluppo di nuove molecole da utilizzare in nuovi approcci sperimentali per lo studio e l'elaborazione dell'immagine e del traffico intracellulare degli oligomeri β . Attualmente, uno dei problemi maggiori, relativi all'utilizzo dei scFv nella malattia degenerativa AD, è collegato alle grandi quantità ed alte concentrazioni di proteina richieste per la somministrazione, necessarie affinché questi ScFv possano raggiungere le placche in tutte le numerosissime cellule neuronali, riaprendo la problematica della produzione su larga scala.

Il scFv-ADDLs in questione, è stato espresso con successo in batterio, ma ad una concentrazione piuttosto scarsa il che comporta enormi costi di produzione e grandi limitazioni tecniche. Lo studio attuale sulla possibilità di produrre il scFvADDLs in pianta e gli studi futuri sulla sua rizosecrezione hanno gettato le basi per superare questo ostacolo. Lo scopo è di aumentare le rese e di abbassare i costi di produzione di un frammento anticorpale che si propone come ottimo candidato per la diagnosi e la terapia di una terribile malattia degenerativa a tutt'oggi priva di cura certa.

Nel presente lavoro sperimentale, per la prima volta un scFv specifico per la malattia di Alzheimer è stato espresso in pianta. Il scFv-ADDLs mostra un enorme potenziale per lo studio, la diagnosi e la cura della malattia (Meli et al., 2009), considerando gli enormi sforzi nel campo della ricerca riguardante il morbo d'Alzheimer, piante in grado di esprimere tale scFv potrebbero rappresentare un'ottima alternativa per la produzione di molecole farmaco.

Bibliografia

- Alzheimer A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Z Psychiatrie Psychisch-Gerichtliche Med.* 64, 146–148
- Alzheimer A., Stelzmann R. A., Schnitzlein H. N. and Murtagh F. R. (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, 'Über eine eigenartige Erkrankung (*sic*) der Hirnrinde'. *Clin. Anat.* 8, 429–431
- ..
- Vlassenko AG, Vaishnavi SN, Couture L, Sacco D, Shannon BJ, Mach RH, Morris JC, Raichle ME, Mintun MA. (2010). Spatial correlation between brain aerobic glycolysis and amyloid- β (A β) deposition. *PNAS* 12;107(41):17763-7
- Arazi T., Slutsky S.G., Shibolet Y.M., Wang Y., Rubinstein M., Barak S., Yang J. and Gal-On A. (2001) Engineering zucchini yellow mosaic potyvirus as a non-pathogenic vector for expression of heterologous proteins in cucurbits. *J. Biotech*, 87: 67-82
- Arcangeli C., Cantale C., Galeffi P. and Rosato V. Structure and dynamics of the anti-AMCV scFv(F8): Effects of selected mutations on the antigen combining site (2008). *Journal of Structural Biology*, 64: 119-133
- Arlen PA, Falconer R, Cherukumilli S, Cole A, Cole AM, Oishi KK, Daniell H (2007) Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-2b. *Plant Biotechnol J* 5: 511–525
- Aroian, R. V., Koga, M., Mendel, J. E., Ohshima, Y. & Sternberg, P. W. 1990 The let-23 gene necessary for *Caenorhabditis elegans* vulval induction encodes a tyrosine kinase of the EGF receptor family. *Nature* 348, 693-699.
- Arteca RN and Arteca JM. A novel method for growing *Arabidopsis thaliana* plants hydroponically. *Physiol. Plant.* 108: 188-193. (2000).
- Artsaenko, O., Peisker, M., zur Nieden, U., Fiedler, U., Weiler, E.W., Muntz, K., Conrad, U., 1995. Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilt phenotype in transgenic tobacco. *The plant Journal* 8(5): 745-750.
- Artsaenko O., Kettig B., Fiedler U., Conrad U. and Düring K. (1998) Potato tubers as a biofactory for recombinant antibodies. *Molecular Breeding*, 4: 313–319
- Athan, E.S., Lee, J.H., Arriaga, A., Mayeux, R.P., and Tycko, B. (2002). Polymorphisms in the promoter of the human APP gene: functional evaluation and allele frequencies in Alzheimer disease. advent of more sophisticated statistical methods for *Arch. Neurol.* 59, 1793–1799.
- Banks, W.A., Terrell, B., Farr, S.A., Robinson, S.M., Nonaka, N. and Morley, J.E. (2002) *Peptides*, 23, 2223 – 2226.
- Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* 1986;45:649-57.
- Barry, M.M. and Lee, J.S. (1993) *Molecular Immunol.* 30, 833–840
- Barta A. Et al. The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol. Biol.* 6: 347-357. (1986).
- Basaran P, Rodríguez-Cerezo E (2008). *Plant Molecular Farming: Opportunities and Challenges. Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 153-172.

- Baselga J. Monoclonal antibodies directed at growth factor receptors. *Ann Oncol.* 2000;11 Suppl 3:187-90
- Baselga J. Clinical trials of single-agent trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol.* 2000 ;27(5 Suppl 9):20-6
- Beecham G.W., Martin E.R., Li Y.J., Slifer M.A., Gilbert J.R., Haines J.L., Pericak-Vance M.A. (2009) Genome-wide association study implicates a chromosome 12 risk locus for late-onset Alzheimer disease. *Am. J. Hum. Genet.* 84:35-43.
- Benfey PN, Ren L, Chua N-H (1989) The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J* 8: 2195–2202
- Benvenuto E., Cattaneo A., Ordàs R.J., Biocca S., Tavazza R., Ancora G. and Galeffi P. 'Phytoantibodies for the expression of immunoglobulin domains in transgenic plants' *Plant Mol Biol* 13: 685-692 (1991). Bertram L. et al. 2007
- Bevan M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* 12: 8711–8721. (1984)
- Bianchetti, A., Trabucchi, M. (2010). *Alzheimer. Il Mulino*, Bologna.
- Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, Thezenas S, Ychou M, Blanchard F, Lamy A, Penault-Llorca F, Frebourg T, Michel P, Sabourin JC, Boissiere-Michot F (2009). Impact of Fc γ RIIa–Fc γ RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol* 27(7): 1122–1129
- Biocca, S., Neuberger, M.S., Cattaneo, A. 1990. Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *EMBO J*;9:101-8
- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., Whitlow, M. 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science*;242:423-26
- Blume-Jensen, P.; Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411, 355-65.
- Boothe, J.G., Saponja, J.A. and ParMenter, D.L. (1997). Molecular farming in plants: oilseeds as vehicles for the prod*Research* 42, 172-81.
- Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Logendra S., Petersen F., Gleba Y. and Raskin I. (1999) Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nature Biotech.*, 17(5): 466-469
- Bouliane, G. L. et al. (1984) *Nature* 312, 643-646.
- Bucher, M., Schroeder, B., Willmitzer, L., and Riesmeier, J.W. (1997). Two genes encoding extension-like proteins are predominantly expressed in tomato root hair cells. *Plant Mol. Biol.* 35, 497–508.
- Bucher M, Brunner S, Zimmermann P, Zardi GI, Amrhein N, Willmitzer L, Riesmeier JW. The expression of an extensin-like protein correlates with cellular tip growth in tomato. *Plant Physiol.* 2002 Mar;128(3):911-23. Erratum in: *Plant Physiol* 2002 Jul;129(3):1417.
- Burden S, Yarden Y. Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron.* 1997 Jun;18(6):847-55. Review.
- Carpita N, Sabulose D, Montezinos D, Delmer DP. 1979. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science* 205, 1144–1447

- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 May 15;89(10):4285-9.
- Cattaneo A, Capsoni S, Paoletti F. Towards noninvasive Nerve Growth Factor therapies for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2008;15:255–283.
- Chapman S., Kavanagh T. and Baulcombe D. (1992) Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J.*, 2(4): 549-557
- Chen XM, Tanaka T, Kobayashi Y, Shigematsu H, Okumura K. Experimental glomerulonephritis induced by immune complexes of monoclonal antibodies produced by immunoglobulin class-switch variants. *Lab Invest*. 1987 Dec;57(6):665-72.
- Choi I-R, Stenger D.C., Morris T.J. and French R. (2000) A plant virus vector for systemic expression of foreign genes in cereals. *Plant J.*, 23: 547-555
- Christou, P. (1993) Particle gun-mediated transformation. *Curr Opin Biotech*, 4, 135-141.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):443-6.
- Commandeur, U., Twyman, R.M., and Fischer, R., 2003. The biosafety of molecular farming in plants. *AgBiotechNet*, 5 ABN 110, 1-9.
- Conrad U. and Fielder U. Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol. Biol*. 38: 101-109. (1998).
- Cummings J.L., Vinters H.V., Cole G.M. (1998) .Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology*; 51(1 Suppl 1): S2–17; discussion S65–7
- D'Aoust, M.-A., Couture, M.M.-J., Charland, N., Trépanier, S., Landry, N., Ors, F. and Vézina, L.-P. (2010) The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol. J*. 8, 607–609.
- Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Carton G, Colonbat P, Bardos P, Watier H, Thibaut G. (2004). Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: Influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res.*;64:4664-4669.
- Daniell H. (1993). Foreign gene expression in chloroplasts of higher plants mediated by tungsten particle bombardment. *Methods Enzymol.*;217:536-56
- Daniell H., Khan M.S. and Allison I. (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.*, 7: 84-91
- De Muynck, B., Navarre, C. and Boutry, M. (2010) Production of antibodies in plants: status after twenty years. *Plant Biotechnol. J*. 8, 529–563. De Strooper et al. 1998;
- De Strooper B (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron.*;38:9–12.
- Decker, E.L., Gorr, G., and Reski, R.(2003). Moss – an innovative tool for protein production. *BIOforum Europe 02*, 96-97.
- Depicker A, Montagu MV. (1997). Post-transcriptional gene silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol*. 9:373-82.
- Desjarlais JR, Lazar GA, Zhukovsky EA, Chu SY (2007) Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. *Drug Discov Today* 12: 898–910

Desplancq D, King DJ, Lawson AD, Mountain A. Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72.3. *Protein Eng.* 1994 Aug;7(8):1027-33

Di Fiore, P. P.; Pierce, J. H.; Kraus, M. H.; Segatto, O.; King, C. R.; Aaronson, S. A. : erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 237: 178-182, 1987.

Dodel RC, Du Y, Depboylu C, Hampel H, Frölich L, Haag A, Hemmeter U, Paulsen S, Teipel SJ, Brettschneider S, Spottke A, Nölker C, Möller HJ, Wei X, Farlow M, Sommer N, Oertel WH (2004). Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;751472-4

Dodel, R.C., H. Hampel, and Y. Du. 2003. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2:215–220.

Doran P. (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr. Opinion in Biotech.*, 11: 199-204

Dove A., 2002. Uncorking the biomanufacturing bottleneck. *Nature Biotechnology* 20: 777-779;

Drake P.M., Chargelegue D.M., Vine N.D., van Dolleweerd C.J., Obregon P. and Ma J.K. (2003) Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots. *Plant Mol. Biol.*, 52(1): 233-241.

Dunwell, J.M., Ford, C.S. (2005). Technologies for Biological Containment of GM and Non-GM Crops. DEFRA Contract CPEC 47. Final Report. Reading.

Emre, M., Eker, E., Ozturk, M., Engin, F., and Yilmazer, S. (2007). Association between vitamin D receptor gene polymorphism and Alzheimer's disease. *Tohoku J. Exp. Med.* 212, 275–282.

Esler, W.P. (2000). Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1. *Nat. Cell Biol.* 2:428–434.

Essen-Moller, E. (1946). A family with Alzheimer's disease. *Acta. Psychiatr. Neurol. Scand* 21, 233–244

Fecker L.F., Koenig R. and Obermeier C. (1997) *Nicotiana benthamiana* plants expressing beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) coat protein-specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in the late stages of infection. *Arch. Virol.*, 142: 1857-63.

Fiedler U., Phillips J., Artsaenko O. and Conrad U. (1997) Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotech.*, 3: 205-216.

Finnegan J. and McElroy D. (1994) Transgene inactivation: plants fight back. *Bio/Technology* 12: 883-888.

Fischer R., Vaquero-Martin C., Sack M., Drossard J., Emans N. and Commandeur U. (1999) Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotech. Appl. Biochem.*, 30: 113-116

Fischer R., Liao Yu-Cai and Drossard J. (1999) Affinity-purification of a TMV-specific recombinant full-size antibody from a transgenic tobacco suspension culture. *J. Immunol. Meth.*, 226: 1–10

Fitzgerald, D.A., 2003. Reviving up the Green Express. Companies explore the use of transgenic plants for economical, large-scale protein expression. *The Scientist* 17 (14), 14 July 2003. www.the-scientist.com/yr2003/jul/lcprofile1_030714.html - viewed 16 August 2007.

- Frenkel DI, Dewachter I, Van Leuven F, Solomon B (2003) Reduction of beta-amyloid plaques in brain of transgenic mouse model of Alzheimer's disease by EFRH-phage immunization. *Vaccine* 21: 1060-1065.
- Frigerio L., Vine N.D., Pedrazzini E., Hein M.B., Wang F., Ma J. K-C. and Vitale A. (2000) Assembly, secretion, and vacuolar delivery of a hybrid immunoglobulin in plants. *Plant Physiol.*, 123: 1483-1493
- Fukuchi, K, Tahara, K, Kim, HD, Maxwell, JA, Lewis, TL, Accavitti-Loper, MA, Kim, H, Ponnazhagan, S and Lalonde, R, (2006) Anti-A beta single-chain antibody delivery via adenoassociated virus for treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 23(3), 502-511
- Galeffi P. (2009): Plant factory of biopharmaceuticals. Available at www.enea.it, TB01/01/2009 (accessed July 20, 2010)
- Galeffi P, Lombardi A, Pietraforte I, Novelli F, Donato MD, Sperandei M, Tornambe A, Fraioli R, Martayan A, Natali PG et al. (2006) Functional expression of a single-chain antibody to ErbB-2 in plants and cell-free systems. *J Transl Med* 4, 39–52.
- Galeffi P., Lombardi A., Di Donato M., Latini A., Sperandei M., Cantale C. and Giacobini P. (2005) - Expression of single chain antibodies in transgenic plants. *Vaccines* 23: 1823-1827
- Galeffi P., Giunta G., Guida S. and Cantale C. (2002) Engineering of a single chain variable fragment antibody specific for Citrus tristeza virus and its expression in *E.coli* and *N. tabacum*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 108: 479-483
- Galmozzi E, Casalini P, Iorio MV, Casati B, Olgiati C, Menard S. (2004) HER2 signaling enhances 5'UTR-mediated translation of c-Myc mRNA. *J Cell Physiol*, 82-8.
- Gasdaska, J.R., Spencer, D., Dickey, L. (2003). Advantages of Therapeutic Protein Production in the Aquatic Plant *Lemna*, *BioProcessing Journal*, Mar/Apr, 49-56.
- Gatz, M., Reynolds, C.A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J.A., Berg, S., Fiske, A., and Pedersen, N.L. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch. Gen. Psychiatry* 63, 168–174.
- Gaume A., Komarnytsky S., Borisjuk N. and Raskin I. (2003) Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. *Plant Cell Rep.*, 21(12): 1188-1193
- Gezen-Ak, D., Dursun, E., et al. (2007). Association between vitamin D receptor gene polymorphism and Alzheimer's disease. *Tohoku J. Exp. Med.* 212 (3), 275–282.
- Giddings, G. (2001). Transgenic plants as protein factories. *Current Opinions in Biotechnology*, 12, 450–454.
- Giritch A, Marillonnet S, Engler C, van Eldik G, Botterman J, Klimyuk V, Gleba Y (2006) Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14701–14706
- Gleba D., Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Kneer R., Poulev A., Skarzhinskaya M., Dushenkov S., Logendra S., Gleba Y.Y. and Raskin I. (1999) Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96(11): 5973-5977
- Goldstein, D.A., Thomas, J.A., 2004. Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM* 97 (11): 705-16.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M., and Hynes, N.E.(1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 16:1647-1655

- Guy, P.M. , Platko, J.V. , Cantley, L.C. , Cerione, R.A. and Carraway, K.L. III (1994) Insect cell-expressed p180^{erbB3} possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 8132-8136
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). *Science* 297, 353–356.
- Heifetz, P.B. (2000) Genetic engineering of the chloroplast. *Biochimie*, 82, 655-666.
- Hiatt, A., Cafferkey, R. and Bowdish, K. (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 342, 76–78.
- Hoagland, D. R. and D. I. Arnon. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. *Univ. Calif. Agr. Exp. Sta. Cir.* 347.
- Hohe, A. and Reski, R. (2005) From axenic spore germination to molecular farming. One century of bryophyte in vitro culture. *Plant Cell Reports* 23, 513 – 521.
- Hood E., Woodard S.L. and Horn M.E. (2002) Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants-myths and realities. *Curr. Opin. Biotech.*, 13(6): 630-635
- Hood E., Derrick R.W., Maddock S., Meyer T., Baszczynski C., Bailey M., Flynn P., Register J., Marshall L., Bond D., Kulisek E., Kusnadi A., Evangelista R., Nikolov Z., Wooge C., Mehig R.J., Hernan R., Kappel W.K., Ritland D., Chun Ping Li and Howard J.A. (1997) Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molecular Breeding* 3: 291–306
- Hollinger, P., Prospero, T., Winter, G. 1993. “Diabodies”: small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci USA* Jul 15; 90 (14):6444-8
- Hooykaas, P.J.S., Mozo T. (1994). *Agrobacterium* molecular genetics. *Plant Molecular Biology Manual* **B3**, 1-9.
- Hsieh, K., and A. H. Huang. (2004). Endoplasmic reticulum, oleosins, and oils in seeds and tapetum cells. *Plant Physiol.* 136: 3427–3434.
- Huang C.H., Ayliffe M.A. and Timmis J.N. (2003) Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature Biotech.*, 422(6): 72-76
- Huang J., Sutliff T.D., Wu L., Nandi S., Bengé K., Terashima M., Ralston A.H., Drohan W., Huang N. and Rodriguez R.L. (2001) Expression and purification of functional human alpha-1-antitrypsin from cultured plant cells. *Biotech. Prog.*, 17: 126-133
- Huang, A.H.C. (1996). Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.* 110, 1055-1061.
- Huang, A.H.C. (1992). Oil bodies and oleosins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 177-200.
- Huber R, Deisenhofer J, Colman PM, Matsushima M, Palm W.(1976) Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature*. 2;264(5585):415-20.
- Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. (1989) p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol.*;9:1165-72.
- Huether CM, Lienhart O, Baur A, Stemmer C, Gorr G, Reski R, Decker EL. (2005). Glyco-engineering of moss lacking plant-specific sugar residues. *Plant Biol* 7: 292-299.
- Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Bruccoleri RE, Haber E, Crea R (1988).Protein engineering of antibody binding sites:

recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:5879-83.

Hynes NE, Stern DF.(1994) The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 30;1198:165-84

Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals, evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13, 45–53.

Jamet E, Albenne C, Boudart G, Irshad M, Canut H, Pont-Lezica RF (2008). Recent advances in plant cell wall proteomics. *Proteomics* 8: 893–908

Jamet E, Boudart G, Borderies G, Charmont S, Lafitte C, Rossignol M, Canut H, Pont-Lezica RF (2008b) Isolation of plant cell wall proteins. *Methods Mol Biol* 425: 187–201

Jamet E, Canut H, Boudart G, Pont-Lezica RF (2006) Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci* 11: 33–39

Jennifer S. Wilson, Shyamala Mruthinti, Jerry J. Buccafusco, Rosann F. Schade, Meghan B. Mitchell, Dean U. Harrell, Nidhi K. Gulati, and L. Stephen Miller (2009). Anti-RAGE and Aβ Immunoglobulin Levels Are Related to Dementia Level and Cognitive Performance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64:264-271

Jobling SA, Jarman C, Teh MM, Holmberg N, Blake C, Verhoeven ME. (2003). Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nat Biotechnol*. 21(1):77-80.

Joh, L.D., Wroblewski, T., Ewing, N.N. and Vander Gheynst, J.S. (2005) High-level transient expression of recombinant protein in lettuce. *Biotechnol Bioeng*, **91**, 861-871.

Kaiser, J. (2008) Is the drought over for pharming? *Science*, 320, 473–475.

Kapila J., De Rycke R., van Montague M. and Angenon G. (1997) An agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves *Plant Science*, 122: 101-108

Karg, S.R. and Kallio, P.T. (2009) The production of biopharmaceuticals in plant systems. *Biotechnol. Adv.* 27, 879–894.

Kasono K, Piche A, Xiang J, Kim HG, Bilbao G, Johanning F, Nawrath M, Moelling K, Curiel DT. (1998) Functional knock-out of c-myc by an intracellular anti-c-Myb single-chain antibody. *Biochem Biophys Res Commun*. 9;251:124-30.

Kim D. and Tsai L.H. (2009) Bridging Physiology and Pathology in AD. *Cell* 137, 12,

Kohler, G., Milstein, C. (1975) . Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*;256:495-97

Koprek T., Rangel S., McElroy D., Louwerse J.D., Williams-Carrier R.E. and Lemaux P.G. (2001) Transposon-mediated single-copy gene delivery leads to increased transgene expression stability in barley. *Plant Physiol.*, 125: 1354-62

Kusnadi A.R., Nikolov R.Z. and Howard J.A. (1997) Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical consideration. *Biotech. and Bioeng.*, 56: 473-484

Lee, M.W. and Yang, Y. (2006) Transient expression assay by agroinfiltration of leaves. *Methods Mol Biol*, **323**, 225-229.

Lehmann M. (2000).. From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. *Protein Eng.* 13: 49-57.

- Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E, Waterman H, Sela M, van Zoelen EJ, Yarden Y.(1998) Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J.* 15;17:3385-97.
- Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, Shepard HM.(1993) Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother.* 37:255-63.
- Li, H., et.al. 2006. Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology.* 24, 210 – 215.
- Li H, Sanchez-Torres J, Del Carpio A, Salas V, Villalobo A.(2004) The ErbB2/Neu/HER2 receptor is a new calmodulin-binding protein. *Biochem J.* 1;381:257-66.
- Lichtlen P, Mohajeri MH (2008) Antibody-based approaches in Alzheimer's research: safety, pharmacokinetics, metabolism, and analytical tools. *J Neurochem* 104:859–874
- Liu R, Barkhordarian H, Emadi S, Park CB, Sierks MR. (2005) Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42. *Neurobiol Dis*;20:74-81.
- Lombardi A., Sperandei M., Cantale C., Giacomini P., Galeffi P. Functional expression of a single-chain antibody specific for the HER2 human oncogene in the bacterial reducing environment. Protein expression and purification. Article in press.
- Ma, J.K., Drake, P.M., Barbi T., Sexton A., McGowan G., Stadlmann J., Navarre C., Paul M.J. (2009) Development of rhizosecretion as a production system for recombinant proteins from hydroponic cultivated tobacco. *The FASEB Journal* 09-131771
- Ma, J.K., Drake, P.M., Chargelegue, D., Obregon, P. and Prada, A. (2005) Antibody processing and engineering in plants, and new strategies for vaccine production. *Vaccine*, 23, 1814–1818. Makrides,
- Ma J.K., Drake P.M.W. and Christou P. (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Genetics*, 4: 794-805
- Ma, J.K.C., Hikmat, B.Y., Wycoff, K., Vine, N.D., Chargelegue, D., Yu, L., Hein, M.B. and Lherner, T. (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat. Med.* 4, 601–606.
- Ma J.K., Lehner T., Stabila P., Fux C.I. and Hiatt A. (1994) Assembly of monoclonal antibodies with IgG1 and IgA heavy chain domains in transgenic tobacco plants. *Eur. J. Immunol.*, 24(1): 131-138
- Makrides S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 1996 September; 60(3): 512–538
- Maliga, P., Graham, I., 2004. Plant biotechnology – Molecular farming and metabolic engineering promise a new generation of high-tech crops. *Current Opinion*
- Marasco WA. Intrabodies as antiviral agents. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2001;260:247-70.
- Marathe R., Anandalakshmi R., Smith T.H., Pruss G.J. and Vance V.B. (2000) RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol. Biol.*, 43(2-3): 295-306.
- Mason, H.S., Lam, D.M-K. & Arntzen, C. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11745–11749

- Masuta C., Yamana T., Tacahashi Y., Uyeda I., Sato M., Ueda S. and Matsumura T. (2000) Development of clover yellow vein virus as an efficient, stable gene-expression system for legume species. *Plant J.*, 23: 539-546
- M. P. Mattson, (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430, 631–639
- Matzke AJ, Matzke MA. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr Opin Plant Biol.* 1998 Apr;1(2):142-8.
- McCormick, A.A., Reddy, S., Reinl, S.J., Cameron, T.I., Czerwinski, D.K., Vojdani, F., Hanley, K.M., Garger, S.J., White, E.L., Novak, J., Barrett, J., Holtz, R.B., Tuse, D. and Levy, R. (2008) Plant-produced idiotypic vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 10131–10136.
- McCormick A, Reinl S, Cameron T, Vojdani F, Fronefield M, Levy R, Tuse D (2003). Individualized human scFv vaccines produced in plants: humoral anti-idiotypic responses in vaccinated mice confirm relevance to the tumor Ig. *J Immunol Methods*, 278:95-104.
- McCormick A.A., Kumagai M.H., Hanley K., Turpen T.H., Hakim I., Grill L.K., Tusé D., Levy S. and Levy R. (1999) Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 703-708
- Meins F. Jr.(2000) RNA degradation and models for post-transcriptional gene-silencing. *Plant Mol. Biol.*, 43(2-3): 261-73
- Meli, G., Visintin, M., Cannistraci, I. & Cattaneo, A. Direct in vivo intracellular selection of conformation-sensitive antibody domains targeting Alzheimer's amyloid- β oligomers. *J. Mol. Biol.* 387, 584–606 (2009).
- Meyer P. and Saedler H. (1996) Homology-dependent gene silencing in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 23-48
- Meyers, A., Lynch, A., Tanzer, F., Williamson, A.L., Rybicki EP (2005) Comparisons of human immunodeficiency virus type 1 subtype C Pr55Gag production in plants using different expression techniques. *Plant Expression Systems for Recombinant Pharmacologics PBVA 2005 – 8-10 June 2005, Prague, Czech Republic*, Poster 3.
- Miao Y.1, Ding Y. , Qiao-Yang Sun2, Zeng-Fu Xu, Jiang L. (2008) Plant Bioreactors for Pharmaceuticals. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* - Vol. 25, 363-380
- Milstein, C. 1985. From the structure of antibody to the diversification of the immune response. *EMBO J.*; 4:1083-1092
- Mor T.S., Moon Y.S., Palmer K.E. and Mason H.S.(2003) Geminivirus vectors for high-level expression of foreign proteins in plant cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 81(4): 430-437
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Nov;81(21):6851-5.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium from rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* **15**, 473-497.
- Murphy, D.J. (1990). Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Progress in Lipid Research* **29**, 299-324.
- Murphy, D.J. (1993). Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Progress in Lipid Research* **32**, 247-80.

- Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, Neri TM, Ardizzoni A (2008) Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 26: 1789–1796
- Nejad SM, McLean MD, Hiram T, Almquist KC, Mackenzie CR, Hall JC (2005). Transgenic tobacco plants expressing a dimeric single-chain variable fragment (scFv) antibody against *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B. *Transgenic Res.* 14(5): 785-792.
- Nyyssonen E, Penttilä M, Harkki A, Saloheimo A, Knowles JK, Keranen S. Efficient production of antibody fragments by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology (N Y)*. 1993 May;11(5):591-5.
- O'Keefe B.R. et al. (2009) *Proc. Natl Acad. Sci.*
- Owen, M., Gandecha, A., Cockburn, B., Whitlam, G., 1992. Synthesis of a functional antiphytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco. *Biotechnology* 10: 790-794.
- Ozawa D, Yagi H, Ban T et al . Destruction of amyloid fibrils of a β -microglobulin fragment by laser beam irradiation. *J Biol Chem* 2009; 284: 1009–17.
- Paganetti, P., Calanca, V., Galli, C., Stefani, M., and Molinari, M. (2005). {Beta}-site specific intrabodies to decrease and prevent generation of AlzheimerTs A{beta} peptide. *J. Cell Biol.* 168: 863 – 868.
- Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, Beryt M, Pietras RJ, Slamon DJ. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*. 1997 Jul 31;15(5):537-47.
- Petrucelli, S., Otegui, M.S., Lareu, F., Dinh, O.T., Fitchette, A.C., Circosta, A., Rumbo, M., Bardor, M., Carcamo, R., Gomord, V. and Beachy, R.N. (2006) A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds. *Plant Biotechnol. J.*, 4, 511–527.
- Pfeifer, M. et al. Cerebral hemorrhage after passive anti-A β immunotherapy. *Science* 298, 1379 (2002).
- Porter R.R. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain.
- Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ (1990) Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 5:953-962
- Price, D.L., Tanzi, R.E., Borchelt, D.R., and Sisodia, S.S. (1998). *Annu. Rev. Genet.* 32, 461–493.
- Proba, K., Worn, A., Honegger, A., Plückthun, A. 1998. Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. *J Mol Biol* Jan;275(2):245-53
- Przybelski, R.J., Binkley, N.C., 2007. Is vitamin D important for preserving cognition? A positive correlation of serum 25-hydroxyvitamin D concentration with cognitive function. *Arch. Biochem. Biophys. Highlight. Issue: Vitamin D* 460 (2), 202–205.
- Putlitz J, Kubasek WL, Duchene M, Marget M, von Specht BU, Domdey H. Antibody production in baculovirus-infected insect cells. *Biotechnology (N Y)*. 1990 Jul;8(7):651-4.
- Redlich, F. (1898). Über miliare Sklerose der Hirnrinde bei seniler Atrophie. *Jarbucher fur Psychiatrie und Neurologie*, 17.

- Reiter, Y., Brinkmann, U., Jung, S.H., Lee, B., Kasprzyk, P.G., Richter King, C., Pastan, I. 1994. Improved binding and antitumor activity of a recombinant anti-erbB2 immunotoxin by disulfide stabilization of the Fv fragment. *J Biol Chem* ; 269 (28): 18327-31
- Richardson JH, Marasco WA. Intracellular antibodies: development and therapeutic potential. *Trends Biotechnol.* 1995 Aug;13(8):306-10.
- Ridder R, Schmitz R, Legay F, Gram H. Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)*. 1995 Mar;13(3):255-60.
- Rose JKC and Lee SJ (2010) Straying off the highway: trafficking of secreted plant proteins and complexity in the plant cell wall proteome. *Plant Physiol* 153: 433–436 Ruberti et al., 1994
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* (Second edition, 1989).
- Sanford J.C. The biolistic process. *Trends Biotech.*, 6: 299-302. (1988).
- Schlesier B. et al. A hydroponic culture system for growing *Arabidopsis thaliana* plantlets under sterile conditions. *Plant Mol. Biol Reporter* 21: 449-456. (2003)
- Sarup JC, Johnson RM, King KL, Fendly BM, Lipari MT, Napier MA, Ullrich A, Shepard HM. Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth. *Growth Regul.* 1991 Jun;1(2):72-82
- Sastry, L., Alting-Mees, M., Huse, W.D., Short, J.M., Sorge, J.A., Hay, B.N., Janda, K.D., Benkovic, S.J., Lerner, R.A. 1989. Cloning of the immunological repertoire in *Escherichia coli* for generation of monoclonal catalytic antibodies: construction of a heavy chain variable region-specific cDNA library. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* Aug;86(15):5728-32
- Sawaki M, Ito Y, Tada K, Mizunuma N, Takahashi S, Horikoshi N, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Imai T, Nakao A, Hatake K. (2004) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in heavily pretreated patients with HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Tumori* ;90:40-3.
- Schaaf A, Tintelnot S, Baur A, Reski R, Gorr G, Decker EL (2005) Use of endogenous signal sequences for transient production and efficient secretion by moss (*Physcomitrella patens*) cells. *BMC Biotechnol* 5:30
- Schillberg, S., Fischer, R., Emans, N., 2003. Molecular farming of antibodies in plants. *Naturwissenschaften* 90: 145-55.
- Schlesier, B., Breton, F. and Mock, H.P. (2003) A hydroponic culture system for growing *Arabidopsis thaliana* plantlets under sterile conditions. *Plant Mol. Biol. Rep.* 21, 449–456.
- Schottky, J. (1932). *Z. ges Neurol. Psychiat.*, 140, 333.
- Segatto O, King CR, Pierce JH, Di Fiore PP, Aaronson SA. (1998) Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene *Mol Cell Biol*;8:5570-4
- Selkoe DJ. (2004) Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol*;6:1054-61.
- Seon, J.H., Szarka, J.S., and Moloney, M.M.(2002) A unique strategy for recovering recombinant proteins from molecular farming: affinity capture on engineered oil bodies. *Journal of Plant Biotechnology*, 4, 95-101.

Solórzano-Vargas, R.S., Vasilevko, V., Acero, G., Ugen, K.E., Martinez, R., Govezensky, T., Vazquez-Ramirez, R., Kubli-Garfias, C., Cribbs, D.H., Manoutcharian, K., Gevorkian, G., 2008. Epitope mapping and neuroprotective properties of a human singlechain FV antibody that bind saninternal epitope of amyloid-beta1-42.MolecularImmunology 45, 881–886.

Spök A, Karner S (2008). Plant Molecular Farming, Opportunities and Challenges. JRC Technical Report EUR 23383 EN. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.

Stegemann S., Hartmann S., Ruf S. and Bock R., (2003) High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(15): 8828-8833

Stoger E., Sack M., Perrin Y., Vaquero C., Torres E., Twyman R.M., Christou P. and Fischer R. (2002) Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Molecular Breeding*, 9: 149-158

Stoger E., Vaquero C., Torres E., Sack M., Nicholson L., Drossard J., Williams S., Keen D., Perrin Y., Christou P. and Fischer R. (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scfv antibodies. *Plant Mol. Biol.*, 42: 583-590

Strittmatter, W. J. et al. (1993)Apolipoprotein E: highavidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 1977–1981.

Sun, M., Qian, KX., Su, N., Chang, HY., Liu, JX., Chen, GF. 2003. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnol Lett* 25: 1087-1092.

Svab, Z. and Maliga, P. (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 913-917.

Tanzi, R., Moir, R., and Wagner, S. (2004). Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron* 43, 605–608.

Tavladoraki P., Benvenuto E., Trinca S., De Martinis D.,Cattaneo A. and Galeffi P. (1993) Transgenic plants expressing a functional "single cain Fv" antibody are specifically protected from virus attack. *Nature*, 366: 469-472

Terrada E., Kerschbaumer R.J., Giunta G., Galeffi P., Himmler G. and Cambra M. (2000) Fully recombinant Elisais using genetically engineered SCFV fusion proteins for detection of Citrus Tristeza Closterovirus (CTV). *Phytopathology*, 90(12): 1337-1344

Thangaraj, H., Van Dolleweerd, C.J., McGowan, E.G. and Ma, J.K. (2009) Dynamics of global disclosure through patent and journal publications for biopharmaceutical products. *Nat. Biotechnol.* 27, 614–618.

Tiwari, S., Verma, P.C., Singh, P.K. and Tuli, R. (2009) Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol. Adv.* 27, 449–467.

Tocquin P. et al. A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 3: 2. 25. (2003)

Tsutsumi Y, Onda M, Nagata S, Lee B, Kreitman RJ, Pastan I. Site-specific chemical modification with polyethylene glycol of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) improves antitumor activity and reduces animal toxicity and immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul 18;97(15):8548-53.

Twyman, RM., Schillberg, S., Fischer, R., 2005. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 10, 185–218.

Twyman, R. M. 2004. Host Plants, Systems and Expression Strategies for Molecular Farming. In Fischer, R. & Schillberg, S. (eds.): Molecular Farming. Plant-made Pharmaceutical and Technical Proteins. Wiley: Weinheim, p 191-216.

van Rooijen GJ, Moloney MM (1995). Structural requirements of oleosin domains for subcellular targeting to the oil body. *Plant Physiol.* Dec;109:1353–1361

Vance VB, Huang AHC (1987) The major protein from lipid bodies of maize. Characterization and structure based on cDNA cloning. *J Biol Chem* 262 11275-11279

Vaquero C., Sack M., Chandler J., Drossard J., Schuster F., Monecke M., Schillberg S. and Fischer R. (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96(20): 11128-11133.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*;28:735-41.

Ve'zina LP, Faye L, Lerouge P, D'Aoust MA, Marquet-Blouin E, Burel C, Lavoie PO, Bardor M, Gomord V (2009) Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnol J* 7: 442–455

Vitale A, Denecke J. (1999) The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway *Plant Cell*;11:615-28.

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

Wasserman, J.D. and Freeman, M. (1998) An autoregulatory cascade of EGF receptor signalling patterns the *Drosophila* egg. *Cell*, 95, 355–364.

Werge TM, Biocca S, Cattaneo A. Intracellular immunization. (1990) Cloning and intracellular expression of a monoclonal antibody to the p21ras protein. *FEBS Lett*;274:193-8.

Whitlow, M., Bell, B.A., Feng, S.L., Filpula, D., Hardman, K.D., Hubert, S.L., Rollence, M.L., Wood, J.F., Schott, M.E., Milenic, D.E. (1993). An improved single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Eng*;6:989-95

Wiseman GA, White CA, Sparks RB, Erwin WD, Podoloff DA, Lamonica D, Bartlett NL, Parker JA, Dunn WL, Spies SM, Belanger R, Witzig TE, Leigh BR. (2001) Biodistribution and dosimetry results from a phase III prospectively randomized controlled trial of Zevalin radioimmunotherapy for low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*;39:181-94.

Witcher, D.R. et al (1998) Commercial production of β -glucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants. *Molecular Breeding* 4: 310-312.

Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature* 398: 513–517

Wright, K.E., Prior, F., Sardana, R., Altosaar, I., Dudani, A.K., Ganz, P.R. and Tackaberry, E.S. (2001) Sorting of glycoprotein B from human cytomegalovirus to protein storage vesicles in seeds of transgenic tobacco. *Transgenic Res*, **10**, 177-181.

Wu, S.S., Platt, K.A., RatnaYake, C. *et al.* (1997). Isolation and characterization of neutral-lipid-containing organelles and globuli-filled plastids from *Brassica napus* tapetum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94,

12711-6.

Wydro, M., Kozubek, E., Lehmann, P. (2006) Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression *Biochim Pol*, 53, 289-298.

Joh, L.D., Wroblewski, T., Ewing, N.N. and Vander Gheynst, J.S. (2005) High-level transient expression of recombinant protein in lettuce. *Biotechnol Bioeng*, 91, 861-871.

Xu, Z.F., Teng, W.L. and ChYe, M.L. (2004). Inhibition of endogenous trypsin- and chymotrypsin-like activities in transgenic lettuce expressing heterogeneous proteinase inhibitor SaPIN2a. *Planta* 218, 623-9.

Yue S.,Li Y.,Wang X.,Bai H.,Xia J.,Jiang L.,Ji Y.,Fan L.,He Z.,Chen Q. (2008) *Life. Sci.*;82:1249-1255.

Yusibov V., Modelska A., Steplewski K., Agadjanyan M., Weiner D., Hooper D.C. and Koprowski H. (1997) Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc. Natl.*

Zhang K, Sun J, Liu N, Wen D, Chang D, Thomason A, Yoshinaga SK. Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. *J Biol Chem*. 1996 Feb 16;271(7):3884-90.

Zimmermann, S., Schillberg, S., Liao, Y.C. & Fischer, R. (1998) Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabacum*. *Mol. Breed.* 4, 369– 379.

Zimmermann P. et al. Engineering the root-soil interface via targeted expression of a synthetic phytase gene in trichoblasts. *Plant Biotechnology Journal*, 1: 353-360 (2003).

Zobel., D. B., W. A. Mckee, G. M. HAWK, And C. T. DYRNESS. 1976. Relationships Of Environment To Com- Position, Structure, And Diversity Of Forest Communities Of The Central Western Cascades Oforegon. *Ecol. Mongr.* 46(2): 135-156.