



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI
VITERBO**

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA ED AGROCHIMICA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

IN BIOTECNOLOGIE VEGETALI - XVIII CICLO.

**IMPIEGO DELLE PIANTE COME BIOFABBRICHE ED USO
DI SEQUENZE DERIVATE DA PIANTA E/O DA VIRUS
VEGETALI PER LO SVILUPPO DI VACCINI TERAPEUTICI
DI NUOVA GENERAZIONE (GENETICI E DI ORIGINE
VEGETALE) CONTRO I TUMORI INDOTTI DAI VIRUS DEL
PAPILLOMA UMANO AD ALTO RISCHIO**

S.S.D. BIO 04

Coordinatore: Prof. Domenico Lafiandra

Firma

Tutor: Dott.ssa Rosella Franconi

Firma.....

Dottoranda: Silvia Massa

Firma

1. INTRODUZIONE

1.1 IL VIRUS DEL PAPILOMA UMANO	Pag. 1
1.1.1 GENERALITÀ ED EPIDEMIOLOGIA	Pag. 1
1.1.2 STRUTTURA DEL VIRUS	Pag. 5
1.1.3 GENOMA DEL VIRUS	Pag. 6
1.1.4 INFEZIONE E CICLO VITALE	Pag. 7
1.1.5 TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE E PATOLOGIE INDOTTE	Pag. 10
1.2 LA TUMORIGENESI CERVICALE	Pag. 13
1.2.1 L'INTEGRAZIONE DEL DNA DI HPV NEL GENOMA DELL'OSPITE	Pag. 13
1.2.2 CO-FATTORI NELLA CARCINOGENESI CERVICALE	Pag. 15
1.2.3 L'ONCOPROTEINA E7	Pag. 17
1.3 L'IMMUNITÀ NATURALE CONTRO HPV	Pag. 23
1.3.1 L'EVASIONE DEI MECCANISMI DI DIFESA DELL'OSPITE DA PARTE DEL VIRUS	Pag. 23
1.3.2 MECCANISMI DI DIFESA DELL'OSPITE CONTRO HPV	Pag. 24
1.3.2.1 Attivazione dei meccanismi di risposta CTL contro HPV	Pag. 26
1.3.2.2 Attivazione dei meccanismi di risposta THL contro HPV	Pag. 29
1.3.2.3 La risposta immune contro gli antigeni di HPV	Pag. 30
1.4 PROGETTAZIONE DI UN VACCINO: ANTIGENI "TARGET" PER LA PROFILASSI O LA TERAPIA	Pag. 33
1.4.1 VACCINI PREVENTIVI ANTI-HPV	Pag. 34
1.4.2 VACCINI TERAPEUTICI ANTI-HPV	Pag. 37
1.4.3 VACCINI TERAPEUTICI A DNA CONTRO HPV	Pag. 44
1.4.3.1 Le vaccinazioni genetiche	Pag. 44
1.4.3.2 Vaccinazioni terapeutiche a DNA contro HPV	Pag. 53
1.4.4 VACCINI ANTI-HPV IN PIANTA PER IL CONTROLLO DELL'INFEZIONE E PER LA TERAPIA DELLE LESIONI NEOPLASTICHE ASSOCIATE AD HPV	Pag. 61
1.4.4.1 Produzione di antigeni vaccinali in pianta	Pag. 63
1.4.4.2 Trasformazione genetica stabile (piante transgeniche)	Pag. 64
1.4.4.3 Espressione transiente di proteine eterologhe in pianta	Pag. 68
1.4.4.4 Ottimizzazione dell'espressione della proteina eterologa	Pag. 71
1.4.4.5 Vaccini edibili	Pag. 73

1.4.4.6 “Trials” clinici con vaccini derivati da pianta	Pag. 76
1.4.4.7 Vaccini anti-cancro derivati da pianta	Pag. 79
1.4.4.8 Vaccini profilattici derivati da pianta contro HPV	Pag. 80
1.4.4.9 Vaccini terapeutici derivati da pianta contro HPV	Pag. 82

2. SCOPO DEL LAVORO

2.1 REALIZZAZIONE DI VACCINI TERAPEUTICI A DNA CONTRO HPV: SCELTA DI MOLECOLE “ATTIVATRICI DELL’IMMUNITÀ”	Pag. 83
2.1.1 Razionale delle fusioni con CP	Pag. 86
2.1.2 Razionale delle fusioni con PGIPss	Pag. 88
2.2 SVILUPPO DI VACCINI PROTEICI A SCOPO TERAPEUTICO DERIVATI DA PIANTA	Pag. 89
2.2.1 Vaccino terapeutico derivato da pianta basato sull’espressione della proteina E7 mediata da PVX	Pag. 91
2.2.2 Vaccino terapeutico derivato da pianta basato sull’espressione della proteina di fusione Lichenasi B-E7 mediata da agroinfezione	Pag. 93
2.2.3 Vaccino terapeutico derivato da pianta basato sull’espressione stabile della proteina di fusione Lichenasi B-E7 in radici	Pag. 95

3. MATERIALI E METODI

3.1 REAGENTI DI BASE, PER COLTURE BATTERICHE E DI CELLULE DI MAMMIFERO	Pag. 97
3.1.1 Soluzioni di base	Pag. 97
3.1.2 Terreni di coltura	Pag. 97
3.1.3 Ceppi batterici	Pag. 98
3.1.4 Linea cellulare HEK 293 (“Human Embryo Kidney”)	Pag. 99
3.1.5 Anticorpi	Pag. 99
3.1.5.1 Anticorpi primari	Pag. 99
3.1.5.2 Anticorpi secondari	Pag. 100
3.1.6 Oligonucleotidi	Pag. 100
3.1.7 Plasmidi	Pag. 100
3.1.7.1 pQE-30	Pag. 100
3.1.7.2 pBlueScriptSK(+)	Pag. 101
3.1.7.3 pcDNA3.1(+)	Pag. 102
3.1.7.4 pPVX201	Pag. 103

3.1.7.5	pET-32a	Pag. 103
3.1.7.6	Plasmidi derivati da TMV e vettore pBI-D4	Pag. 105
A) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO A DNA BASATO SU UNA VERSIONE NON ONCOGENA DEL GENE E7 DI HPV16 FUSA ALLA SEQUENZA CODIFICANTE PER LA CP DI PVX E/O ALLA SEQUENZA SEGNALE DELLA PGIP DI <i>Phaseolus vulgaris</i>		
3.2	MUTAGENESI DEL GENE E7 NEL SITO DI LEGAME A PRB	Pag. 107
3.3	ESPRESSIONE DELLA PROTEINA E7GGG IN <i>E. coli</i>	Pag. 109
3.3.1	Induzione di cellule XL1 <i>blue</i> contenenti il costrutto pQE30-E7GGG	Pag. 109
3.3.2	Purificazione della proteina E7GGG con His6-tag in condizioni native tramite cromatografia per affinità con ioni metallici immobilizzati	Pag. 109
3.3.3	Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE)	Pag. 111
3.3.4	Colorazione delle proteine con Blu di Coomassie	Pag. 112
3.3.5	“Immunoblotting”	Pag. 112
3.4	PREPARAZIONE DEI PLASMIDI RICOMBINANTI BASATI SU pcDNA3.1(+)	Pag. 112
3.4.1	Sequenza E7GGG e sequenza CP	Pag. 112
3.4.2	Sequenze E7GGG-CP ed E7GGG-link-CP	Pag. 114
3.4.3	Sequenze PGIPss-E7GGG e PGIPss-E7GGG-KDEL	Pag. 117
3.4.4	Sequenze PGIPss-E7GGG-CP e PGIPss-E7GGG-L-CP	Pag. 118
3.4.5	Clonaggio delle sequenze nel vettore intermedio pBlueScriptSK(+)	Pag. 119
3.4.5.1	Reazione di legazione	Pag. 119
3.4.5.2	Trasformazione delle cellule batteriche con metodo chimico	Pag. 119
3.4.5.3	Caratterizzazione dei ricombinanti batterici mediante PCR su colonia	Pag. 120
3.4.5.4	Mini preparazioni di DNA plasmidico	Pag. 120
3.4.6	Clonaggio delle sequenze nel vettore di espressione eucariotico pcDNA3.1(+)	Pag. 121
3.5	ESPRESSIONE IN CELLULE DI MAMMIFERO	Pag. 121
3.5.1	Maxi preparazione di DNA plasmidico in assenza di endotossine	Pag. 121
3.5.2	Trasfezione di cellule di mammifero	Pag. 122
3.5.3	Analisi dei lisati cellulari	Pag. 123
3.5.3.1	SDS-PAGE ed “Immunoblotting”	Pag. 123

3.5.3.2 Immunoprecipitazione	Pag. 123
3.5.3.3 Immunofluorescenza	Pag. 124
3.5.3.4 Estrazione dell'RNA totale dalle cellule trasfettate ed RT-PCR	Pag. 124
3.5.4 Analisi dei mezzi condizionati	Pag. 125
3.5.4.1 Ultracentrifugazione	Pag. 125
3.5.4.2 Immunoprecipitazione	Pag. 125
3.5.4.3 ELISA	Pag. 126
3.6 VACCINAZIONI TERAPEUTICHE A DNA IN MODELLO PRE-CLINICO	Pag. 126
3.6.1 Preparazione del DNA plasmidico per le immunizzazioni	Pag. 126
3.6.2 Cellule tumorali murine TC-1	Pag. 127
3.6.3 Scheda di vaccinazione terapeutica	Pag. 127
3.7 VALUTAZIONE DELLA SELEZIONE DI CLONI LINFOCITARI SECERNENTI IFN- γ	Pag. 128
3.7.1 Estrazione degli splenociti	Pag. 128
3.7.2 ELISPOT	Pag. 128
3.8 RIVELAZIONE DEGLI ANTICORPI NEI SIERI DEGLI ANIMALI IMMUNIZZATI MEDIANTE ELISA	Pag. 129
 B) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO VEGETALE BASATO SULLA PROTEINA E7 ESPRESSA IN <i>Nicotiana benthamiana</i> MEDIANTE PVX	
3.9 PREPARAZIONE DEI VETTORI PER L'ESPRESSIONE TRANSIENTE MEDIATA DA PVX DEL GENE E7 DI HPV-16 IN <i>Nicotiana benthamiana</i>	Pag. 129
3.9.1 Costrutto secretorio pPVX-PGIPss-E7	Pag. 129
3.9.2 Costrutto pPVX-PGIPss-E7-KDEL	Pag. 131
3.9.3 Costrutti pPVX-His ₆ E7 e pPVX- His ₆ E7-KDEL	Pag. 132
3.9.4 Costrutto pPVX-E7GGG	Pag. 132
3.10 INFEZIONE, PREPARAZIONE ED ANALISI DEGLI ESTRATTI CRUDI DALLE PIANTE DI <i>Nicotiana benthamiana</i>	Pag. 133
3.10.1 Separazione delle proteine solubili totali ed "immunoblotting" degli estratti crudi	Pag. 134
3.10.2 Valutazione della reattività in ELISA della proteina E7 derivata da pianta	Pag. 134

3.11	ESTRAZIONE DEI FLUIDI INTERCELLULARI	Pag. 135
3.12	IMMUNIZZAZIONE IN MODELLO PRE-CLINICO CON ESTRATTI DI PIANTA E SFIDA CON CELLULE TUMORALI	Pag. 135
3.13	ELISPOT PER LA VALUTAZIONE DELLA SELEZIONE DI CLONI LINFOCITARI SECERNENTI IFN- γ	Pag. 136
C) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO VEGETALE BASATO SULLA FUSIONE E7-LICHENASI PURIFICATA O CONTENUTA IN ESTRATTI VEGETALI DI <i>Nicotiana benthamiana</i> DOPO AGROINFEZIONE.		
3.14	PREPARAZIONE DEI PLASMIDI RICOMBINANTI BASATI SU pBID4	Pag. 136
3.14.1	Amplificazione delle sequenze E7 ed E7GGG	Pag. 136
3.14.2	Clonaggio delle sequenze nel vettore intermedio pBlueScriptSK(-)	Pag. 137
3.14.2.1	Reazione di ligazione e trasformazione delle cellule batteriche	Pag. 137
3.14.2.2	Caratterizzazione dei ricombinanti batterici	Pag. 138
3.14.3	Clonaggio delle sequenze E7 ed E7GGG nei vettori pET-PRACS-lic-KDEL e pET-PRACS-lic-VAC	Pag. 139
3.14.4	Clonaggio delle sequenze PRACS-lic-E7-KDEL e PRACS-lic-E7-VAC, PRACS lic-E7GGG-KDEL e PRACS-lic-E7GGG-VAC nel vettore pBID4	Pag. 139
3.15	ESPRESSIONE TRANSIENTE MEDIATA DA <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ED <i>Agrobacterium rhizogenes</i> IN PIANTE DI <i>Nicotiana benthamiana</i>	Pag. 140
3.15.1	Preparazione delle cellule batteriche elettrocompetenti di <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ceppo GV3101) ed <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (ceppo A4)	Pag. 140
3.15.2	Trasformazione di <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ed <i>Agrobacterium rhizogenes</i> con i plasmidi pBID4-Lic-E7-KDEL, pBID4-Lic-E7GGG-KDEL, pBID4-Lic-E7-VAC o pBID4-Lic-E7GGG-VAC	Pag. 140
3.15.2.1	Minipreparazioni di DNA dai ceppi di <i>Agrobacterium</i> trasformati	Pag. 141
3.15.3	Agroinfiltrazione di piante di <i>Nicotiana benthamiana</i> con i ceppi di <i>Agrobacterium</i> trasformati	Pag. 141
3.15.3.1	Agro-infiltrazione sotto vuoto	Pag. 142
3.15.3.2	Agro-infiltrazione manuale	Pag. 142
3.16	ANALISI DEGLI ESTRATTI DI FOGLIE INFILTRATE DI <i>Nicotiana benthamiana</i>	Pag. 142
3.16.1	Preparazione degli estratti di foglia ed analisi mediante SDS-PAGE ed “immunoblotting”	Pag. 142
3.16.2	Rivelazione dell’attività lichenasica nelle fusioni mediante Zimogramma	Pag. 143

- 3.17 PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE DI FUSIONE LIC-E7-KDEL E LIC-E7GGG-KDEL CON HIS₆-TAG TRAMITE CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ CON IONI METALLICI IMMOBILIZZATI Pag. 144
- 3.18 PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE DI FUSIONE LIC-E7-KDEL E LIC-E7GGG-KDEL TRAMITE CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO Pag. 145
- 3.18.1 Analisi mediante SDS-PAGE ed “Immunoblotting” delle proteine di fusione purificate Pag. 146
- 3.19 IMMUNIZZAZIONE CON LE PROTEINE DI FUSIONE LIC-E7-KDEL E LIC-E7GGG-KDEL PURIFICATE IN UN MODELLO PRE-CLINICO Pag. 146

D) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO VEGETALE BASATO SULLA FUSIONE E7-LICHENASI ESPRESSA IN RADICI DI *Nicotiana benthamiana* E *Petunia hybrida* MEDIANTE TRASFORMAZIONE STABILE

- 3.19 TRASFORMAZIONE DI ESPIANTI FOGLIARI MEDIATA DA *Agrobacterium rhizogenes* Pag. 148

4 RISULTATI

- A) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO A DNA BASATO SU UNA VERSIONE NON ONCOGENA DEL GENE E7 DI HPV16 FUSA ALLA SEQUENZA CODIFICANTE PER LA CP DI PVX E/O ALLA SEQUENZA SEGNALE DELLA PGIP DI *Phaseolus vulgaris* Pag. 150
- 4.1 MUTAGENESI DEL GENE E7 NEL SITO DI LEGAME A pRb Pag. 150
- 4.2 ESPRESSIONE DELLA PROTEINA E7GGG IN *E. coli* Pag. 151
- 4.2.1 Purificazione della proteina His₆- E7GGG Pag. 151
- 4.3 PREPARAZIONE DEI PLASMIDI RICOMBINANTI BASATI SU pcDNA3.1(+) Pag. 153
- 4.3.1 Realizzazione dei costrutti pcDNA3/E7GGG, pcDNA3/E7GGG-CP e pcDNA3/E7GGG-L-CP Pag. 153
- 4.3.1.1 Amplificazione della sequenza E7GGG Pag. 153
- 4.3.1.2 Amplificazione della sequenza CP Pag. 154
- 4.3.1.3 Assemblaggio delle sequenze E7GGG-CP e E7GGG-link-CP Pag. 154
- 4.3.1.4 Clonaggio delle sequenze E7GGG, CP, E7GGG-CP e E7GGG-link-CP in pcDNA3.1(+) Pag. 155
- 4.3.2 Realizzazione dei costrutti pcDNA3/PGIPss-E7GGG e

pcDNA3/PGIPss-E7GGG-KDEL	Pag. 157
4.3.2.1 Amplificazione delle sequenze PGIPss-E7GGG e PGIPss-E7GGG-KDEL	Pag. 157
4.3.2.2 Clonaggio delle sequenze di fusione in pcDNA3.1(+)	Pag. 157
4.3.3 Amplificazione delle sequenze PGIPss-E7GGG-CP e PGIPss-E7GGG-L-CP	Pag. 158
4.3.4 Clonaggio delle sequenze di fusione in pcDNA3.1(+)	Pag. 158
4.4 ESPRESSIONE DELLE PROTEINE IN CELLULE DI MAMMIFERO	Pag. 159
4.4.1 Trasfezione di cellule di mammifero	Pag. 159
4.4.1.2 Analisi dei lisati cellulari in “immunoblotting”	Pag. 160
4.4.1.3 Analisi dei lisati cellulari in immunofluorescenza	Pag. 168
4.4.1.4 Analisi dei mezzi condizionati	Pag. 170
4.5 VACCINAZIONI TERAPEUTICHE A DNA IN MODELLO PRE-CLINICO	Pag. 170
4.5.1 Scheda di vaccinazione terapeutica	Pag. 170
4.5.2 Protezione dal tumore	Pag. 171
4.5.2.1 Protezione conferita dai plasmidi pcDNA3/E7GGG, pcDNA3/E7GGG-CP e pcDNA3/E7GGG-linker-CP	Pag. 171
4.5.2.2 Protezione conferita dai plasmidi pcDNA3/PGIPss-E7GGG e pcDNA3/PGIPss-E7GGG-KDEL	Pag. 172
4.5.2.3 Protezione conferita dai plasmidi pcDNA3/PGIPss-E7GGG-CP e pcDNA3/PGIPss-E7GGG-linker-CP	Pag. 172
4.5.3 Analisi delle IgG totali anti-E7 nei sieri degli animali immunizzati	Pag. 173
4.5.3.1 IgG circolanti indotte dalla vaccinazione con i plasmidi pE7GGG, pE7GGG-CP e pE7GGG-linker-CP	Pag. 173
4.5.3.2 IgG circolanti indotte dalla vaccinazione con i plasmidi pPGIPss-E7GGG e pPGIPss-E7GGG-KDEL	Pag. 173
4.5.3.3 IgG circolanti indotte dalla vaccinazione con i plasmidi pPGIPss-E7GGG-CP, e pPGIPss-E7GGG-linker-CP	Pag. 173
4.5.4 Analisi delle risposte cellulo-mediate E7-specifiche nei topi immunizzati	Pag. 175
4.5.4.1 Induzione di cloni linfocitari E7-specifici in seguito ad immunizzazione con i plasmidi pcDNA3/E7GGG, pcDNA3/E7GGG-CP e pcDNA3/E7GGG-linker-CP	Pag. 175
4.5.4.2 Induzione di cloni CTL E7-specifici in seguito ad immunizzazione con i plasmidi pPGIPss-E7GGG e pPGIPss-E7GGG-KDEL	Pag. 176
4.5.4.3 Induzione di cloni CTL E7-specifici in seguito ad immunizzazione con i plasmidi pPGIPss-E7GGG-CP, e pPGIPss-E7GGG-linker-CP	Pag. 176

B) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO VEGETALE
BASATO SULLA PROTEINA E7 DI HPV16 ESPRESSA IN *Nicotiana
benthamiana* MEDIANTE PVX

4.6	PRODUZIONE DELLA PROTEINA E7 DI HPV16 ATTRAVERSO LA VIA SECRETORIA DI <i>Nicotiana benthamiana</i>	Pag. 178
4.6.1	Preparazione del costrutto secretorio pPVX-PGIPss-E7	Pag. 178
4.6.2	Separazione delle proteine solubili totali ed “immunoblotting” degli estratti crudi di <i>N. benthamiana</i> e dei fluidi intercellulari	Pag. 179
4.6.3	Immunizzazione in modello pre-clinico con estratti di pianta e sfida con cellule tumorali	Pag. 181
4.6.3.1	Risposta immune cellulo mediata e protezione da sfida con cellule tumorali esprimenti la proteina E7	Pag. 181
4.6.3.2	ELISPOT	Pag. 183
4.7	COSTRUTTI pPVX-PGIPss-E7-KDEL, pPVX-His ₆ E7, pPVX- His ₆ E7-KDEL E pPVX-E7GGG	Pag. 184
4.7.1	Preparazione dei costrutti	Pag. 184
4.7.2	Infezione, preparazione ed analisi degli estratti crudi di pianta	Pag. 185
4.7.2.1	pPVX-E7GGG	Pag. 185
4.7.2.2	pPVX-His ₆ E7	Pag. 185
4.7.2.3	pPVX- His ₆ E7-KDEL E pPVX-PGIPss-E7-KDEL	Pag. 186

C) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO VEGETALE
BASATO SULLA FUSIONE E7-LICHENASI ESPRESSA IN PIANTE DI
Nicotiana benthamiana DOPO AGROINFEZIONE (effettuato presso il
“Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology”, Newark-DE)

4.8	PREPARAZIONE DEI PLASMIDI RICOMBINANTI BASATI SU pBID4	Pag. 187
4.8.1	Amplificazione delle sequenze E7 ed E7GGG	Pag. 187
4.8.2	Clonaggio delle sequenze E7 ed E7GGG nei vettori pET-PRACS-lic-KDEL e pET-PRACS-lic-VAC	Pag. 187
4.8.3	Clonaggio delle sequenze PRACS-lic-E7-KDEL e PRACS-lic-E7-VAC, PRACS lic-E7GGG-KDEL e PRACS-lic-E7GGG-VAC nel vettore pBID4	Pag. 188
4.9	ANALISI DEGLI ESTRATTI DI FOGLIE INFILTRATE DI <i>Nicotiana benthamiana</i>	Pag. 188
4.9.1	Preparazione degli estratti di foglia ed analisi mediante “immunoblotting”	Pag. 188

- 4.9.2 Rivelazione dell'attività lichenasica nelle fusioni mediante Zimogramma Pag. 192
- 4.9.3 Purificazione delle proteine di fusione Lic-E7-KDEL e Lic-E7GGG-KDEL ed analisi mediante SDS-PAGE ed "immunoblotting" Pag. 194
- 4.9.4 Purificazione delle proteine di fusione Lic-E7-KDEL e Lic-E7GGG-KDEL tramite cromatografia a scambio ionico Pag. 195

D) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO VEGETALE BASATO SULLA FUSIONE E7-LICHENASI ESPRESSA IN RADICI DI *Nicotiana benthamiana* E *Petunia hybrida* MEDIANTE TRASFORMAZIONE STABILE

- 4.10 TRASFORMAZIONE DI ESPIANTI FOGLIARI MEDIATA DA *Agrobacterium Rhizogenes* Pag. 197
5. **DISCUSSIONE** Pag. 198
6. **BIBLIOGRAFIA** Pag. 214
- RINGRAZIAMENTI** Pag. 248

INTRODUZIONE

1.1 IL VIRUS DEL PAPILOMA UMANO

1.1.1 GENERALITÀ ED EPIDEMIOLOGIA

I virus del Papilloma (genere *Papillomavirus*, famiglia *Papovaviridae*) formano un gruppo eterogeneo di virus associati alla comparsa ed alla persistenza di lesioni cutanee o mucosali benigne e maligne in molte specie animali, incluso l'uomo. Nella patologia umana, il Papillomavirus Umano (HPV) riveste un ruolo di particolare importanza, poiché possiede un tropismo spiccato per le cellule epiteliali della cute e delle mucose che, appunto, infetta prevalentemente (Pontieri *et al.*, 1996).

Sulla base dell'omologia di sequenza del DNA virale, che correla con il comportamento biologico e con il tropismo tissutale, sono stati classificati, fino ad oggi, 138 tipi di HPV (de Villiers *et al.*, 2004). L'eterogeneità dei tipi di HPV ne riflette, in effetti, la restrizione anatomica per i differenti tessuti ed una prima classificazione consente di suddividerli in virus non genitali cutanei, ossia a tropismo epidermico (*Tabella 1*), e virus mucosali non genitali e genitali (*Tabella 2*, *Tabella 3*) che infettano, invece, rispettivamente, le superfici mucosali del cavo oro-faringeo, della laringe, dell'albero respiratorio oppure dell'epitelio ano-genitale (Burd, 2003). Esistono tipi di HPV cancerogeni in ciascuna di queste tre categorie.

Circa 40 tipi di HPV sono responsabili di infezioni genitali (de Villiers *et al.*, 2004) ed in base alla prognosi clinica delle lesioni che provocano, possono essere classificati in due categorie:

1. HPV a basso rischio (prevalentemente tipo 6, 11, 42, 43, e 44), che inducono principalmente lesioni iper-proliferative benigne delle cellule epiteliali definite condilomi o verruche;
2. HPV ad alto rischio od oncogeni (prevalentemente tipo 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70), agenti causali di differenti manifestazioni neoplastiche, principalmente a carico delle mucose (zur Hausen, 2002).

Tabella 1

TIPI NON GENITALI CUTANEI	
Patologia	Tipo di HPV
<i>Verrucae vulgaris</i>	1, 2, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65
Verruca plantare	1, 2, 4, 63
Verruca piatta	3, 10, 27, 28, 38, 41, 49
Verruca “del macellaio”	1, 2, 3, 4, 7, 10, 28
Verruca a mosaico	2, 27, 57
Carcinoma ungueale a cellule squamose	16
Epidermodisplasia verruciforme benigna	2, 3, 10, 12, 15, 19, 36, 46, 47, 50
Epidermodisplasia verruciforme maligna	5, 8, 9, 10, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 37, 38
Lesioni epidermiche non verruciformi	37, 38

Tabella 2

TIPI NON GENITALI MUCOSALI	
Patologia	Tipo di HPV
Papillomatosi respiratoria	6, 11
Carcinoma polmonare a cellule squamose	6, 11, 16, 18
Papilloma laringeo	6, 11, 30
Carcinoma laringeo	16, 18
Papilloma del seno maxillare	57
Carcinoma sinusale a cellule squamose	16, 18
Papilloma congiuntivale	6, 11
Carcinoma congiuntivale	16
Iperplasia focale dell'epitelio orale (malattia di Heck)	13, 32
Carcinoma orale	16, 18
Leucoplachia orale	16, 18
Carcinoma esofageo a cellule squamose	16, 18

Tabella 3

TIPI ANO-GENITALI	
Patologia	Tipo di HPV
Carcinoma vulvare	6, 11, 16, 18
Carcinoma vaginale	16
Carcinoma cervicale	16, 18, 31, 45
Carcinoma anale	16, 31, 32, 33
Carcinoma <i>in situ</i> del pene	16
Carcinoma del pene	16, 18
Condiloma acuminato	6, 11, 30, 42, 44, 45, 51, 52, 54
Papillomi di Bowenoid	16, 18, 34, 39, 42, 45
Malattia di Bowen	16, 18, 31, 34
Condiloma gigante (tumore di Busche-Löwenstein)	6, 11
Displasie intraepiteliali	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58,
Neoplasie intraepiteliali severe	16, 18, 56, 58
Neoplasie intraepiteliali non specificate	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69

Nella maggioranza dei casi, le lesioni provocate dagli HPV a tropismo genitale regrediscono spontaneamente. Talvolta, tuttavia, possono persistere, dare origine a recidive ed eventualmente evolvere in manifestazioni neoplastiche.

Gli HPV a basso rischio di tipo 6 ed 11 sono, da soli, la causa del 90% della casistica delle verruche ano-genitali o condilomi (Bosch *et al.*, 2003; von Krogh, 2001).

Il sotto-gruppo degli HPV che include tipi ad alto rischio come HPV16 ed HPV18, invece, è associato con la comparsa e la persistenza di lesioni neoplastiche e pre-neoplastiche del tratto genitale. In quest'ambito, HPV16 e 18 sono responsabili per oltre il 70% di tutti i casi riscontrati di cancro cervicale e di neoplasia cervicale intra-epiteliale di alto grado, ed HPV16 è il tipo virale più frequentemente associato ad infezioni cervicali latenti, benigne o pre-neoplastiche ed alla metà dei casi di carcinoma cervicale nel mondo (Da Silva *et al.*, 2001; Mahdavi *et al.*, 2005).

Oltre il 70% delle donne sessualmente attive va incontro ad infezione da HPV nel corso della vita (Bosch *et al.*, 2003) e, nel mondo, il cancro della cervice uterina è la seconda causa di morte nella popolazione femminile.

Le stime epidemiologiche suggeriscono che la prevalenza dell'infezione da HPV, a livello mondiale, è compresa tra il 9 e il 13%, con circa 630 milioni di soggetti colpiti. L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha stimato la prevalenza di infezioni croniche persistenti pari al 7% nei Paesi sviluppati e al 15% nei Paesi in via di sviluppo (*Fig. 1, Fig. 2*).

Ogni anno, infatti, nel mondo sono diagnosticati 470000 casi di cancro cervicale, l'80% dei quali proprio nelle regioni più arretrate, e 280000 decessi l'anno, principalmente nei Paesi in via di sviluppo, nella cui popolazione femminile tale neoplasia, in termini di incidenza, è seconda solo al cancro al seno (Ferlay *et al.*, 2001).

Lo "screening" basato sullo "smear test" di Papanicolau ("Pap test") e la disponibilità di trattamenti tempestivi, rendono il cancro della cervice uterina una neoplasia relativamente poco diffusa nel mondo sviluppato (35000 decessi l'anno dovuti a neoplasie cervicali rappresentano, comunque, la media stimata per Europa e Stati Uniti); al contrario, la carenza di tali strumenti è la principale ragione per una così significativa incidenza nei Paesi in via di sviluppo, cosicché una diagnosi tardiva rende il cancro cervicale praticamente fatale in queste regioni (Maitland dal sito IARC www.iarc.fr).

Tuttavia, tali procedure, pur riducendo il rischio di sviluppare lesioni cervicali, non possono, ovviamente, proteggere dall'infezione da HPV o curare dallo sviluppo delle neoplasie a questa associate, le quali necessitano di un attento "follow-up" e, spesso, di escissione chirurgica o di trattamenti chemio-terapici (Peto *et al.*, 2004; Sadler *et al.*, 2004). Inoltre, le infezioni da HPV

che generano verruche genitali, spesso ricorrenti ed il cui trattamento è costoso e doloroso, si sviluppano principalmente nella popolazione giovanile (con un'incidenza dell'1-2%). In tali soggetti la diagnosi di queste lesioni ingenera spesso disfunzioni o problematiche di tipo psicologico (Maw *et al.*, 1998; Persson *et al.*, 1996 von Krogh, 2001).

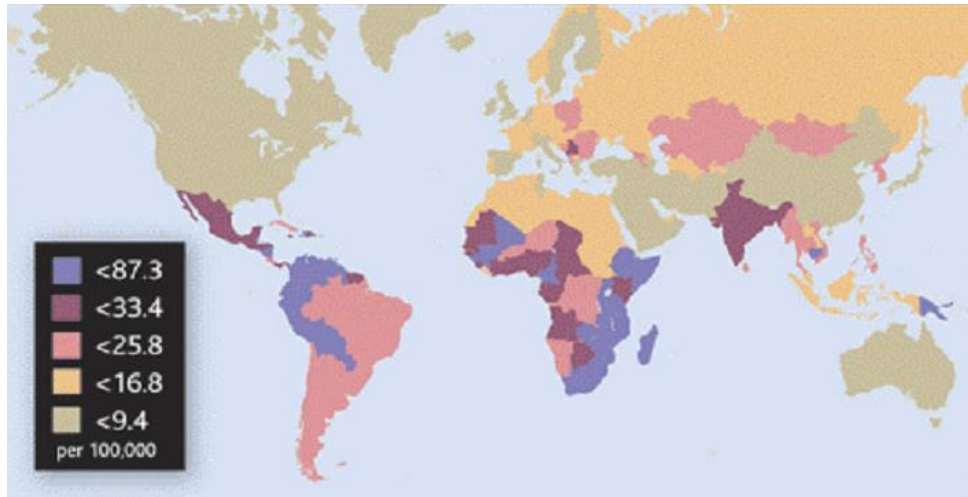


Fig. 1: Incidenza del cancro della cervice uterina nel mondo (Burns & Maitland, 2005)

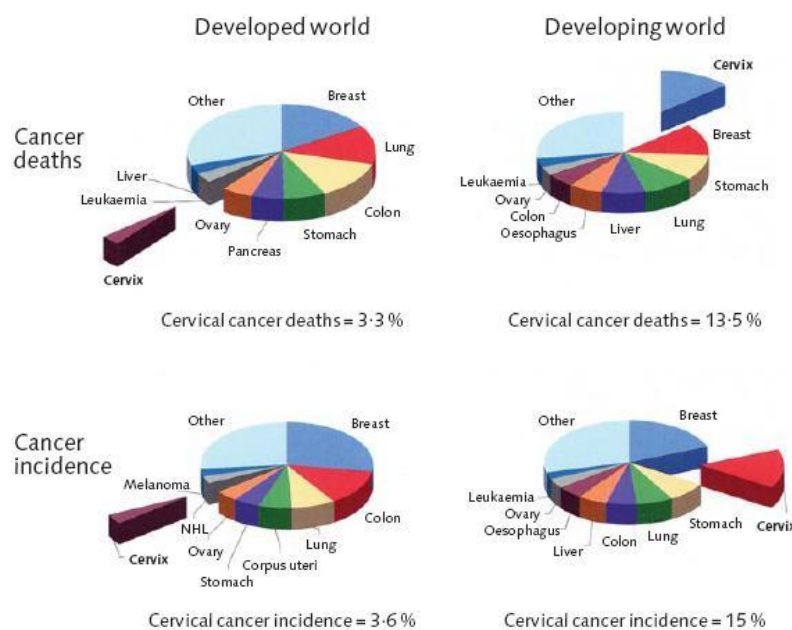


Fig. 2: Tasso di incidenza e di mortalità del cancro della cervice uterina: paragone tra Paesi industrializzati e Paesi in via di sviluppo. I diagrammi sono colorati in funzione della relativa prevalenza. Nei paesi sviluppati il carcinoma cervicale presenta una bassa incidenza ed una mortalità altrettanto poco significativa. Nei Paesi in via di sviluppo il relativo tasso di mortalità è il più alto fra tutte le singole forme di cancro, ed il tasso di prevalenza è secondo solo al cancro al seno (Burns & Maitland, 2005).

1.1.2 STRUTTURA DEL VIRUS

Gli HPV sono virus icosaedrici provvisti di involucro capsidico ma privi di “envelope”, con genoma a DNA circolare a doppio filamento di complessità pari a 7.9 Kb (zur Hausen, 2002). I primi studi strutturali condotti sui Papillomavirus sono stati limitati fortemente dalla difficoltà nella purificazione di virioni da lesioni genitali, poiché il virus non è in grado di replicarsi in colture tissutali convenzionali. Tali studi hanno rivelato strutture icosaedriche del diametro di 55-60 nm contenenti il DNA genomico virale impacchettato come complesso nucleo-istonico (Stannard, 1995) (Fig. 3).

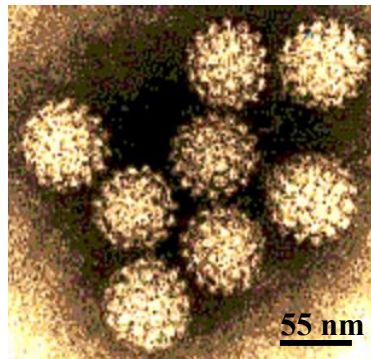


Fig. 3: Microfotografia in microscopia elettronica a trasmissione da un preparato del virus del Papilloma umano sottoposto a colorazione negativa.

Il capsidico ha una simmetria icosaedrica $T=7$ e consta di 72 capsomeri pentamerici ad avvistamento destrorso. Ricostruzioni digitali di crio-microfotografie, dimostrano che i capsomeri ai 12 vertici del virione contattano altri cinque capsomeri (e sono, dunque, pentavalenti) mentre i rimanenti 60 capsomeri contattano altri sei capsomeri (esavalenti); elaborate anse intercatene protrudono, inoltre, dalla superficie dei capsomeri (Fig. 4).

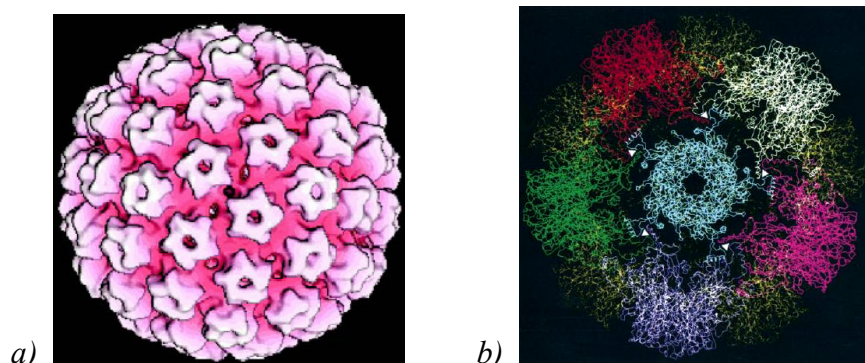


Fig. 4: Ricostruzione del capsidico del Papillomavirus (a) e relazione tra i capsomeri in due modelli (b) (Chen et al., 2000).

Il capsid virale che circonda il “core” nucleo-proteico, è costituito da una proteina capsidica maggiore e da una minore, chiamate rispettivamente L1 ed L2. Stime ottenute da analisi mediante SDS-PAGE su virioni purificati di Papillomavirus bovino, indicano un rapporto di 30 molecole di L1 per ogni molecola L2. Poiché vi sono 360 molecole di L1 per virione, si ipotizza che ogni virione contenga solo 12 molecole di L2. In effetti, la struttura icosaedrica di PV contiene 60 capsomeri esavalenti e 12 pentavalenti; ciò suggerisce che la densità elettronica osservata in alcune crio-microfotografie al centro dei 12 capsomeri pentavalenti, rappresenti una porzione della proteina L2 (Sapp *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000).

1.1.3 GENOMA DEL VIRUS

L’organizzazione del DNA virale è una caratteristica ben conservata tra i Papillomavirus. In tutti i tipi, infatti, si possono distinguere tre regioni principali: una regione precoce, una tardiva ed una regolatoria non codificante.

Considerando HPV16 come modello, il genoma virale, che nelle cellule infettate è solitamente mantenuto in forma episomale come molecola circolare chiusa superavvolta, comprende otto sequenze codificanti (zur Hausen, 2002). (Fig. 5).

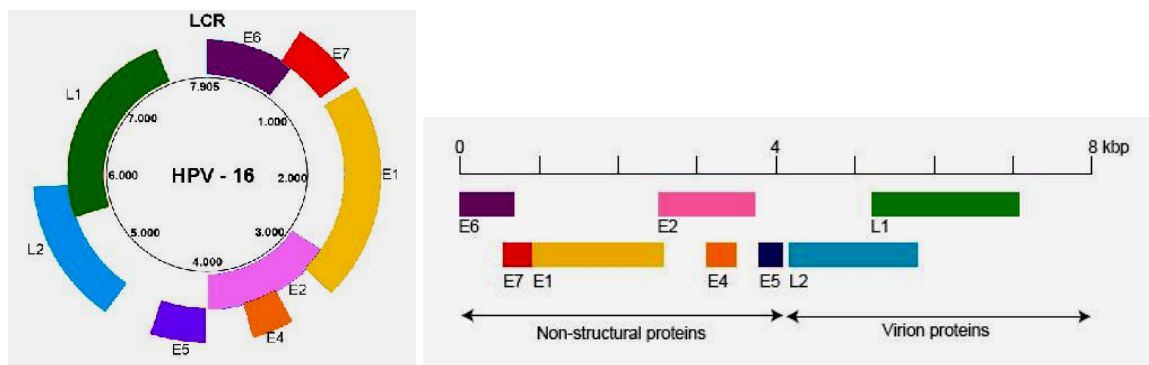


Fig. 5: Organizzazione del DNA di HPV16 e relazione tra le sequenze della regione codificante nel genoma linearizzato.

La regione codificante tardiva (“late”, L) codifica per le proteine del capsid L1 ed L2, già introdotte. La regione precoce (“early”, E) codifica per una varietà di geni regolatori implicati nella replicazione e nella trascrizione dei geni virali, nella regolazione del ciclo cellulare dell’ospite e, quindi, in ultima analisi, nella trasformazione maligna delle cellule infettate. Nella regione precoce risiede, dunque, il potenziale trasformante ed immortalizzante dei Papillomavirus umani (Fig. 6).

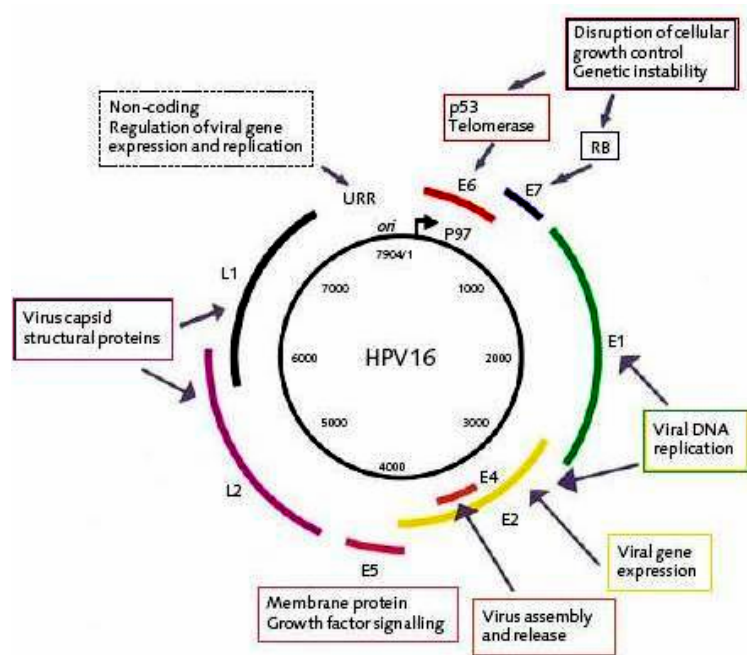


Fig. 6: Principali funzioni delle proteine codificate dai geni del papillomavirus.

A differenza degli altri papovavirus (come polioma ed SV40), i geni dei papillomavirus sono codificati da uno solo dei due filamenti di DNA con il modulo di lettura 3', e subiscono "splicing" alternativo. Di conseguenza, l'espressione virale è caratterizzata da un ampio spettro di RNA messaggeri codificanti per geni diversi per cui sono state descritte differenti varianti di "splicing" che codificano per proteine troncate o di fusione contenenti sequenze aminoacidiche provenienti da più di una proteina virale. La regione non codificante, a volte definita regione regolatoria a monte (URR) o "Long Control Region" (LCR), contiene tutti gli elementi regolatori in *cis* necessari per la trascrizione dei geni di HPV compresi il promotore precoce, l'origine di replicazione ed i siti di legame per la proteina regolatrice virale E2. Tale regione, che si estende per una lunghezza di 400 ÷ 1000 bp tra le regioni codificanti di E6 e di L1, è quella soggetta al più alto grado di variabilità nel genoma virale (Dell & Gaston, 2001).

1.1.4 INFEZIONE E CICLO VITALE

Gli HPV associati con lo sviluppo di neoplasie cervicali infettano esclusivamente i cheratinociti (o cellule con il potenziale per una differenziazione ad epitelio squamoso) dello strato basale o para-basale dell'epitelio cervicale attraverso lievi abrasioni o microtraumi che, generalmente, intervengono durante un rapporto sessuale (Pontieri *et al.*, 1996).

Il ciclo vitale del virus inizia con l'infezione della cellula ospite. Questo processo non è ancora noto nel dettaglio. Si ritiene, tuttavia, che non vi sia un recettore specifico sulla

superficie cellulare che permetta la penetrazione virale nell'epitelio, sebbene l'integrina- $\alpha 6$ sia stata proposta come recettore cellulare candidato per tutti i papillomavirus (Evander *et al.*, 1997).

La replicazione di HPV dipende fortemente dalla presenza di un epitelio in differenziamento. Gli HPV sono, infatti, parassiti intracellulari obbligati il cui ciclo vitale e la conseguente espressione delle proteine virali è intimamente correlata con lo stadio di differenziamento delle cellule dello strato spinoso degli epitelii (Chow *et al.*, 1997). Questa caratteristica biologica ha ostacolato inizialmente la possibilità di riprodurre del tutto il ciclo vitale in assenza di modelli altamente efficienti di differenziamento terminale *in vitro*. Attualmente, la comprensione della genetica molecolare di HPV ha consentito di esprimere i prodotti genici virali in cellule di molte specie, attraverso l'uso delle tecniche di trasfezione del DNA o di vettori virali ricombinanti.

Il processo di differenziamento cui le cellule dello strato basale o para-basale dell'epitelio cervicale vanno incontro durante la migrazione attraverso gli strati dell'epitelio stesso fino alla superficie mucosale (dove sono sostituite per esfoliazione da altre cellule differenziate provenienti dagli strati più profondi) è, dunque, richiesto per la replicazione virale. Inoltre, poiché le cellule epiteliali differenziate normalmente cessano di dividersi e frequentemente perdono anche il nucleo, le proteine di HPV si sono evolute in modo da mantenere le cellule ospiti in uno stato ciclico di divisione. Il risultato di tale strategia è un epitelio infetto contenente una popolazione più ampia di cellule nucleate ed in attiva divisione in tutti gli strati.

Dal momento in cui la cellula ospite lascia lo strato basale per differenziarsi terminalmente, una quantità progressivamente maggiore di DNA virale viene replicata, un numero maggiore di proteine tardive viene espresso, e sempre più particelle virali mature vengono formate e rilasciate dalla superficie dell'epitelio (*Fig. 7*) (Burns & Maitland, 2005).

Nel momento in cui il DNA virale viene rilasciato nella cellula ospite con l'infezione, si realizza l'espressione della proteina precoce E5. Il prodotto del gene E5 induce un incremento dell'attività delle protein-chinasi stimulate da mitogeni, potenziando così la risposta della cellula ospite ai fattori di crescita; ciò sostiene, negli stadi successivi del ciclo vitale del virus, una continua ed incontrollata proliferazione, accompagnata da un ritardato differenziamento della cellula ospite.

In concomitanza, vengono espressi i geni virali precoci E1 ed E2, responsabili della regolazione della replicazione e della trascrizione del DNA virale. Le regioni E1 ed E2

codificano entrambe per proteine che legano il DNA ed i loro prodotti sono richiesti per mantenere un episoma virale stabile.

Le funzioni della proteina E2 comprendono la regolazione positiva e negativa dell'espressione dei geni virali attraverso una specifica interazione con il promotore precoce. Negli HPV a tropismo genitale come HPV16, E2 reprime la trascrizione dei geni precoci (tra cui E6 ed E7) interagendo con specifici siti bersaglio all'interno della URR, inducendo lo slittamento dell'apparato di trascrizione in corrispondenza tali geni e, di conseguenza, la loro repressione.

La proteina E1 è un'ATPasi DNA-dipendente e una DNA-elicasi richiesta sia per l'iniziazione che per l'elongazione della sintesi del DNA virale (Liu *et al.*, 1995). La proteina E2 determina il legame della proteina E1 all'origine di replicazione virale. Tale evento sancisce l'inizio della replicazione del genoma virale secondo il modello di replicazione 'theta' durante la fase S del ciclo cellulare. In questa fase, il numero di copie della molecola circolare di DNA è mantenuto basso e costante (circa 20-50 copie per cellula) e solo una percentuale ridotta di trascritti è effettivamente espressa. Il basso livello di trascrizione dei geni E6 ed E7, determinato da E2 consente alla cellula ospite di continuare il proprio normale processo differenziativo (Flores & Lambert, 1997).

Nello strato spinoso prossimale dell'epitelio cervicale infettato, numerosi fattori di trascrizione cellulari interagiscono con la URR determinando l'inizio della trascrizione dei due geni precoci trasformanti di HPV, E6 ed E7. I prodotti di tali geni sono implicati nella deregolazione del ciclo cellulare a favore del virus e dunque interferiscono con i meccanismi di controllo dell'ospite inducendo la continua sintesi di DNA cellulare, essenziale per la replicazione produttiva del DNA virale stesso in tessuti che ormai sono giunti ad uno stadio differenziativo terminale (Syrjänen & Syrjänen, 1999). Le proteine E6 ed E7 esercitano tale funzione interagendo, rispettivamente, con gli onco-soppressori p53 e pRb ed impedendone l'azione regolatrice del ciclo cellulare.

L'espressione delle proteine precoci consente un incremento della proliferazione delle cellule infettate, alcune delle quali migrano nello strato sovra-basale (*Fig. 7*).

Come conseguenza, procedendo verso strato spinoso distale, HPV si replica in un alto numero di copie (100-1000 copie per cellula) secondo il modello del cerchio rotante. A questo stadio, si realizza l'amplificazione produttiva del virus attraverso la trascrizione dei geni tardivi L1 ed L2 per mezzo di un promotore tardivo putativo che determina la produzione delle proteine del capsido virale. Tali proteine auto-assemblano in virioni contenenti il DNA virale che

vengono rilasciati in concomitanza con lo sfaldamento degli strati epiteliali cornificati, attraverso un processo che non comporta lisi cellulare ed in un contesto non infiammatorio. La dinamica dell'impacchettamento del Papillomavirus nel virione non è nota, né si conosce il meccanismo di rilascio del virus da parte dei cheratinociti maturi in esfoliazione. L'espressione del prodotto del gene E4, la cui funzione non è stata ancora definita nel dettaglio, sebbene codificata all'interno della regione precoce, è principalmente ristretta allo strato spinoso distale. E4 contribuisce, probabilmente, alla maturazione ed al rilascio delle particelle virali neoformate (Burd, 2003). E' nota, infatti, la sua interazione *in vitro* con i filamenti intermedi di cheratina in colture di cellule epiteliali (Doorbar, 1996).

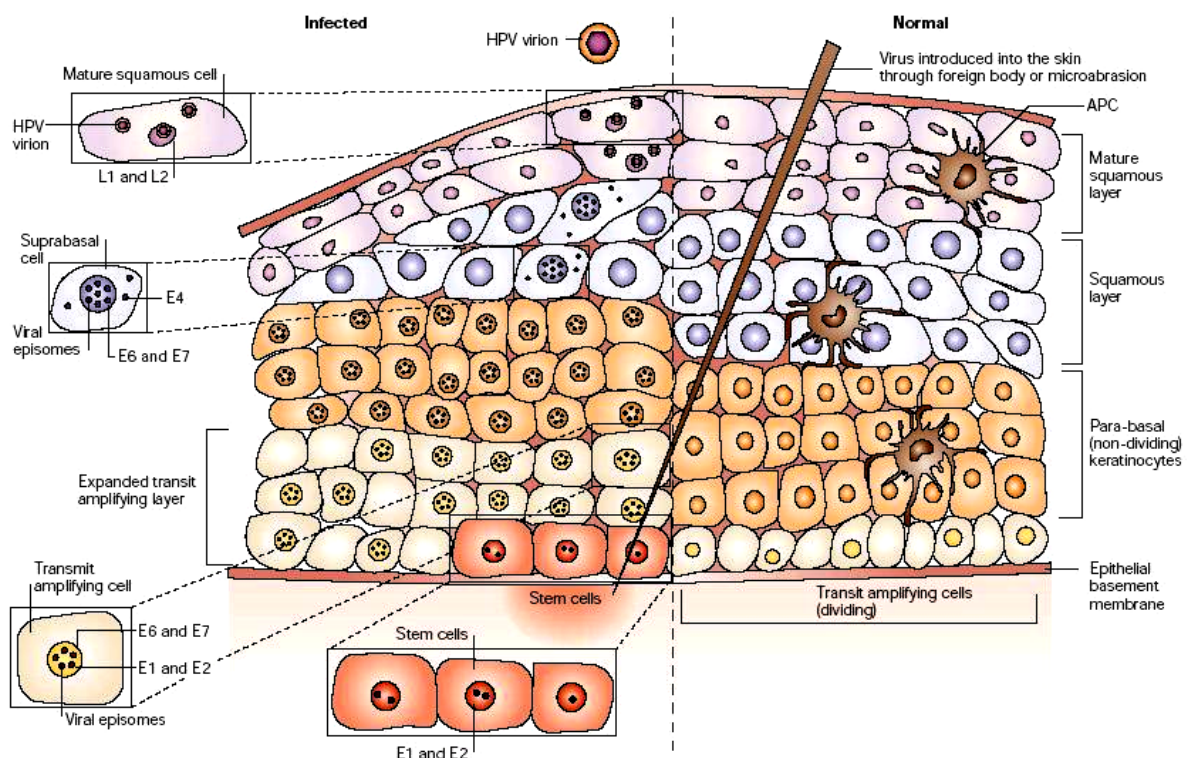


Fig. 7: Infezione, ciclo vitale ed espressione differenziale dei geni di HPV parallelamente al processo differenziativo dell'epitelio cervicale (Frazer, 2004).

1.1.5 TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE E PATOLOGIE INDOTTE

La trasmissione di HPV avviene, prevalentemente, per via sessuale; ciò espone ad un più elevato rischio di contagio le donne sessualmente attive con una tendenza a cambiare spesso partner che incrementano, così, imprevedibilmente la probabilità di contrarre dell'infezione (Schiffman & Brinton, 1995).

Tuttavia l'HPV non è un virus a trasmissione sessuale tipico, poiché anche semplicemente il contatto cutaneo può rappresentare una modalità di contagio a livello genitale, e la

trasmissione del virus può avvenire attraverso il contatto con i tessuti labiali o scrotali (Giles, 2003). HPV è, inoltre, molto resistente al calore e all'essiccamento, cosicché il contagio si può realizzare anche attraverso l'esposizione prolungata a tessuti o abiti contaminati che abbiano assorbito e trattenuto il virus (Roden *et al.*, 1997).

Inoltre vi è qualche evidenza di trasmissione dalla madre al nascituro. Alcuni HPV ad alto rischio sono, infatti, a volte associati anche allo sviluppo di papillomatosi respiratorie, riscontrate, principalmente, nella laringe di bambini di età compresa tra i 2 ed i 3 anni. Considerata l'elevata incidenza di infezioni pregresse da HPV nelle madri, si è ipotizzato un contagio del feto nell'utero durante la gestazione, o al momento del parto, attraverso il contatto con tessuti infetti materni (Burd, 2003).

Come già ricordato, la maggior parte delle infezioni genitali da HPV hanno carattere transitorio, tuttavia una parte di queste può persistere e indurre eventi di trasformazione neoplastica all'interno dell'epitelio cervicale.

L'infezione genitale da HPV può determinare tre diverse condizioni patologiche, principalmente secondo il tipo virale coinvolto.

La prima, lieve conseguenza è rappresentata dallo sviluppo di verruche o condilomi, dovute ad una replicazione virale associata alla proliferazione di tutti gli strati epiteliali, ad eccezione di quello basale. Ciò dà origine alla tipica cito-architettura papillomatosa, osservabile istologicamente. Alcune cellule infettate si trasformano in coilociti di grandi dimensioni, poligonali, squamosi, con un nucleo contratto, situato all'interno di un vacuolo citoplasmatico. Tali manifestazioni sono, in genere, indotte da HPV6 e da HPV11 e non evolvono in cancro. Si tratta, generalmente, di lesioni asintomatiche che possono regredire spontaneamente in 3 ÷ 4 mesi, oppure persistere a lungo ed aumentare in numero e dimensioni (*Fig. 8*) (Burd, 2003).

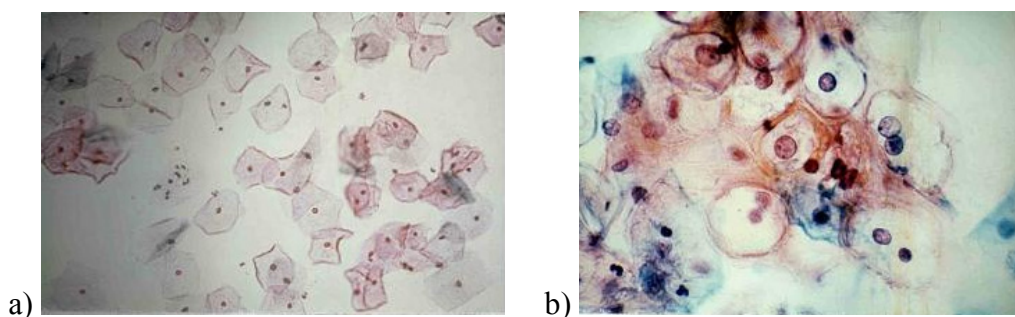


Fig. 8: Preparati citologici (Pap "smear" cervicale) di cheratinociti normali (a) ed alterati in coilociti a seguito di infezione da HPV (b).

In altri casi, si può instaurare un'infezione latente o inattiva, raramente sintomatica, caratterizzata da aree infette citologicamente normali in cui la replicazione virale è sincrona

con il ciclo cellulare ed avviene in un epitelio squamoso normale (Burd, 2003). Tale tipologia infettiva è indotta dagli HPV a basso rischio, come HPV6, HPV11 ed altri (zur Hausen, 2002). Infine, una minima percentuale di infezioni, definite attive, diviene persistente e dà inizio ad eventi di trasformazione a livello epiteliale (Moniz *et al.*, 2003).

I cambiamenti iniziali dell'epitelio cervicale, prima della vera e propria degenerazione neoplastica, sono classificati patologicamente (sulla base della progressiva acquisizione di una morfologia atipica delle cellule e dell'alterazione della citoarchitettura del tessuto) come neoplasie cervicali intraepiteliali (CIN), caratterizzate istologicamente da modificazioni displastiche, ossia dalla sostituzione di parte dell'epitelio con cellule indifferenziate (Bosch *et al.*, 1995).

Le CIN sono ulteriormente classificate in CIN1 (displasie di entità moderata), ovvero LSIL (lesioni squamose intraepiteliali di lieve entità), associate ad una replicazione virale ininterrotta e da un continuo rilascio di virioni, e CIN2 o CIN3, ovvero HSIL (lesioni squamose intraepiteliali severe), che rappresentano le vere e proprie lesioni che precedono il cancro cervicale (*Fig. 9*) (Richart, 1973).

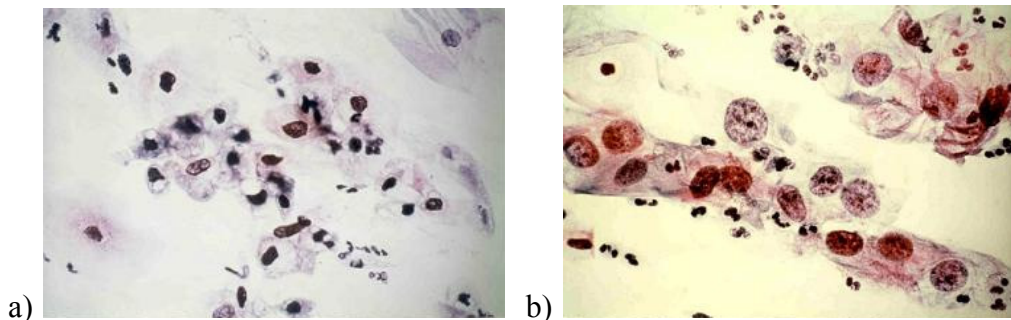


Fig. 9: Pap "smear" cervicale di lesione di tipo CIN 1 ovvero LSIL (displasia moderata) (a) e di tipo CIN 2/3 ovvero HSIL (displasia severa) (b).

La degenerazione neoplastica dell'infezione si verifica, generalmente, in un periodo di 10 ÷ 20 anni; alcune lesioni, invece, evolvono più rapidamente, in 1 o 2 anni (Burd, 2003). La progressione da CIN2/3 a carcinoma *in situ* (*Fig. 10*) è un evento che si realizza con un'elevata probabilità, ma richiede, frequentemente, l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite, insieme, dunque, alla delezione od inattivazione di E2, il repressore delle proteine E6 ed E7. Lo sviluppo di un carcinoma invasivo richiede ulteriori eventi scatenanti agevolati dall'inattivazione dei "guardiani" dell'integrità del genoma p53 e pRb come l'induzione di un'instabilità genomica e la soppressione dell'apoptosi (Howley, 1996).

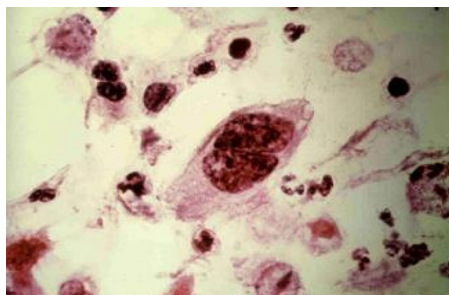


Fig. 10: Pap "smear" cervicale da carcinoma a cellule squamose.

1.2 LA TUMORIGENESI CERVICALE

1.2.1 L'INTEGRAZIONE DEL DNA DI HPV NEL GENOMA DELL'OSPITE

Il DNA di HPV può essere individuato sostanzialmente in tutti i tumori cervicali (99.7%) ed HPV16 rappresenta il tipo virale più comunemente riscontrato in essi (circa nel 50%), seguito da HPV18 (15%), da HPV45 (8%) e da HPV31 (5%). La restante parte di tumori cervicali contiene uno (o più di uno) dei dodici rimanenti tipi di HPV ad alto rischio. Questi dati stabiliscono con forza la relazione causale tra l'infezione da HPV ad alto rischio e lo sviluppo del cancro della cervice uterina (Walboomers *et al.* 1999) che rappresenta, infatti, il primo tumore maligno solido a riconosciuta eziologia virale.

D'altra parte, tuttavia, l'infezione da HPV, di per sé, è probabilmente insufficiente a determinare l'insorgenza del cancro, dato che essa rappresenta un evento comune in donne che spesso presentano comunque una citologia normale e che non svilupperanno mai un cancro cervicale (Lazcano-Ponce *et al.*, 2001; Liaw *et al.*, 2001).

Lo stato del DNA di HPV nella cellula ospite ha un ruolo fondamentale nell'eventuale progressione tumorale. Nelle lesioni benigne (verruche genitali) e nelle displasie leggere, il DNA di HPV generalmente non si integra nel genoma dell'ospite ed è presente principalmente in forma episomale; esso, dunque, esprime sia i geni precoci che quelli tardivi determinando un'infezione produttiva.

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

Il sito di integrazione del DNA di HPV nel genoma dell'ospite non sembra rappresentare un fattore significativo nell'innescare della tumorigenesi, sebbene di solito l'integrazione avvenga in corrispondenza di noti siti fragili (Kalantari *et al.*, 2001, Thornland *et al.*, 2000). D'altra parte sono stati mappati finora solo pochi siti di integrazione, per cui ulteriori studi potrebbero rivelare altre posizioni di integrazione sfruttate dal virus ed associate, ad esempio, con l'incremento del rischio di tumorigenesi o dell'aggressività di un tumore (Kalantari *et al.*, 2001, Lopez-Borges *et al.*, 1998).

Le cellule che contengono una forma integrata del DNA di HPV16 hanno un vantaggio selettivo nella crescita sulle cellule che contengono un DNA di HPV16 in forma episomale (Jeon *et al.*, 1995; Jeon & Lambert, 1995).

L'integrazione, infatti, interrompe il ciclo virale annullando l'attività dei geni E2 ed E1 che regolano la trascrizione virale ed il controllo della replicazione (Di Paolo *et al.*, 1993). Essa comporta l'apertura dell'episoma in corrispondenza della regione codificante di E2 con la delezione parziale di tale regione (zur Hausen, 2002) e, quindi, l'assenza o l'inattivazione del prodotto corrispondente (Baker *et al.*, 1987; Corden *et al.*, 1999) (Fig. 11). In queste condizioni i geni virali precoci E6 ed E7 sono espressi costitutivamente dalla regione di regolazione della trascrizione virale. Poiché, infatti, la proteina E2 regola la trascrizione delle proteine E6 ed E7, tale evento determina la deregolazione dell'espressione di queste due oncoproteine. Inoltre, la proteina E2 probabilmente ha anche un ruolo specifico, e non solo indiretto, nell'innescare della tumorigenesi cervicale (Desaintes *et al.*, 1997; Webster *et al.*, 2000).

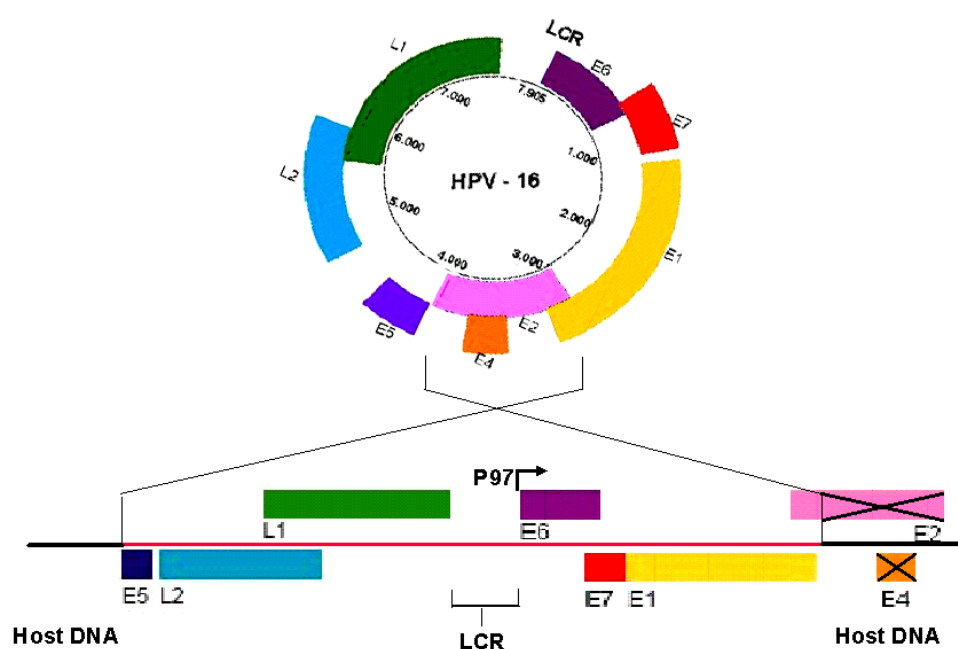


Fig. 11: Integrazione del DNA virale nel genoma dell'ospite.

La deregolazione dell'espressione delle oncoproteine E6 ed E7 determina la trasformazione cellulare e la cancerogenesi. Tali proteine sono espresse in tutti i tumori contenenti HPV e nelle linee cellulari da essi derivate e sono richieste per l'immortalizzazione e per il mantenimento di un fenotipo trasformato in un ampio spettro di tipi cellulari (Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Munger *et al.*, 2001; Viallet *et al.*, 1994; Yokoyama *et al.*, 1994).

Il potenziale oncogeno degli HPV è, come già annunciato, associato con l'espressione dei due geni virali precoci E6 ed E7 attraverso l'interazione con gli oncosoppressori p53 e pRb (Dell & Gaston, 2001). In particolare, E6 favorisce la rapida degradazione di p53, mentre E7 impedisce a pRb di esercitare un controllo negativo sulla crescita cellulare.

Le due oncoproteine sono inoltre responsabili dell'induzione di una marcata instabilità genomica; conseguentemente, nelle cellule infettate, si accumulano molecole di DNA danneggiato e non suscettibile di riparazione (Halbert *et al.*, 1991). A volte, si verificano mutazioni che agiscono sinergicamente nel determinare la definitiva trasformazione maligna delle cellule, alla quale contribuiscono, comunque, altri meccanismi, quali la metilazione del DNA virale e cellulare, l'attivazione delle telomerasi e l'azione di fattori ormonali ed immunogenici (Burd, 2003).

Lo sviluppo del tumore del collo dell'utero è, infine, imputabile alla capacità di HPV di indurre una sovra-regolazione o una de-regolazione di svariati geni. In particolare, sono repressi i geni implicati nel controllo della crescita cellulare, alcuni geni cheratinocito-specifici e quelli sensibili all'Interferone (INF) (Chang & Laimims, 2000).

1.2.2 CO-FATTORI NELLA CARCINOGENESI CERVICALE

Un'infezione persistente da HPV è il più significativo fattore di rischio per lo sviluppo del cancro della cervice uterina, insieme, tuttavia, a molteplici co-fattori, tra i quali, come già menzionato, un numero elevato di "partners" sessuali, infezioni da *Clamydia* o da HIV, condizioni di immunosoppressione, il fumo di sigaretta e l'azione degli ormoni steroidei progestinici ed estrogenici (Dell & Gaston, 2001).

La popolazione costituita da soggetti immunodepressi come quella rappresentata da pazienti sottoposte a trapianto di rene o affette da HIV, mostra alti titoli di infezione da HPV ed alti tassi d'incidenza di cancro cervicale (Dell & Gaston, 2001; Matorras *et al.*, 1991).

Anche il fumo sembra incrementare il rischio di sviluppare il cancro cervicale (Winkelstein, 1990). I prodotti intermedi del fumo di sigaretta si ritrovano nel muco cervicale di fumatrici attive e passive, e tali composti chimici possono contribuire alla persistenza del virus ed

incrementare il rischio di sviluppare il cancro esercitando un'azione mutagena sulle cellule dell'epitelio cervicale che determina una trasformazione maligna dei tessuti infettati, simile a quella osservata a livello polmonare (Sasson *et al.*, 1985). Si ritiene, inoltre, che il fumo sia un agente depletivo delle cellule di Langerhans (la popolazione di cellule presentanti l'antigene degli epiteli) della cervice uterina e che, dunque, possa indebolire l'immunità locale sviluppata contro l'infezione da HPV (Barton *et al.*, 1988; Roche & Crum, 1991).

Sebbene non vi siano evidenze circa l'incremento del rischio correlato con lo sviluppo del cancro cervicale attraverso l'assunzione di progesterone e/o estrogeni attraverso i contraccettivi orali, è noto che tali ormoni steroidei possono influenzare l'espressione dei geni di HPV-16 ed HPV-18 (Yuan *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000). Ad esempio il progesterone è in grado di interagire con sequenze regolatorie specifiche presenti nella regione non codificante, inducendo così la trascrizione dei geni virali di HPV (Chen *et al.*, 1996).

Inoltre, la maggior parte delle neoplasie cervicali originano in corrispondenza della giunzione squamo-colonnare, regione anatomica in cui l'epitelio squamoso dell'ecto-cervice è contiguo all'epitelio colonnare dell'endo-cervice nota, appunto, come "zona di trasformazione" e ritenuta particolarmente sensibile all'azione degli estrogeni e di alcuni loro metaboliti in grado di indurre danni al DNA e quindi di agire sinergicamente ad HPV nell'accumulo di mutazioni che conduce alla trasformazione neoplastica. (Elson *et al.*, 2000; Newfield *et al.*, 1998). Tale regione, è sede di una continua attività metaplastica, associata ad un alto rischio di infezione da HPV, più intensa nella pubertà e nel periodo di fertilità della donna ed in calo dopo la menopausa. Per questa ragione si osserva una minore incidenza di patologie indotte da HPV in donne di età avanzata, rispetto alle più giovani (Burk *et al.*, 1996).

Si possono, in alcuni casi, verificare infezioni da parte di diversi tipi di HPV contemporaneamente e la conseguente presenza di molteplici genotipi virali può determinare un aumento della gravità delle patologie indotte (Jacobs *et al.*, 1997).

Alcuni autori suggeriscono che la co-infezione con altri virus trasmessi per via sessuale possa agire da co-fattore nella carcinogenesi cervicale, contribuendo alla degenerazione neoplastica tramite propri oncogeni e fattori trasformanti. Studi di identificazione del Cytomegalovirus e degli Herpesvirus umani 6 e 7 in donne affette da anomalie citologiche cervicali indicano, tuttavia, che tali virus fungono da spettatori piuttosto che da veri e propri cofattori nello sviluppo del tumore del collo dell'utero (Chan *et al.*, 2001). Si è visto, invece, che la co-infezione con virus adeno-associati riduce il rischio di cancro della cervice uterina (Coker *et al.*, 2001). Il prodotto del gene Rep78 dell'adenovirus, infatti, impedisce la trascrizione degli

oncogeni E6 ed E7 di HPV 16 interferendo con il legame della “TATA binding protein” (TBP) al promotore p97 della regione non codificante di HPV (Su *et al.*, 2000).

E' stata proposta, inoltre, una correlazione tra la carica virale e la gravità delle patologie indotte. Studi effettuati tramite PCR quantitativa tipo-specifica hanno evidenziato che HPV 16 raggiunge una carica virale molto più alta rispetto agli altri tipi di papillomavirus (Swan *et al.*, 1999).

Il potere oncogeno di ciascuna tipologia di HPV è determinato, inoltre, dall'origine geografica del virus, che ne condiziona le proprietà chimiche e biologiche. In base a variazioni di sequenza delle regioni L1, L2 e regione non codificante di HPV16, sono stati identificati 5 “clusters” filogenetici: europeo (E), asiatico (As), asiatico-americano (AA), africano 1 (Af1) e africano 2 (Af2). A causa dell'incrementata attività trascrizionale e delle variazioni di sequenza negli elementi di risposta al progesterone, alcune varianti asiatico-americane sembrano avere un potere trasformante maggiore di quelle europee (Veress *et al.*, 1999). Un aumento dell'attività trascrizionale è osservabile, comunque, anche nelle varianti europee che possiedono mutazioni nella regione non codificante (Dong *et al.*, 1994); ad esempio, la variante NE, che presenta sostituzioni multiple all'interno della regione non codificante, è associata più frequentemente di altre con lo sviluppo di lesioni squamose intraepiteliali gravi (HSIL) e cancro cervicale. Il meccanismo di tale associazione non è noto, ma si ritiene che le mutazioni determinino un incremento dell'attività dei promotori, favorendo, così, la trascrizione del genoma virale (Burd, 2003).

E' stata anche dimostrata una predisposizione genetica allo sviluppo del cancro cervicale; infatti la suscettibilità all'infezione da HPV, la capacità di estirparla ed il tempo di sviluppo della malattia hanno carattere ereditario (Magnusson *et al.*, 2000).

1.2.3 L'ONCOPROTEINA E7

I geni E6 ed E7 di HPV codificano per piccole proteine a localizzazione nucleare (Greenfield *et al.*, 1991; Fujikawa *et al.*, 1994). La proteina E6 degli HPV ad alto rischio 16 e 18 interagisce principalmente con il prodotto del gene onco-soppressore p53 determinandone la degradazione attraverso la via dell'ubiquitina (Münger *et al.*, 1989; Hubbert *et al.*, 1992). La proteina E6 degli HPV a basso rischio 6 ed 11 non induce la degradazione di p53 e ciò correla con il loro scarso potere trasformante (Wernes *et al.*, 1990; Sedman *et al.*, 1991; Viallet *et al.*, 1994). L'assenza di una proteina p53 funzionale rende la cellula altamente suscettibile al

danno al DNA e impedisce l'innescamento del fenomeno apoptotico mediato, appunto, dal prodotto di questo gene onco-soppressore.

Il gene E6 di HPV16 ha due siti di "splicing" alternativo che determinano la produzione di due proteine aggiuntive chiamate E6*I e E6*II; tuttavia, solo la proteina E6 "full-length" ha la proprietà di interagire con p53 ed è quindi l'unica che abbia rilievo clinico.

La proteina E6 contiene 4 motivi Cys-X-X-Cys che formano strutture che legano lo zinco simili a quelle presenti in numerosi fattori di trascrizione (Barbosa *et al.*, 1989; Grossman & Laimins, 1989). Nonostante ciò non è stato ancora stabilito chiaramente un ruolo di E6 nella trascrizione dei geni di HPV.

Il gene E7 di HPV16 è espresso come una parte di un trascritto primario policistronico che contiene anche E6, e, sebbene la proteina E7 sia capace da sola di trasformare e immortalizzare cellule *in vitro* (Halbert *et al.*, 1991), essa richiede E6 per sviluppare al massimo il potenziale trasformante ed immortalizzante di HPV (Sedman *et al.*, 1991).

Il gene E7 di HPV codifica per una fosfoproteina acida (Münger *et al.*, 2001) multifunzionale di 98 aminoacidi, con un pM di circa 11 kDa (pM apparente 21 kDa), a localizzazione prevalentemente nucleare (Dell & Gaston, 2001). La divergenza tra il pM elettroforetico della proteina E7, rispetto a quello teorico, sembra attribuibile alla carica negativa della proteina, concentrata prevalentemente a livello della regione N-terminale, ricca di aminoacidi acidi (Armstrong & Roman, 1993).

Studi *in vitro* hanno identificato molteplici proprietà biologiche della proteina E7 di HPV16 che possono essere considerate implicate nell'estrinsecarsi delle sue funzioni *in vivo*. Molte di queste proprietà sono condivise con altre oncoproteine virali, in particolare con la proteina E1A di Adenovirus e con l'antigene T "large" di SV40 (TAg), con i quali E7 condivide un'estesa omologia di sequenza in alcune regioni che sono state correlate con le proprietà biologiche della proteina E7. Sulla base dell'omologia di sequenza all'interno degli Adenovirus e dei Poliomavirus e tra di essi, sono state individuate tre regioni conservate nella proteina E1A e in SV40 TAg, note come CR1, CR2, e CR3. La proteina E7 di HPV-16 può essere suddivisa in tre domini corrispondenti, che consistono, rispettivamente, degli aminoacidi 1-15 (CR1), 16-37 (CR2), e 38-98 (CR3). Ciascuno di essi contribuisce, in maniera diversa, a determinare i vari aspetti morfo-funzionali che caratterizzano l'oncoproteina (Fig. 12).

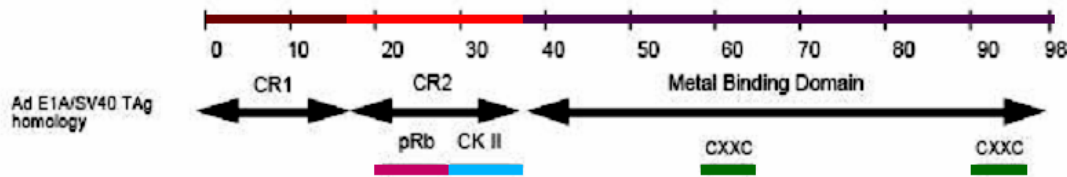


Fig. 12: Domini della proteina E7 e loro caratteristiche

- **dominio CR1:** ¹Met-His-Gly-Asp-Thr-Pro-Thr-Leu-His-¹⁰Glu-Tyr-Met-Leu-Asp-Leu¹⁵-
- **dominio CR2:** -¹⁶Gln-Pro-Glu-Thr-²⁰Thr-Asp-Leu-Tyr-Cys-Tyr-Glu-Gln-Leu-Asn-³⁰Asp-Ser-Ser-Glu-Glu-Glu-Asp-Glu³⁷-
viola: motivo legante pRb
azzurro: serine soggette a fosforilazione da parte della casein chinasi II (CKII).
- **dominio CR3:** -³⁸Ile-Asp-⁴⁰Gly-Pro-Ala-Gly-Gln-Ala-Glu-Pro-Asp-Arg-⁵⁰Ala-His-Tyr-Asn-Ile-Val-Thr-Phe-Cys-Cys-⁶⁰Lys-Cys-Asp-Ser-Thr-Leu-Arg-Leu-Cys-Val-⁷⁰Gln-Ser-Thr-His-Val-Asp-Ile-Arg-Thr-Leu-⁸⁰Glu-Asp-Leu-Leu-Met-Gly-Thr-Leu-Gly-Ile-⁹⁰Val-Cys-Pro-Ile-Cys-Ser-Gln-Lys-Pro⁹⁸
verde: motivi “zinc-finger”

L’omologia di sequenza tra E7 e E1A o SV40 TAg è sorprendentemente estesa nelle regioni CR1 e CR2 (Phelps *et al.*, 1988) e, funzionalmente, queste tre proteine condividono molte proprietà inclusa l’induzione dello stato di trasformazione in cooperazione con l’oncogene *ras*, l’induzione della sintesi del DNA, il controllo della trascrizione e l’associazione con la proteina del Retinoblastoma (pRB) (Dyson *et al.*, 1989), tutte funzioni imputabili alla regione CR2 (Phelps *et al.*, 1988).

La proteina E7 degli HPV oncogeni, agendo in concerto con E6, come anticipato, induce l’immortalizzazione e la trasformazione neoplastica delle cellule infettate (McIntyre *et al.*, 1996) favorendo la progressione del ciclo cellulare dallo stato di quiescenza della fase G1 a quello di intensa replicazione genomica della fase S.

Alcuni degli effetti esercitati da E7 sulla crescita delle cellule sono mediati dalla sua interazione con le cosiddette “pocket proteins”, una famiglia di proteine strettamente correlate, che regolano la proliferazione cellulare (Grana *et al.*, 1998).

I tre membri di tale famiglia, pRb, p107 e p130, condividono il possesso di un dominio conservato o “tasca di legame”, tramite il quale interagiscono con i fattori di trascrizione della famiglia E2F e con molteplici altre proteine. L’interazione di ciascuna “pocket protein” con un membro della famiglia E2F è regolata dalla reazione di fosforilazione catalizzata dalle chinasi ciclina-dipendenti (CDKs) (Sherr, 2000), enzimi con funzione regolatoria, attivati dal legame con proteine specifiche di ciascuna fase del ciclo cellulare, dette, appunto, cicline.

Normalmente, secondo questo sistema, nella forma ipofosforilata pRb è in grado di interagire con il fattore di trascrizione E2F, reprimendo l’espressione dei geni da esso controllati; quando la cellula progredisce verso la fase S del ciclo cellulare, l’iperfosforilazione di pRb, catalizzata dalla E-CDK2 e dalla D-CDK4 o dalla D-CDK6, induce il rilascio del fattore E2F e la conseguente attivazione dei geni da esso controllati (Dell & Gaston, 2001).

La proteina E7 controlla, appunto, il ciclo cellulare dell’ospite sostituendo il legame con il fattore di trascrizione E2F (Fig. 13) (Chellappan *et al.*, 1992).

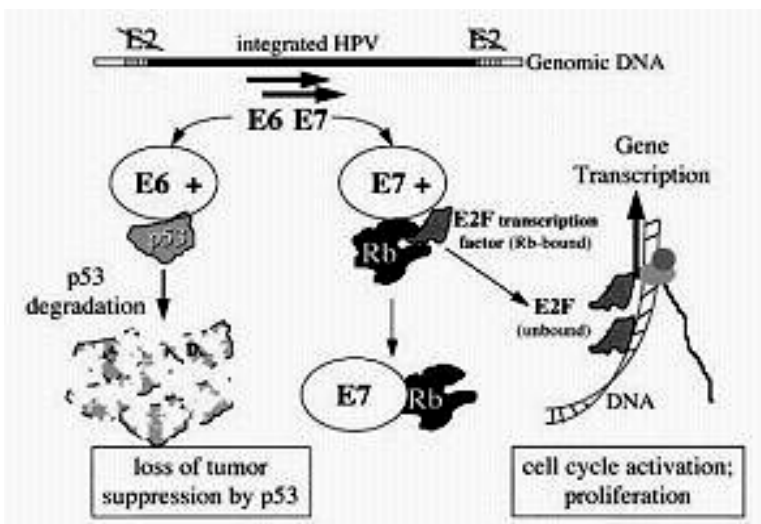


Fig. 13: Interazione E7-pRb: la proteina E7 lega pRb e porta al rilascio del fattore di trascrizione E2F che promuove, di conseguenza, la progressione del ciclo cellulare anche in assenza di stimoli di crescita o in presenza di segnali inibitori

Infatti, nonostante E7 ed E2F si leghino a siti separati all’interno della tasca della pRb, l’interazione con E7 provoca una modificazione allosterica dell’oncosoppressore, tale da determinare una riduzione dell’affinità di legame per il fattore E2F, che viene, conseguentemente, rilasciato.

Il rilascio del fattore E2F comporta uno stato di attivazione permanente dei geni da esso dipendenti e, quindi, una proliferazione cellulare incontrollata (Ruesch & Laimins, 1997) accompagnata da altri effetti. Si può verificare, infatti, un’anomala duplicazione dei centrosomi che induce instabilità genomica (Duensing *et al.*, 2000; Duensing *et al.*, 2001); alcune cellule possono, invece, andare incontro ad apoptosi.

La sequenza di 17 aminoacidi localizzata nella regione N-terminale in corrispondenza del dominio CR2 di E7 contiene un motivo conservato XLXCXE (aa 21-26), essenziale per il legame a pRb (Dyson *et al.*, 1989; Phelps *et al.*, 1988). Tali residui legano una regione di pRb corrispondente ai domini A e B che giace tra gli aminoacidi 379 e 772 di tale proteina (Welch *et al.*, 1995). Mutazioni nel motivo XLXCXE, specialmente sostituzioni di D₂₁, C₂₄ o E₂₆, determinano una perdita sostanziale dell'affinità per pRb (Heck *et al.*, 1992).

Nell'interazione E7/pRb, oltre al motivo XLXCXE, risultano coinvolte anche due lisine, appartenenti alla "pocket protein" e fiancheggianti la tasca di legame, che stabilizzano il complesso, mediante la formazione di legami ionici con i residui aminoacidici di E7 (Dick & Dyson, 2002).

Un'affinità di legame piena per pRb richiede, inoltre, il coinvolgimento di almeno una parte del dominio "zinc finger" di E7 contenente il motivo CXXC (Huang *et al.*, 1993; Patrick *et al.*, 1994). La proteina E7 è, inoltre, capace di indurre la degradazione di pRb da parte del proteasoma 26S, la cui subunità S4 interagisce con la regione conservata CR1 situata all'estremità N-terminale della proteina virale.

Gli effetti trasformanti di E7 non sono, tuttavia, imputabili unicamente all'inattivazione di pRb. Forme mutate dell'oncoproteina E7 nella regione C-terminale sono incapaci di promuovere la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S. Infatti, attraverso un motivo conservato, presente nella porzione C-terminale, E7 interagisce con l'inibitore p21, inattivandolo. Motivi conservati, localizzati nelle porzioni sia N- sia C-terminale di p21 sono responsabili dell'inibizione delle CDKs e dell'arresto del ciclo cellulare in fase G1 (Helt *et al.*, 2002).

Dunque, l'incontrollata proliferazione cellulare indotta da E7 si realizza attraverso un duplice meccanismo, che vede il coinvolgimento delle regioni N- e C-terminale dell'oncoproteina, necessarie, rispettivamente, per l'inattivazione di pRb e dell'inibitore p21.

Vi sono, inoltre, prove sperimentali della capacità dell'oncoproteina di alterare anche l'azione regolatrice degli altri membri della famiglia delle "pocket proteins", p107 e p130 (Gonzalez *et al.*, 2001). D'altra parte, la dimostrazione *in vitro* dell'esistenza di 18 ulteriori partners cellulari di E7, consente di definirla una proteina multifunzionale (Balsitis *et al.*, 2003).

La regione CR2 di E7 di HPV16 contiene anche 2 serine, substrato di fosforilazioni catalizzate dalla casein-chinasi II (CKII) (Barbosa *et al.*, 1990). Mutazioni che alterano o distruggono il motivo XLXCXE o inibiscono l'attività chinasi riducono drasticamente il potere trasformante di E7 (Edmonds & Vousden, 1989; Banks *et al.*, 1990; Firzloff *et al.*, 1991).

La regione C-terminale, corrispondente al dominio CR3, contiene due motivi CXXC che formano uno “zinc finger” che potrebbe non rappresentare la classica struttura in cui 2 elementi CXXC sono coordinati dallo stesso ione Zn^{2+} . Infatti, peptidi sintetici corrispondenti alla sequenza aminoacidica 67-98 e contenenti, dunque, un solo motivo CXXC, sono comunque in grado di legare uno ione Zn^{2+} . Inoltre, la distanza tra i due elementi CXXC appare troppo ampia per uno “zinc finger” classico (Barbosa *et al.*, 1989; Patrick *et al.*, 1992; Kang *et al.*, 1997).

La proteina E7 esiste principalmente come dimero e può formare complessi multimerici *in vivo*, dunque la regione “zinc finger” è ritenuta principalmente responsabile della dimerizzazione (Braspenning *et al.*, 1998; McIntyre *et al.*, 1993). Sono stati inoltre individuati specifici residui aminoacidici della regione C-terminale utili per la dimerizzazione e necessari per la multimerizzazione, come C58, C59, L67, C91 (Clemens *et al.*, 1995). Il dominio di legame metallico di E7 di HPV16, ed in particolare, l'integrità dei motivi CXXC, sono ritenuti importanti nel determinare il potere trasformante nonché immortalizzante della proteina.

Studi di immuno-fluorescenza ed “immuno-gold labelling” hanno dimostrato che la proteina E7 di HPV16 è localizzata nel nucleolo delle linee cellulari di carcinoma cervicale. Sebbene la sovra-espressione di E7 possa influenzare l'attività dei promotori cellulari (Phelps *et al.*, 1988; Armstrong & Roman, 1997), non c'è nessuna evidenza di un legame diretto di E7 con il DNA dell'ospite. D'altra parte tale proteina è, invece, capace di interagire con svariati fattori di trascrizione e quindi di modulare indirettamente l'espressione genica. Ad esempio, E7 interagisce con la regione C-terminale della “TATA binding protein” (TBP), un processo, questo, favorito dalla fosforilazione della proteina virale da parte della CKII (Massimi & Banks, 1997; Phillips & Vousden, 1997).

E7 è anche in grado di legarsi al fattore genico 3 stimolato dall'interferone (ISGF3), bloccando l'induzione dei geni responsivi all' $INF-\alpha$, che non può, quindi, esercitare la propria azione antivirale contro HPV. D'altra parte, però, questo meccanismo d'azione è comune anche alla proteina E7 degli HPV a basso rischio e dunque non correla con la tumorigenesi (Barnard & McMillan, 1999; Barnard *et al.*, 2000).

E7, inoltre, è capace di legarsi ai membri della famiglia di fattori di trascrizione AP1, alla quale appartengono c-Jun, JunB, JunD e c-Fos e tale interazione costituisce un elemento critico nell'innescare della degenerazione neoplastica (Antinore *et al.*, 1996; Nead *et al.*, 1998).

E7 è anche in grado di legare la proteina Mi2 β che fa parte del complesso di rimodellamento nucleare dell'istone deacetilasi e, quindi, di influenzare l'assetto della cromatina (Brehm *et al.*, 1999).

Bersaglio della oncoproteina virale è anche la proteina 3 legante il fattore di crescita insulino-simile (IGFBP-3), responsabile dell'inibizione della proliferazione delle cellule e dell'induzione di apoptosi; in seguito all'interazione con E7, va incontro a degradazione mediata dal proteasoma (Mannhardt *et al.*, 2000).

1.3 L'IMMUNITA' NATURALE CONTRO HPV

1.3.1 L'EVASIONE DEI MECCANISMI DI DIFESA DELL'OSPITE DA PARTE DEL VIRUS

La prima barriera difensiva opposta dall'ospite all'invasione da HPV è rappresentata dai componenti dell'immunità innata, cioè dagli epitelii, da numerose cellule circolanti, come i macrofagi, i leucociti neutrofili e le cellule "natural killers" (NK) e da svariate proteine plasmatiche, tra cui le citochine. Il superamento di tale barriera immunitaria e l'instaurarsi di un'infezione persistente rende altamente probabile la progressione verso una neoplasia cervicale (Ho *et al.*, 1995; Remmink *et al.*, 1995).

La causa per cui l'infezione da HPV diviene persistente in alcuni individui apparentemente immuno-competenti potrebbe essere dovuta ad un'incapacità specifica a sviluppare un'immunità virale, dovuta a fattori immunologici e/o genetici. Alcuni studi hanno, per esempio, rivelato che una forma allelica del gene p53 è più suscettibile delle altre alla degradazione del suo prodotto genico mediata da E6, rappresentando un significativo fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasie associate ad HPV (Storey *et al.*, 1998).

D'altra parte alcune infezioni riescono normalmente a sfuggire alla sorveglianza di un sistema immune attivo; dunque, le lesioni genitali da HPV potrebbero persistere perché di fatto non riconosciute come un pericolo dal sistema immune dell'ospite e, viceversa, potrebbero scomparire improvvisamente, presumibilmente perché tornano visibili al sistema immune. In alcune lesioni cervicali progressive, il sistema immune potrebbe non essere stimolato fin quando non sia avvenuta l'integrazione del DNA di HPV nel genoma o non si siano innescati altri eventi che contribuiscono all'iniziazione del processo di trasformazione maligna. Tuttavia, in tali condizioni, la rilevanza della risposta immune nella risoluzione di una lesione neoplastica risulta, ovviamente, compromessa (Matzinger, 1994).

L'evasione da parte del virus dei meccanismi di difesa dell'ospite potrebbe realizzarsi attraverso diverse modificazioni del sistema cellulare di presentazione antigenica, che potrebbero riguardare il processo di veicolazione dell'antigene al proteasoma, la soppressione dell'espressione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità e dei recettori delle cellule immunitarie, nonché attraverso la deregolazione dell'espressione di molecole inibitrici come il fattore di necrosi tumorale β (TNF- β) (zur Hausen, 2002).

Inoltre i cheratinociti trasformati da HPV potrebbero rilasciare citochine che sopprimono la risposta immune (Clerici *et al.*, 1997) o prodotti che inattivano citochine stimolatorie dell'immunità (Smith, 1996). D'altra parte tali cellule potrebbero diventare resistenti al "killing" esercitato dai CTL attraverso la sintesi di prodotti che inducono l'apoptosi di questi ultimi oppure interferiscono con il meccanismo citolitico.

A ciò si aggiunga che l'oncoproteina E7, come la maggior parte degli antigeni tumorali, è altamente tollerogena. La sua espressione all'interno delle cellule neoplastiche, in assenza di segnali di danno cellulare, impedisce la maturazione delle cellule dendritiche e, quindi, determina l'induzione di uno stato di tolleranza a livello dei precursori T linfocitari (Pardoll, 1998). È stato inoltre dimostrato che l'antigene tumorale E7, espresso sulla superficie dei cheratinociti trasformati da HPV, non induce l'attivazione delle cellule NK; essendo queste ultime responsabili non solo della lisi delle cellule tumorali, ma anche dell'attivazione dei linfociti T citotossici, la risposta immune dell'organismo risulta piuttosto debole (Routes *et al.*, 2000).

1.3.2 MECCANISMI DI DIFESA DELL'OSPITE CONTRO HPV

La maggior parte dei soggetti immuno-competenti infettati da HPV è in grado di eliminare l'infezione senza ulteriori conseguenze, e, anche nel caso di displasie cervicali *in situ* (specificatamente CIN3), le lesioni spesso regrediscono spontaneamente (circa nel 30% dei casi), specialmente nei soggetti più giovani e laddove la displasia è più lieve; anche la regressione delle verruche genitali è un evento comune (Luxton *et al.*, 1997).

La componente naturale dell'immunità cui è dovuta la "clearance" del virus nella maggior parte dei casi di infezione non è nota nel dettaglio, ma l'elevata frequenza di lesioni associate ad HPV in soggetti con un'immunità cellulo-mediata compromessa come i pazienti sottoposti a terapia anti-rigetto o infettati da HIV, suggerisce che, in condizioni normali, il sistema immune abbia, invece, un ruolo preciso nel controllare l'infezione da HPV (Schafer *et al.*, 1991; Altmann *et al.*, 1992; Laga *et al.*, 1992). In più, circa il 60% delle lesioni displastiche leggere HPV-positive, si risolve spontaneamente o poco dopo una biopsia locale, suggerendo

che l'induzione di infiammazione *in situ* può essere implicata nella regressione delle lesioni (Nasiell *et al.*, 1986).

Le risposte immunitarie possono essere suddivise nell'uomo in due categorie: quelle mediate dai linfociti cito-tossici effettori (CTL) e quelle mediate dai linfociti T-“Helper” (THL). I linfociti T-“Helper” stimolano differenti tipi di immunità, a seconda del “pattern” di citochine che essi stessi secernono, definendo risposte immuni di tipo cellulo-mediato (che coinvolgono, cioè, l'impiego di cellule del sistema immune), ossia Th1, oppure di tipo umorale (che implicano invece, la produzione di anticorpi), ossia Th2. I linfociti T-“Helper” di tipo 1 (Th1) secernono IFN- γ , “tumor necrosis factor” (TNF) ed interleuchina 2 (IL-2), importante per la generazione di risposte di ipersensibilità di tipo ritardato (DTH) e di cellule T citotossiche (CTL), mentre i linfociti T-“Helper” di tipo 2 (Th2) principalmente sostengono risposte anticorpali (in particolare IgG1, IgE ed IgA) attraverso la secrezione di IL-4 e IL-5.

Le cellule T-“Helper” differiscono anche per il tipo di risposta alle citochine, ad esempio la IL-12 promuove lo sviluppo di cellule di tipo Th1, mentre le cellule Th2 sono responsive alla IL-10 (Duggan-Keen *et al.*, 1998).

D'altra parte questa classificazione non è assoluta, in particolare nel sistema immune umano; inoltre una risposta immune efficace richiede la coordinazione di ambo i tipi di cellule Th1 e Th2 (Kelso, 1995; Allen & Maizels, 1997). E' comunque chiaro che i primi eventi implicati nella presentazione dell'antigene sono critici nel determinare l'innesco e l'efficacia di una risposta immune.

1.3.2.1 Attivazione dei meccanismi di risposta CTL contro HPV.

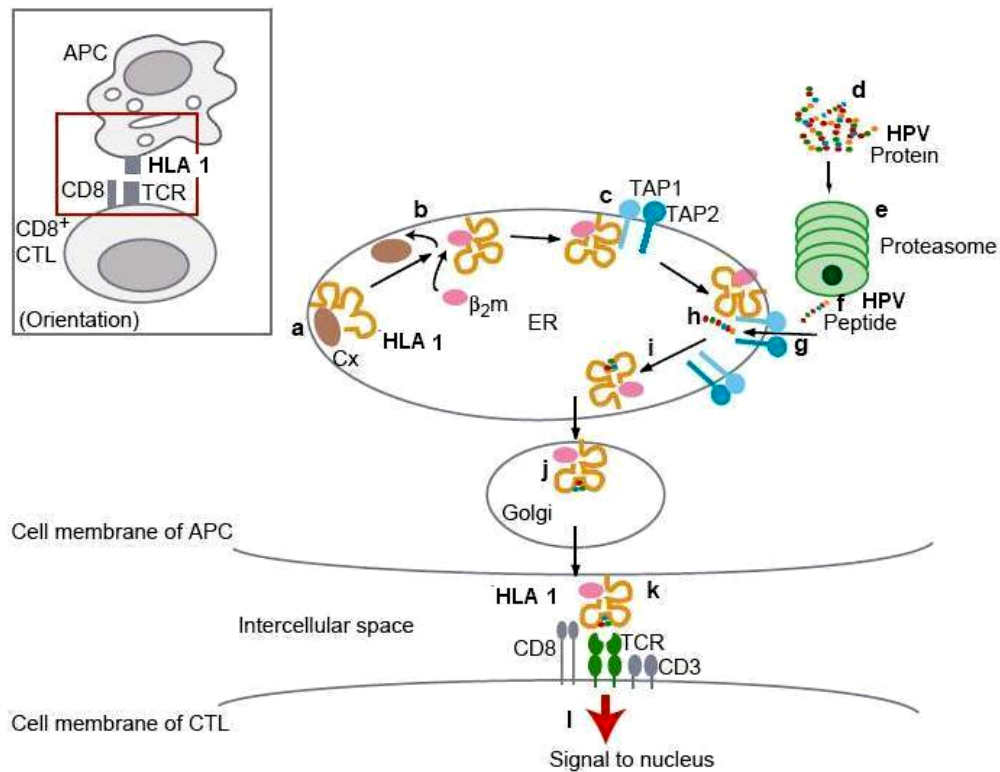


Fig. 14: Degradazione e processamento degli antigeni di HPV per l'attivazione dei CTL (adattata da Mann, 1998).

I CTL sono linfociti di tipo CD8⁺ (esprimono, cioè, il recettore CD8 sulla superficie cellulare) e svolgono un ruolo cruciale nella “clearance” delle cellule infettate da virus.

Gli antigeni di HPV presumibilmente sono riconosciuti sulla superficie delle cellule infettate dal virus in forma di piccoli peptidi legati alle molecole dell'antigene leucocitario umano di classe I (HLA-1) (corrispondente al complesso maggiore di istocompatibilità di classe I del topo). Tali antigeni, di solito della lunghezza di 8-10 aminoacidi, derivano dalla proteolisi delle proteine virali nella cellula infettata. Nel citoplasma dei cheratinociti trasformati da HPV (in cui il DNA virale è integrato nel genoma), infatti, per proteolisi attraverso la via del proteasoma, dalle oncoproteine E6 ed E7 costitutivamente espresse in tali cellule, vengono generati dei peptidi derivati, che sono trasportati nel reticolo endoplasmatico (RE) dove vengono legati da molecole HLA-1 di nuova sintesi.

Nel RE tali molecole sono normalmente legate alla calnexina (Cx), che le mantiene in uno stato parzialmente ripiegato. Il legame della molecola HLA-1 alla β₂ microglobulina (β₂m) determina il distacco della Cx e consente al complesso HLA-1/β₂m di legarsi al complesso TAP1-TAP2 che sovrintende al trasporto dei peptidi di HPV degradati dal citosol al RE dove legano il complesso HLA-1/β₂m che, quindi, rilascia le TAP. La molecola HLA-1 col suo

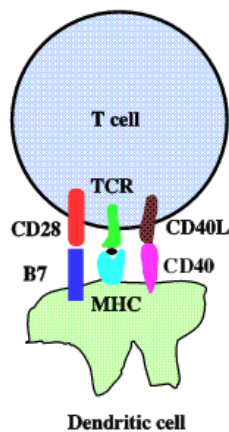
peptide migra attraverso l'apparato di Golgi sulla superficie cellulare dove avviene il riconoscimento del complesso HLA-1/peptide, così esposto, da parte di CTL che esprimono sulla membrana un recettore dell'appropriata specificità (Fig. 14). Gli eventi di traduzione del segnale, che si realizzano in seguito al riconoscimento, attivano le funzioni effettrici dei CTL.

In realtà, nelle cellule trasformate da HPV, frequentemente si riscontra la repressione delle molecole HLA-1 (Connor & Stern, 1990; Cromme *et al.*, 1994) e questo è un possibile e potente meccanismo attraverso cui il virus potrebbe evadere le risposte CTL.

Infatti, il virus fronteggia attivamente il sistema immune principalmente attraverso l'azione sinergica dell'oncogene E7, che interagisce con le proteine TAP, altera l'espressione delle molecole HLA-1 e reprime il promotore della catena pesante delle molecole HLA-1, con l'oncogene E5 che, come E7, è in grado di reprimere il promotore della catena pesante delle molecole HLA-1, di indurre la degradazione di questa e di inibire il trasporto delle molecole HLA-1 sulla superficie delle cellule infettate da HPV.

Inoltre, non è chiaro se i cheratinociti trasformati siano di per sé in grado di attivare direttamente CTL HPV-specifici, trattandosi di cellule con scarse proprietà di presentazione dell'antigene. Più verosimilmente tale sistema di attivazione dei CTL è innescato da cellule presentanti l'antigene professioniste (APC).

Co-stimulatory molecules



Pur essendo, infatti, le molecole HLA-1 espresse sulla superficie di tutte le cellule nucleate, l'attivazione dei CTL richiede il riconoscimento di tali antigeni estranei sulla superficie di APC professioniste (come macrofagi, linfociti B attivati o, principalmente, cellule dendritiche) che non solo esprimono elevati livelli di HLA-1 e 2, ma sono anche abili processatrici di antigeni e ricche di molecole co-stimolatorie come B7, importanti per l'attivazione delle cellule T e citotossiche (Fig. 15).

Le APC sono elementi critici nell'induzione di una risposta immune cellulo-mediata.

Fig. 15: Molecole co-stimolatorie presenti sulla superficie delle cellule DC (APC professioniste) ed interazione con i loro recettori sulla superficie di linfociti T-helper o citotossici.

Tra queste, le cellule dendritiche (DC) hanno la precipua capacità di stimolare linfociti T-“Helper” vergini e cellule citotossiche, e di indurre le prime risposte immunitarie. Le DC immature derivano da precursori emopoietici e sono strategicamente localizzate negli epiteli (e

quindi su tutta la superficie dell'organismo) e negli spazi interstiziali di molti tessuti. In queste località, le DC sono specificamente intese a catturare antigeni e a produrre estese quantità di complessi antigene-HLA. In presenza di stimoli che ne inducono la maturazione, come citochine infiammatorie o l'interazione con il recettore CD40, le DC incrementano l'espressione di molecole co-stimolatorie, differenziandosi terminalmente, migrano negli organi linfoidi secondari dove selezionano e stimolano cellule T antigene-specifiche divenendone potentissimi attivatori (*Fig. 16*) (Steinman, 1991; Austyn, 1996; Cella *et al.*, 1997, Liu, 2001).

Le cellule T stesse, stimulate dal riconoscimento di antigeni, possono influenzare il tipo di risposta immune attraverso l'interazione con i residui CD40 espressi sulla superficie delle cellule dendritiche che, così attivate, possono allora stimolare direttamente CTL (van Kooten & Banchereau, 1997).

Per queste ragioni, molte strategie vaccinali terapeutiche si basano sul "targeting" dell'antigene d'interesse verso APC professioniste come le DC, con l'obiettivo di incrementare il processamento dell'antigene e la presentazione di questo sulla loro superficie e, in ultima analisi, di amplificare la risposta immune mediata dalle cellule T.

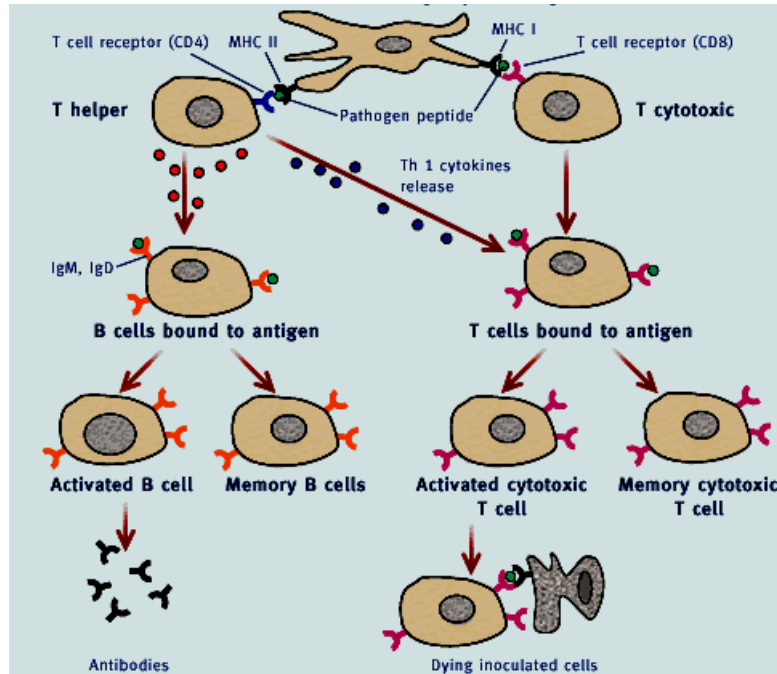


Fig. 16: Attività di attivazione delle DC nei confronti delle cellule T.

1.3.2.2 Attivazione dei meccanismi di risposta THL contro HPV.

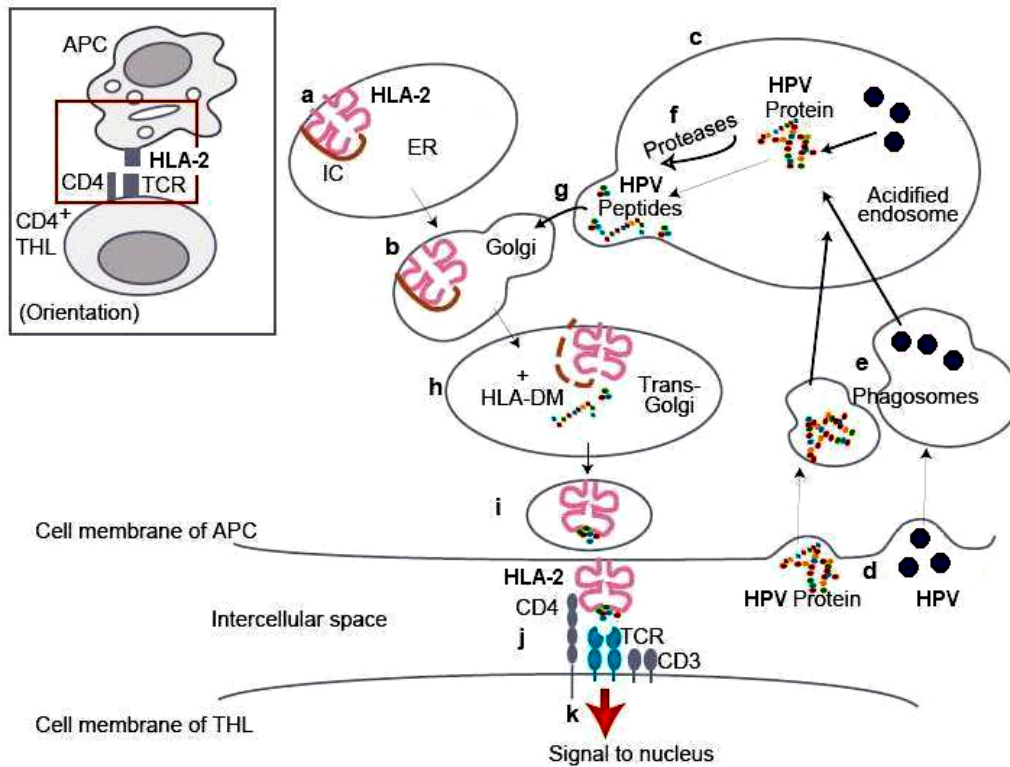


Fig. 17: Processamento degli antigeni 'esogeni' di HPV per la presentazione ai THL secondo la via HLA-2 (adattata da Mann, 1998).

I THL sono linfociti di tipo CD4⁺; essi probabilmente riconoscono i virioni o gli antigeni di HPV al momento dell'infezione primaria (e quindi all'ingresso del virus nell'organismo), oppure rilasciati nell'ambiente extra-cellulare conseguentemente alla morte dei cheratinociti infetti (a seguito del danno cellulare e/o tissutale causato, ad esempio, da un trauma o dall'intervento chirurgico), oppure che siano stati acquisiti per endocitosi da APC residenti e, poi, da queste ultime esposti.

Nel RE di una APC, le molecole HLA-2 appena sintetizzate vengono legate dalla catena invariabile (IC), un peptide che ne impedisce il legame con altri peptidi presenti nel RE e ne consente il trasporto attraverso l'apparato di Golgi fino ai fagosomi ed agli endosomi dove gli antigeni di HPV o i virioni interi acquisiti nelle vescicole endocitotiche dall'ambiente extra-cellulare vengono incapsulati, e dove avviene la degradazione in frammenti peptidici (generalmente di 11-13 aminoacidi) ad opera di proteasi. La fusione di tali endosomi con le vescicole provenienti dall'apparato di Golgi e contenenti le molecole HLA-2, consentono il legame dei peptidi a tali molecole. Il complesso HLA-2/peptide viene quindi trasportato sulla superficie cellulare della APC per il riconoscimento attraverso il "T-cell receptor" (TCR) di linfociti T-helper (THL) e per l'attivazione del "pathway" di segnalazione intracellulare (Fig.

17) I THL, così attivati, differenziano nella sottopopolazione Th2, e, mediante la secrezione di citochine, quali IL-4, IL-10 e IL-13, stimolano i linfociti B, con cui interagiscono, a differenziare in plasmacellule secernenti anticorpi.

Alcuni studi suggeriscono che questo meccanismo possa essere attivo anche allo stadio di carcinoma e di H-SIL dove si osservano linfociti infiltranti (tra i quali potenziali APC) e che, essendo le L-SIL e l'infezione da HPV in generale caratterizzate dall'assenza di infiammazione locale e di morte cellulare, il sistema HLA-2 possa essere meno efficiente nella presentazione di antigeni derivanti da cheratinociti appena infettati che non in quelli già trasformati da HPV.

Nonostante sia data questa classificazione che associa i peptidi virali captati esogenamente con la risposta THL ed i peptidi virali prodotti endogenamente con la risposta CTL, le cellule T CD4+ possono riconoscere attraverso il sistema HLA-2 di presentazione anche peptidi di HPV processati per via "endogena" e non captati dall'esterno (Jaraquemada *et al.*, 1990; Nuchtern *et al.*, 1990). Allo stesso modo cellule T di tipo CD8+ possono riconoscere peptidi di HPV presentati "esogenamente" da APC attraverso il sistema HLA-1 (Carbone & Bevan, 1990; Speidel, 1997). Perciò è possibile che gli antigeni di HPV vengano presentati anche attraverso "pathways" alternativi crociati.

1.3.2.3 La risposta immune contro gli antigeni di HPV.

La risposta immune cellulo-mediata contro HPV interviene nella regressione delle lesioni genitali associate all'infezione, a livello delle quali sono stati, infatti, individuati infiltrati cellulari mononucleati, rappresentati da linfociti T CD4+ e macrofagi la cui consistenza aumenta nel tempo durante la guarigione (Coleman *et al.*, 1994); cellule Th1 infiammatorie, macrofagi e cellule NK sono stati inoltre individuati nelle biopsie di lesioni genitali provenienti da pazienti responsivi alla terapia con IFN- γ e IFN- α 2 (Arany & Tyring, 1996).

Linfociti T citotossici effettori (CTLs) specifici contro HPV16 sono stati riscontrati, oltre che negli infiltrati cellulari, dove sono predominanti, nel sangue periferico di pazienti affette da CIN/SIL e cancro cervicale (Ressing *et al.*, 1996).

In pazienti affetti da CIN, da infezioni persistenti da HPV, oppure da carcinoma cervicale è stato osservato il rilascio di IL-2 (una delle principali citochine associate con lo sviluppo di una risposta immune cellulo-mediata anti-virale insieme all'IFN- γ) che viene mantenuto dai pazienti che si rivelano in grado di liberarsi dell'infezione anche nel corso del "follow up"

anche se tale risposta diminuisce nel tempo una volta avvenuta la “clearance” del virus (de Gruijl *et al.*, 1998).

Le risposte di tipo Th1 sviluppate nei confronti di E7 probabilmente generano CTL E7-specifici che potrebbero rappresentare un meccanismo efficace nel l’eliminazione delle lesioni cervicali, assumendo che altri fattori, come citochine locali, espressione di molecole HLA o molecole accessorie, si trovino in uno stato opportuno.

In particolare, uno studio ha dimostrato l’esistenza di un’associazione tra la risposta CTL specifica per E6 ed E7 e la “clearance” del virus. Si è osservato, inoltre, che, in seguito a reiterate esposizioni al virus, potrebbe instaurarsi un’immunità protettiva, come dimostrato dalla resistenza all’infezione di donne sessualmente attive in alcuni studi. L’esistenza di una memoria immunitaria è stata anche suggerita da studi sperimentali, che hanno permesso di osservare, in pazienti con un secondo episodio infettivo, la subitanea comparsa di CTLs contro E6 ed E7 e di anticorpi virus-specifici (Nakagawa *et al.*, 2002).

Tuttavia, non esiste una relazione chiara tra la risposta immune ad E7 e la prognosi clinica della patologia. Ad esempio, in pazienti trattati affetti da CIN, la proliferazione linfocitaria osservata in risposta ad E6 ed E7, si è dimostrata predittiva della conseguente “clearance” dal DNA del virus. Al contrario in pazienti non trattati si è riscontrata una associazione tra la risposta Th (misurata come rilascio di IL-2) e la persistenza virale e lo sviluppo di HSIL. Inoltre, in alcuni pazienti che hanno eliminato l’infezione, le consistenti risposte osservate nel periodo della “clearance” virale, sono, successivamente, decadute nel breve periodo (de Gruijl *et al.*, 1998).

L’immunità cellulo-mediata osservata in pazienti in grado o meno di risolvere l’infezione o affetti da lesioni progressive o in risoluzione, potrebbe dunque essere semplicemente un effetto di raggiungimento della soglia della carica virale, oppure una fase della naturale risoluzione o progressione della patologia.

Come già accennato, i CTL vengono generati di conseguenza alla presentazione di peptidi immunogeni da parte degli antigeni HLA di classe I sulla superficie di cellule presentanti l’antigene professioniste come le cellule dendritiche, e generalmente richiedono un sostegno di tipo Th1. Sono stati identificati epitopi di E7 candidati alla presentazione da parte dei più comuni alleli HLA. Alcuni fra questi elicitano CTL peptide-specifici attivi contro cellule tumorali esprimenti il peptide presentato.

Resing e collaboratori hanno, infatti, dimostrato che peptidi derivanti da HPV16-E7, capaci di legare HLA-A*0201 (la più diffusa forma allelica del gene HLA di classe I nella

popolazione Caucasica), sono in grado di indurre CTL peptide-specifici *in vitro* a partire da donatori sani. Alcuni tra questi CTL sono capaci di riconoscere linee cellulari derivate da carcinoma cervicale; ciò suggerisce che almeno alcuni dei CTL stimolati *in vitro* siano in grado di riconoscere anche epitopi di HPV processati naturalmente. Lo stesso studio è stato esteso anche a pazienti affetti da CIN3 o cancro cervicale, ed ha dimostrato che gli stessi peptidi sono riconosciuti da cellule T di sangue periferico o isolati da biopsie di cancro cervicale (Ressing *et al.*, 1996).

Risposte di tipo T-helper contro E7 di HPV16 sono riscontrate anche in pazienti affetti da CIN ma meno frequentemente in pazienti affetti da cancro cervicale, probabilmente a causa del fallimento nella corretta presentazione di E7 per il sostegno ed il mantenimento delle cellule T E7-specifiche o per via di “impasse” di tipo genetico (Kadishh *et al.*, 1997; Luxton *et al.*, 1997). Tuttavia studi immuno-istochimici hanno riscontrato anche allo stadio di carcinoma, la presenza di CTL infiltranti.

Nonostante, infatti, nella cervice uterina la presenza delle cellule di Langerhans correli inversamente con la severità della patologia associata ad HPV (la deplezione di queste APC professioniste, infatti, può determinare il mancato innesco della reazione immunitaria o di una risposta inappropriata), anche nel cancro cervicale possono essere individuati linfociti infiltranti e CTL derivati dai linfonodi locali con specificità per E7 di HPV16 (Moniz *et al.* 2003).

Vi sono evidenze di produzione di anticorpi contro E7 in pazienti affetti da CIN ma anche in pazienti affetti da infezioni fluttuanti o persistenti da HPV 16. Risposte serologiche consistenti si ritrovano anche nel 25-50% dei pazienti affetti da cancro cervicale. D'altra parte è difficile immaginare come tali anticorpi possano avere un ruolo nella risoluzione di un'infezione ormai stabilita. E' più probabile che essi si sviluppino come effetto dell'esposizione prolungata al virus e dell'incremento della carica virale. (Moniz *et al.* 2003)

Risposte T helper efficaci contro L1 emergono ai primi stadi dell'infezione, quando la sintesi delle proteine virali tardive si realizza come parte del processo di produzione di virioni infettivi. Di conseguenza, non è sorprendente che anticorpi specifici contro L1 vengano riscontrati meno frequentemente in pazienti con carcinomi invasivi, laddove HPV è di solito integrato, e la capacità di produrre particelle virali è ormai perduta (Nonnenmacher *et al.*, 1995).

Tuttavia, risposte ad L1 possono essere sostenute dal sistema immune anche in presenza di CIN progressive, a causa della continua produzione di virus che si realizza in queste

condizioni. Risposte T-helper contro L1 presentata come peptide o in forma di VLP sono state individuate in pazienti affetti da CIN attraverso saggi di proliferazione e di rilascio di IL-2 *in vitro*, ma tali risposte non vengono ritrovate con la stessa frequenza in pazienti con HSIL (Shepherd *et al.*, 1996).

Saggi sierologici condotti utilizzando VLP, indicano che una frazione elevata di soggetti esposti ad HPV, che abbiano sviluppato o no lesioni cervicali, produce anticorpi sistemici contro L1 e/o L2 (Kirnbauer *et al.*, 1993; de Gruijl *et al.*, 1997).

Inoltre, IgA contro le proteine capsidiche sono riscontrabili nelle secrezioni cervicali. Tali risposte anticorpali dipendenti dalle cellule T helper non sono predittive di “clearance” dell’infezione, infatti non tutti gli anticorpi contro epitopi conformazionali potrebbero essere neutralizzanti, per ciò un “pattern” individuato di anticorpi contro L1 può non correlare con l’efficacia dell’eliminazione di HPV (Wang *et al.*, 1996; Leiserowitz *et al.*, 1997).

1.4 PROGETTAZIONE DI UN VACCINO: ANTIGENI “TARGET” PER LA PROFILASSI O LA TERAPIA

Tanto un vaccino profilattico quanto uno terapeutico avrebbero un ruolo nel trattamento delle lesioni associate ad HPV.

Le prime evidenze che le proteine di HPV fossero immunogeniche nell’uomo sono derivate proprio dall’individuazione di risposte anticorpali HPV-specifiche. Considerato il ciclo vitale di HPV, i principali candidati per un vaccino profilattico o terapeutico sono rispettivamente le proteine precoci L1 ed L2 o i prodotti tardivi E6 ed E7.

Un vaccino profilattico avrebbe il fine di prevenire l’infezione da HPV generando una risposta immunitaria efficace al sito ed al momento dell’infezione stessa, impedendo la cronicizzazione, la recidiva o la re-infezione. Un immunogeno di tipo profilattico dovrebbe avere una conformazione tale da indurre anticorpi neutralizzanti in grado di riconoscere le particelle virali e di legarle, impedendone la diffusione durante l’infezione naturale e dovrebbe dunque essere basato sulle proteine del capsido virale. Inoltre, l’induzione della sorveglianza cellulo-mediata delle cellule infettate dal virus sarebbe importante nella definitiva risoluzione dell’infezione. Di tale vaccino potrebbero beneficiare soggetti ad alto rischio di esposizione ad HPV. Per i tipi di HPV associati alle neoplasie cervicali, la popolazione ideale sarebbe rappresentata dalle giovani donne all’inizio dell’attività sessuale, poiché è in questo gruppo che è stata riscontrata la più alta prevalenza di infezioni da HPV.

Poiché non vengono prodotte particelle virali nelle lesioni cervicali, laddove il DNA di HPV è integrato nel genoma dell'ospite, l'induzione di immunità contro le proteine del capsido di HPV non sarebbe efficace nella terapia di queste. Nelle lesioni neoplastiche si realizza, piuttosto, l'espressione costitutiva delle oncoproteine E6 ed E7, richieste per l'induzione e per il mantenimento dello stato di trasformazione e del fenotipo neoplastico del tessuto infettato da HPV (Von Knedel Doeberitz *et al.*, 1994). Esse, dunque, rappresentano i principali antigeni tumore-specifici contro cui indirizzare la risposta immunitaria (Chen *et al.*, 1991) nella realizzazione di vaccini terapeutici. Infatti, è improbabile che le cellule tumorali tentino di evadere la risposta immune attraverso strategie di "antigen loss". Inoltre, a differenza di molti altri antigeni tumorali che derivano da proteine selvatiche o rappresentano versioni mutate di queste ultime, E6 ed E7 sono antigeni completamente estranei e dunque, potenzialmente in grado di contenere epitopi più antigenici.

I vaccini terapeutici contro HPV, la cui finalità è quella di stimolare il sistema immunitario dell'ospite a riconoscere le proteine virali espresse sulle cellule infettate o già trasformate, eviterebbero lo sviluppo di lesioni nuove ed eliminerebbero quelle ormai stabilite, potendo essere destinati al trattamento sia di manifestazioni displastiche o condilomatose, indotte dai tipi di HPV a basso rischio, sia di lesioni cancerose, conseguenti alla degenerazione maligna di infezioni ormai radicate, oppure potrebbero essere usati, di fatto, come adiuvanti ai trattamenti convenzionali (farmacologici, chirurgici e/o radio-chemioterapici) (Da Silva *et al.*, 2001).

Si conosce relativamente poco sull'immunogenicità degli altri prodotti virali di HPV nell'uomo, sebbene anche la proteina E2, espressa durante l'infezione virale attiva, possa rappresentare un "target" auspicabile per il trattamento terapeutico di L-SIL. Risposte cellulomediata E2-specifiche sono, infatti, riscontrate frequentemente in donne con storia di infezione o con infezioni in corso da HPV (Bontkes *et al.*, 1999).

1.4.1 VACCINI PREVENTIVI ANTI-HPV

L'immunogenicità degli HPV implica la presentazione al sistema immunitario di epitopi conformazionali localizzati sull'involucro capsidico. Pertanto, le proteine strutturali L1 e L2 rappresentano i principali "target" antigenici della risposta immunitaria umorale. Vaccini basati su tali molecole di superficie possono essere somministrati con la finalità di ostacolare la penetrazione e la diffusione virali nelle cellule epiteliali (Da Silva *et al.*, 2001).

Sono state sviluppate diverse tipologie di vaccini preventivi e vi sono incoraggianti risultati ottenuti in sperimentazioni pre-cliniche e cliniche.

Una tipologia di vaccini preventivi rivelatasi notevolmente efficace nel contrastare l'infezione da HPV è basata sulla capacità di autoassemblamento della proteina capsidica L1, da sola o insieme a L2, e sulla conseguente formazione di VLP (Schiller, 1999), che riproducono morfologicamente i virioni, possiedono gli epitopi conformazionali richiesti per l'induzione di anticorpi neutralizzanti, ma mancando del genoma virale forniscono garanzie di sicurezza in quanto non infettive e non oncogeniche (Kirnbauer *et al.*, 1993; Breitburd & Coursaget, 1999).

La vaccinazione con VLPs basate sulla proteina L1 di alcuni HPV specie-specifici (od anche sui soli capsomeri pentamerici ottenuti in uno studio di fusione della proteina L1 con l'enzima glutatione S-transferasi), ha determinato in modelli animali la neutralizzazione del virus e la protezione dallo sviluppo di lesioni associate all'infezione (Breitburd *et al.*, 1995; Suzich *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 2001).

Un'efficace prevenzione dalla trasmissione sessuale degli HPV genitali, richiede, tuttavia, la presenza di alti livelli di anticorpi specifici nella mucosa (Da Silva *et al.*, 2001). Alcuni studi hanno evidenziato che l'immunizzazione sistemica di scimmie con VLPs di HPV11 è seguita dalla comparsa di IgG nel siero e nelle secrezioni mucosali genitali, ma non di IgA (Lowe *et al.*, 1997). Invece, in modelli murini, la somministrazione intranasale di VLPs di HPV16 ha indotto la produzione massiva di entrambe le classi anticorpali nella saliva e nelle secrezioni genitali (Balmelli *et al.*, 1998). Le vie di somministrazione mucosale sono in genere più potenti elicitatrici di risposte immunitarie mucosali rispetto alle vie di somministrazione parenterali, anche se l'uso di adiuvanti (come l'enterotossina termo-labile di *E. coli* o la tossina colerica) è spesso richiesto. Le VLP ottenute in seguito ad espressione della proteina L1 in un ceppo di *Salmonella typhimurium*, sono state somministrate a topi per via orale o intranasale, inducendo la produzione di anticorpi specifici anti-L1 (Nardelli-Haesliger *et al.*, 1999). Inoltre, la somministrazione orale di VLP di L1 di HPV16 e 18 in formulazioni contenenti un derivato della l'enterotossina termo-labile di *E. coli* hanno incrementato il livello delle risposte anticorpali nel sangue periferico e nelle secrezioni mucosali dei topi immunizzati (Gerber *et al.*, 2001).

La vaccinazione con VLP è in grado di stimolare l'immunità cellulo-mediata, oltre quella umorale. Risposte T CD8⁺ sono state, ad esempio, evidenziate in topi in seguito alla somministrazione di VLP basate sulla proteina L1 di HPV 16 (Dupuy *et al.*, 1997).

Le VLP di HPV 16 e 18, inoltre, si sono dimostrate capaci di indurre la maturazione fenotipica di cellule dendritiche derivanti dal midollo osseo o da sangue periferico (Lenz *et al.*, 2001; Rudolf *et al.*, 2001).

Trials clinici di fase I e II hanno consentito di valutare la sicurezza delle VLPs basate su L1 e L1/L2 e l'efficacia della loro azione profilattica nei confronti dell'infezione da HPV. In volontarie sane, VLPs basate su L1 e somministrate per via intramuscolare, sono state ben tollerate ed hanno indotto una forte risposta immunitaria umorale (Harro *et al.*, 2001).

Più recenti sperimentazioni cliniche di fase II, condotte sempre su volontarie sane e sempre con VLPs basate su L1, hanno indotto non soltanto una marcata risposta umorale, ma anche una massiva proliferazione dei linfociti T CD4⁺ e T CD8⁺; è stato anche ipotizzato che gli anticorpi neutralizzanti, generati in seguito alla prima vaccinazione, abbiano incrementato la risposta T cellulare alle vaccinazioni successive (Pinto *et al.*, 2003). Un numero di 2392 donne di età compresa tra i 16 ed i 23 anni, prive di anomalie citologiche cervicali, è stato coinvolto in un trial clinico di fase III, volto a valutare l'efficacia preventiva di VLP basate sulla proteina L1 di HPV16. Il vaccino, formulato con alluminio quale adiuvante e somministrato per via intramuscolare, ha mostrato un'efficacia pari al 100% non essendosi presentato nessun caso di infezione da HPV16 nel gruppo di pazienti immunizzati. Non sono stati osservati effetti collaterali notevoli, ad eccezione di dolenza nel sito di iniezione. Resta ancora da determinare la durata della risposta anticorpale e quindi l'efficacia a lungo termine di tale trattamento preventivo (Koutsky *et al.*, 2002).

Nonostante gli studi preclinici abbiano generalmente evidenziato i vantaggi della somministrazione non parenterale dei vaccini preventivi, i più recenti trials clinici hanno dimostrato l'efficacia di una immunizzazione sistemica nel prevenire l'infezione della mucosa genitale da parte di HPV.

E' attualmente in corso un trial clinico di fase III (e, dunque, volto a stabilire l'efficacia della strategia di immunizzazione) su un vaccino profilattico tetravalente contro gli HPV di tipo 6, 11, 16, 18. In una di queste sperimentazioni, finanziata da Merck & Co., i cui risultati sono stati recentemente pubblicati, 1158 donne sane, con storia clinica di Pap smear normali e di età compresa tra i 16 ed i 23 anni, sono state reclutate in Brasile, Europa e Stati Uniti, ed immunizzate per via intra-muscolare con diverse formulazioni di una miscela di VLP ricombinanti (purificate da *Saccharomyces cerevisiae* ed adsorbite su un adiuvante a base di idrossifosfato di alluminio) dei succitati quattro diversi tipi di HPV, e sottoposte a "follow up ginecologico". A 30 mesi dalla vaccinazione, è stata osservata, rispetto ai gruppi di controllo, una riduzione dell'incidenza combinata di infezioni persistenti da HPV6, 11, 16 e 18 e delle lesioni genitali ad essi associate pari al 95 % e risposte anticorpali sieriche sostenute già a partire dalla formulazione contenente le dosi più basse di VLP (Villa *et al.*, 2005).

Nonostante i promettenti risultati, in ogni caso, i benefici di vaccini preventivi contro l'infezione da papillomavirus, in termini di riduzione dell'incidenza di cancro cervicale, saranno valutabili solo a lungo termine. Inoltre, sebbene la produzione di anticorpi neutralizzanti rappresenti un efficace sistema di prevenzione dell'infezione virale e della sua diffusione sistemica, la sorveglianza cellulo-mediata resta la chiave di volta nella definitiva risoluzione dell'infezione e della malattia. L'obiettivo che si cerca in questo momento di perseguire è, dunque, la realizzazione di vaccini terapeutici, indispensabili soprattutto nei paesi in via di sviluppo.

1.4.2 VACCINI TERAPEUTICI ANTI-HPV

Lo sviluppo di vaccini terapeutici efficaci, generalmente basati su E7 (meglio nota nei suoi aspetti immunologici rispetto a E6) è reso difficoltoso dalle caratteristiche di tollerogenicità della oncoproteina (Tindle, 2002). Infatti, l'espressione di E7 nelle cellule trasformate non è accompagnata dalle manifestazioni flogistiche o citolitiche (associate generalmente alle infezioni virali o batteriche). Di conseguenza, la proteina è captata da APC non stimolate da citochine infiammatorie e, quindi, non esprime i segnali costimolatori indispensabili per la completa attivazione dell'immunità T cellulare (Pardoll, 1998). Il contesto non infiammatorio in cui si attua il riconoscimento di E7 da parte del sistema immunitario è cioè sufficiente ad indurre tolleranza periferica. Questo meccanismo, necessario in condizioni fisiologiche per prevenire risposte auto-immuni è sfruttato dalle cellule tumorali per indurre il silenziamento immunologico dei propri antigeni (Tindle, 2002).

L'efficacia di un vaccino anticancro è legata, di conseguenza, alla capacità di interrompere lo stato di tolleranza periferica delle cellule T nei confronti degli antigeni tumorali.

Per la terapia delle neoplasie HPV-indotte, è necessario, pertanto, sviluppare vaccini basati sul potenziamento dell'immunogenicità dell'antigene tumorale di interesse, ottenuto attraverso l'induzione di manifestazioni simil-infiammatorie capaci di fornire al sistema immunitario i segnali co-stimolatori necessari per la completa attivazione delle cellule T (Tindle, 2002). A tale scopo, sono state attuate diverse strategie.

Vaccini basati su peptidi

Essi sono basati su peptidi derivati da proteine tumorali, generalmente formulati in associazione a sostanze adiuvanti di varia natura che, incrementando il potere immunogeno delle molecole antigeniche ed inducendo la produzione di segnali immunostimolatori,

risvegliano il sistema immunitario dell'ospite dal suo stato di non responsività, ripristinandone la reattività nei confronti degli antigeni tumorali. Ne sono esempi l' 'Aduvante Completo' e l' 'Aduvante Incompleto' di Freund, costituiti da un'emulsione acqua/olio, rispettivamente in presenza o in assenza di micobatteri. L'adjuvante AS02B contiene invece saponine naturali e derivati lipidici, sempre in emulsione acqua/olio.

Ciò che ha aperto la strada allo sviluppo di vaccini peptidici anti-HPV è stata la identificazione di un ampio numero di epitopi T helper e T citotossici, peptidi immunogenici che si legano alle molecole HLA-1 e 2 ed, essendo riconosciuti dai recettori dei linfociti T, possono potenziare la risposta immune verso un particolare antigene virale (Da Silva *et al.*, 2001). In effetti, in modelli murini, l'immunizzazione con un peptide derivante da E7 e contenente un epitopo T CD8⁺ ha indotto l'attivazione di CTL, che proteggono dai tumori indotti da HPV (Feltkamp *et al.*, 1995).

In un altro studio, la vaccinazione con un peptide di E7 di 35 aminoacidi (aa 43-77), contenente sia un epitopo CTL sia un epitopo T helper e formulato in associazione all'adjuvante incompleto di Freund, ha indotto una risposta T citotossica molto più energica rispetto a quella osservabile in seguito alla vaccinazione con il solo epitopo CTL (aa 49-57). Probabilmente il peptide più lungo determina la stimolazione dei linfociti T helper, da cui dipende la completa attivazione dei linfociti T citotossici; in secondo luogo, tale peptide, proprio in virtù delle sue dimensioni, è preferenzialmente endocitato, processato ed esposto sulla superficie delle APC professionali. Inoltre, la co-somministrazione del peptide con l'oligodesossinucleotide CpG ha determinato, in modelli murini, l'eradicazione di tumori HPV-indotti (Zwaveling *et al.*, 2002).

L'immunogenicità *in vivo* di peptidi antigenici legantisi all'antigene leucocitario umano A*0201 (HLA-A*0201) è stata dimostrata in topi transgenici per tale molecola umana di classe I ed ha aperto la strada a trials clinici di fase I e II; diciannove malate terminali di cancro cervicale sono state immunizzate con dosi crescenti di un peptide di E7, contenente un epitopo T citotossico HLA-A*0201-ristretto, in combinazione con un epitopo T helper universale: solo in quattro di loro è stata riscontrata regressione tumorale (van Driel *et al.*, 1999). L'analisi di campioni di sangue periferico, prelevati da quindici pazienti, coinvolte nello stesso studio, ha rivelato il coinvolgimento di una risposta immune cellulo-mediata, sostenuta da linfociti T helper, ma non T citotossici (Ressing *et al.*, 2000).

L'efficacia terapeutica di un peptide di 9 aminoacidi (aa 12-20) appartenente a E7, formulato in emulsione con l'adjuvante incompleto di Freund e somministrato da solo o in combinazione con un altro peptide di 8 aminoacidi (aa 86-93) della stessa oncoproteina, a sua volta legato

covalentemente ad un epitopo T helper, è stata dimostrata in una sperimentazione clinica condotta su diciotto pazienti affette da neoplasia cervicale avanzata: tre di loro hanno manifestato una regressione tumorale totale, mentre in altre sei si è verificato solo un miglioramento parziale delle lesioni cancerose (Muderspach *et al.*, 2000).

I risultati ottenuti da queste e da altre sperimentazioni cliniche consentono di affermare che i vaccini peptidici sono più efficaci in donne in cui la manifestazione neoplastica è in fase iniziale e meno in quelle immunocompromesse, in cui la cui neoplasia è avanzata e refrattaria ad altri tipi di trattamento.

Vaccini a proteine intere.

Un'altra tipologia di vaccini terapeutici contro le lesioni HPV-indotte impiega proteine intere, che includono tutti gli epitopi potenzialmente immunogenici per ogni possibile aplotipo, eliminando così la restrizione HLA, che limita notevolmente l'impiego dei vaccini peptidici.

Le proteine virali purificate sono in grado di indurre la produzione sia di anticorpi sia di linfociti T, helper e citotossici. Il potenziamento della risposta immune richiede, tuttavia, l'impiego di adiuvanti e l'effettuazione di immunizzazioni ripetute, a causa della rapida degradazione delle proteine somministrate.

Generalmente, l'antigene tumorale d'elezione, su cui sono basati i vaccini proteici anti-HPV, è la proteina E7, la quale, però, a causa del suo ridotto potere immunogeno, è, nella maggior parte dei casi, co-somministrata con adiuvanti o impiegata in forma di proteina di fusione.

L'oligodesossinucleotide CpG, capace di attivare le cellule B, i monociti e le cellule "natural killer" (NK) e di indurre la secrezione di citochine da parte dei linfociti Th1, è stato incluso nella formulazione di un vaccino basato sulla proteina E7; in seguito ad iniezione sottocutanea in modelli murini, è stata riscontrata una risposta immune cellulo-mediata specifica che ha indotto sia protezione dallo sviluppo neoplastico sia arresto della progressione tumorale (Kim *et al.*, 2002).

Particolarmente efficace nella regressione di tumori indotti in modelli murini si è dimostrato un vaccino basato sulla proteina E7 fusa alla proteina "heat shock" 65 (Hsp65) di *Mycobacterium bovis* (Chu *et al.*, 2000).

Molto recente è, poi, l'utilizzo di una proteina di fusione costituita dalle estremità N-terminali di E6 (120 aa) e di E7 (60 aa). La vaccinazione in modelli murini ha indotto l'eradicazione del tumore ed una condizione di protezione prolungata (Zhou *et al.*, 2004).

La vaccinazione di topi con la proteina di fusione L2-E6-E7 ha avuto effetti protettivi nei confronti dello sviluppo neoplastico, cui si sono aggiunti anche quelli terapeutici, in seguito a

cosomministrazione con adiuvanti (Da Silva *et al.*, 2001). La sicurezza e l'immunogenicità di tale vaccino sono state, poi, valutate in trials clinici di fase I, condotti su quaranta volontarie sane; in seguito a somministrazione intramuscolare, in assenza di adiuvanti, è stata indotta sia la produzione di anticorpi IgG, sia una risposta cellulo-mediata specifica per E6 ed E7 (de Jong *et al.*, 2002).

Virus o batteri ricombinanti vivi.

Un'altra strategia per l'immunoterapia anti-cancro è la vaccinazione con virus o batteri ricombinanti vivi, esprimenti l'antigene tumorale. L'efficacia è dovuta all'alta efficienza di trascrizione e di espressione genica. I due vettori virali più comunemente utilizzati sono il vaccinia virus e l'adenovirus.

Il vaccinia è un virus litico e, di conseguenza, la possibilità di integrazione del DNA virale nel genoma dell'ospite è ridotta (Da Silva *et al.*, 2001).

Sono stati progettati e realizzati vaccinia virus ricombinanti esprimenti gli antigeni E6 ed E7 modificati; essi hanno manifestato effetti protettivi nei confronti dello sviluppo neoplastico, in diversi modelli (Chen *et al.*, 1991). E' stata inoltre sperimentata, in modelli murini, l'efficacia di tali vettori virali recanti il gene di E7 fuso con una sequenza segnale e con il gene della proteina di membrana 1 associata al lisosoma (LAMP-1), che indirizza E7 verso la via di processazione di classe 2; un vaccino così costituito ha indotto in modelli murini la regressione di piccoli tumori esprimenti l'antigene E7 di HPV16 (Lin *et al.*, 1996). In sperimentazioni cliniche di fase I e II, vaccinia virus ricombinanti esprimenti versioni modificate dei geni E6 ed E7 di HPV16 e 18 sono stati somministrati a donne affette da cancro cervicale ed hanno determinato l'induzione di una risposta immune sia T citotossica sia anticorpale (Kaufmann *et al.*, 2002).

I vettori adenovirali hanno il vantaggio, rispetto ai precedenti, di non causare effetti collaterali indesiderati, associati con la replicazione nelle cellule di mammifero poiché possono essere ingegnerizzati in modo da perdere la capacità replicativa (Da Silva *et al.*, 2001).

L'inoculo sottocutaneo di un vettore adenovirale codificante una proteina di fusione, E7-CD40, ha generato, in topi, una risposta T CD8⁺ contro cellule cancerose esprimenti l'oncoproteina (Zhang *et al.*, 2003).

Inconveniente non trascurabile, associato all'impiego di tali presidi vaccinali, è la stimolazione, nelle cellule ospiti, di una risposta immune umorale e cellulo-mediata contro le proteine adenovirali, che impedisce l'effettuazione di somministrazioni ripetute (Da Silva *et al.*, 2001). Il problema può essere risolto utilizzando un altro vettore virale simile all'adenovirus o tipi di adenovirus non specifici per l'uomo.

I vettori batterici sono rappresentati, generalmente, da microrganismi attenuati, che conservano il potere immunogeno, ma non quello patogeno. I batteri possono essere sia impiegati come “carriers” di vettori di espressione eucariotici, codificanti l’antigene tumorale, sia essere trasformati con un vettore di espressione procariotico, che consenta la produzione della proteina direttamente all’interno del microorganismo. La risposta immunitaria indotta contro l’antigene eterologo, espresso da vettori batterici ricombinanti, è spesso sia umorale che cellulo-mediata (Da Silva *et al.*, 2001). Ciò è stato, ad esempio, evidenziato in seguito a somministrazione in topi di ceppi di *Salmonella* esprimenti le proteine E6 ed E7 (Krul *et al.*, 1996) o di due ceppi ricombinanti di *Lysteria monocytogenes*, capaci di esprimere e secernere la proteina E7 rispettivamente da sola e fusa ad una listeriolisina O non emolitica (Gunn *et al.*, 2001).

Vaccini a cellule dendritiche

Vaccini terapeutici potenzialmente efficaci in quanto dotati di intrinseche proprietà adjuvanti sono basati sull’impiego di cellule dendritiche, espianate dai pazienti, “pulsate” *in vitro* con proteine purificate o con peptidi derivati da antigeni tumorali noti, e, successivamente, reintrodotti nel donatore, per indurre, contro le cellule neoplastiche, una risposta T specifica. Infatti, le cellule dendritiche, essendo APC professioniste, sono di per se stesse dotate dei segnali co-stimolatori necessari per la completa attivazione dei linfociti T (Da Silva *et al.*, 2001).

Alcuni studi hanno evidenziato che cellule dendritiche di donatrici sane o affette da cancro cervicale possono essere “pulsate” con la proteina E7, inducendo *in vitro* l’attivazione di linfociti T autologhi contro di essa (Murakami *et al.*, 1999).

Nel corso di trials clinici di fase II, quindici pazienti con neoplasia cervicale avanzata sono state trattate con cellule dendritiche “pulsate” con la proteina E7: la vaccinazione è stata ben tollerata ed ha indotto, in quattro delle pazienti testate, una risposta cellulo-mediata (Ferrara *et al.*, 2003).

Santin e collaboratori hanno anche dimostrato che DC pulsate con E7 possono indurre risposte proliferative E7-specifiche di tipo CD4 e sostenute risposte CTL in grado di lisare cellule tumorali autologhe in pazienti affette da carcinoma cervicale (Santin *et al.*, 1999).

Vaccini cellulari

Altri vaccini sono, infine, costituiti da cellule tumorali isolate da pazienti, modificate geneticamente e reintrodotti nei pazienti stessi come vaccino.

La modificazione genetica è, generalmente, rappresentata dalla trasfezione delle cellule tumorali con geni capaci di conferire loro potere immunogeno, come ad esempio, con geni codificanti citochine o molecole costimolatorie.

Cellule di melanoma ingegnerizzate per esprimere l'antigene E7 e GM-CSF, IL-2 o CD40 si sono dimostrate capaci di indurre una risposta immune e protezione anti-tumorale mediata dai linfociti T CD4⁺ e TCD8⁺ nei confronti di tumori indotti (Chang *et al.*, 2000).

La vaccinazione di topi con cellule tumorali allogenicche esprimenti le proteine E6 ed E7 e trasfettate con i geni dell'IL2 e dell'IL-12 ha indotto l'attivazione di CTLs specifici e di una risposta immune protettiva (Bubenik *et al.*, 1999; Hallez *et al.*, 1999).

VLP chimeriche

VLP, che incorporano proteine virali non strutturali, come E6 ed E7, o peptidi da esse derivati, costituiscono un altro approccio promettente per lo sviluppo di vaccini combinati ad azione profilattica e terapeutica nei confronti dell'infezione da HPV e delle patologie associate. Infatti, oltre ad indurre una risposta immune umorale protettiva, le VLPs chimeriche permettono il riconoscimento da parte dei linfociti T del/degli antigene/i tumorale/iad esse fusi (Da Silva *et al.*, 2001) in quanto li incapsulano al loro interno all'atto dell'autoassemblaggio (Breitburd & Coursaget, 1999).

Le VLP chimeriche di HPV16 si sono, inoltre, dimostrate capaci di interagire ad alta affinità con APC come le cellule dendritiche, macrofagi e linfociti B. L'incubazione di cellule dendritiche immature con tali VLP ha indotto la sovra-espressione di molecole MHCI e MHCII e di altri fattori costimolatori. Cellule dendritiche pulsate con VLP basate sulla proteina L1 e sulla proteina di fusione L2-E7 sono risultate capaci di stimolare una risposta immune cellulo-mediata specifica per peptidi derivanti da E7 (Rudolf *et al.*, 2001).

Vantaggiosa è anche la produzione di VLP chimeriche che incorporano DNA plasmidico e che, a seguito della somministrazione, lo introducono nelle cellule ospiti consentendo l'espressione del gene veicolato (Kawana *et al.*, 1998). Anche questi pseudovirioni costituiscono un vaccino ad azione sia profilattica sia terapeutica, in quanto la porzione capsidica fornisce gli epitopi capaci di stimolare la produzione di anticorpi, mentre il DNA codifica l'antigene o gli antigeni che attivano la risposta immune cellulare.

Un problema potenziale, associato all'impiego di VLP, quali "carriers" di proteine o geni virali, è l'effetto che su di esse può avere una risposta immune umorale contro le proteine capsidiche, se l'individuo vaccinato possiede preesistenti anticorpi contro HPV-16 (Da Silva *et al.*, 2001).

Per una visione di insieme sui principali vaccini terapeutici anti-HPV in “trial” clinico, si rimanda alla *Tabella 4* sottostante.

Delivery system	Antigen	Disease group	Immunogenicity	Clinical outcome	Refs
Fusion protein (TA-CIN, Xenova)	HPV16 L2-E6-E7 fusion protein (no adjuvant)	Healthy volunteers	Antibody, T-cell proliferation, IFN- γ ELISPOT all detected	Double-blind placebo-controlled trial No HPV infections	74
HSP fusion protein (HSP-E7, Stressgen)	HPV16 E7	Genital warts	N.D.	Regression of warts: 3/14 CRs and 10/14 PRs. Warts not HPV16* Open-label uncontrolled trial	75
Encapsulated polynucleotide (ZYC101, Zycos)	HPV16 E7 peptide	Anal dysplasia Cervical dysplasia	Most individuals ELISPOT positive Induction of E2-specific immunity	HPV16* by selection Open-label uncontrolled trials Regression of AIN: 3/12 PRs Regression of CIN: 5/15 CRs	76,77
Protein/Iscomatrix adjuvant (E6E7-IMX, CSL)	HPV16 E6-E7 fusion protein	CIN	Antibody, DTH, CTLs	HPV-type-specific reduction in HPV infection: 7/14 CRs and 7/14 PRs/no clinical regression Randomized placebo-controlled trial	86
Vaccinia virus (TA-HPV, Xenova)	E6-E7 fusion protein	Cervical cancer	CTLs (1/8), antibody (3/8)	Outcome not documented Open-label uncontrolled trial	78
Vaccinia virus (TA-HPV, Xenova)	E6-E7 fusion protein	Vulval HPV/VIN	Antibody, CMI (13/18)	50% reduction in disease in 8/18 Loss of viral load in 12/18 Open-label uncontrolled trial	79
Vaccinia virus (TA-HPV, Xenova)	E6-E7 fusion protein	VIN	T helper cell ELISPOT increase (6/10) Vaccinia response in all subjects	>50% reduction in disease in 5/12 Open-label uncontrolled trial	80
Peptide/oil + water adjuvant	E7 peptides	Cervical cancer	No CTL response	HPV16* by selection Outcome 2/17 SD Open-label uncontrolled trial	81
Protein/algammulin adjuvant	E7-GST fusion protein	Cervical cancer	Antibody, DTH	No alteration in natural history of disease. Open-label uncontrolled trial	82
Peptide + IFA	E7 A0201 peptide	VIN/CIN	CTLs 10/16, no DTH	HPV16* by selection 3/18 CRs and 6/18 PRs Open-label uncontrolled trial	83
Dendritic cells	HPV16 E7 and HPV18 E7	Cervical cancer	Antibody, proliferation, ELISPOT (3/11)	No objective clinical response Open-label uncontrolled trial	85

AIN, anal intraepithelial neoplasia; CIN, cervical intraepithelial neoplasia; CMI, cell-mediated immunity; CR, complete response; CTL, cytotoxic T lymphocyte; DTH, delayed-type hypersensitivity; E, early; ELISPOT, enzyme-linked immunospot; GST, glutathione S-transferase; HPV, human papillomavirus; HSP, heat-shock protein; IFA, incomplete freund's adjuvant; IFN- γ , interferon- γ ; L, late; N.D., not determined; PR, partial response; SD, stable disease; TA, therapeutic antigen; VIN, vulval intraepithelial neoplasia; VLP, virus-like particle.

Tabella 4

74. De Jong et al. (2002).
75. Goldstone et al. (2002).
76. Klencke et al. (2002).
77. Sheets et al. (2003).
78. Borysiewicz et al. (1996).
79. Davidson et al. (2003).
80. Baldwin et al. (2003).
81. Van Driel et al. (1999).
82. Frazer et al. (1999).
83. Muderspach et al. (2000).
85. Ferrara et al. (2003).

1.4.3 VACCINI TERAPEUTICI A DNA CONTRO HPV

1.4.3.1 Le vaccinazioni genetiche

La vaccinazione a DNA rappresenta un approccio particolarmente interessante per l'immunoterapia delle lesioni associate all'infezione da HPV.

La strategia che sottende l'uso dell'immunizzazione genetica è semplice: la somministrazione di DNA plasmidico codificante per un antigene d'interesse elicitata nell'ospite un'efficiente espressione e presentazione di questo da parte delle cellule trasfettate con il DNA plasmidico ed è in grado di promuovere efficaci risposte immuni umorali e cellule-mediate contro l'antigene indirizzandolo direttamente alle APC che, di conseguenza, possono stimolare cellule T di tipo CD4+ o CD8+. Tra l'altro, l'uso di vaccini a DNA per generare risposte cellulari T CD8+ antigene-specifiche nel trattamento del cancro è stato ampiamente investigato (Chen *et al.*, 1998; Restifo *et al.*, 2000).

A differenza di altri vettori, i plasmidi nudi di DNA possono essere facilmente progettati grazie alle tecnologie del DNA ricombinante e preparati su larga scala in forma altamente purificata. Essi offrono, inoltre, garanzie di sicurezza, essendo incapaci di provocare l'infezione, in quanto privi dei geni necessari alla replicazione del patogeno (Weiner & Kennedy, 1999) e possono essere usati per somministrazioni ripetute. In più, il DNA è altamente stabile, molto più delle proteine e degli altri polimeri biologici, ed ha la proprietà di mantenersi a lungo in forma episomale consentendo l'espressione dell'antigene immunizzante per un ampio periodo di tempo con incremento della memoria immunologica (Gurunathan *et al.*, 2000).

I plasmidi, inoltre, potendo essere ingegnerizzati in modo da inglobare geni appartenenti a diverse varianti di un patogeno, sono potenzialmente capaci di fornire immunità contemporaneamente contro più ceppi (Weiner & Kennedy, 1999). Si può ottenere anche la realizzazione di vaccini a DNA poliepitopici, cioè costituiti da diversi 'minigeni', codificanti singoli epitopi, legati in un unico costrutto. Tale approccio può essere estremamente vantaggioso poiché una combinazione di epitopi antigenici può generare una risposta immune più ampia rispetto ad un solo antigene. Infatti i vaccini costituiti da epitopi minimi essenziali funzionano anche quando sono multipli ossia quando gli epitopi codificati sono legati in sequenza in una sorta di vaccino 'a collana di perle'. Un approccio di questo tipo sarebbe funzionale anche allo sviluppo di un vaccino multivalente, ossia contro vari agenti patogeni.

Molteplici strategie sono, inoltre, attualmente in uso per ottimizzare i vettori per l'immunizzazione a DNA, inclusa la manipolazione degli elementi regolatori, l'ottimizzazione

dei codoni del transgene per migliorarne i livelli di traduzione, la co-espressione con molecole co-stimolatorie o citochine per la modulazione positiva della risposta immune (Gurunathan *et al.*, 2000), l'uso di segnali di localizzazione o di secrezione (Lewis *et al.*, 1997; Boyle *et al.*, 1997; Rice *et al.*, 1999), la fusione con ligandi per dirigere l'antigene in siti appropriati per la modulazione della risposta immune (Deliyannis *et al.*, 2000; Hung *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001; You *et al.*, 2001).

Sebbene la vaccinazione a DNA sia in grado di elicitare di per sè potenti risposte sia umorali che cellulo-mediate, per alcuni antigeni, la risposta immune da essi generata non sembra sia sufficiente a conferire una protezione efficace. In questi casi possono essere applicati regimi di vaccinazione che prevedono richiami al vaccino a DNA effettuati con la proteina di interesse (la stessa clonata nel vettore) o con un peptide ricombinante da essa derivato (Gurunathan *et al.*, 2000).

Inoltre sarebbe auspicabile lo sviluppo di sistemi di espressione in cui il prodotto genico sia espresso nel tessuto specifico che rappresenta il target della vaccinazione o in una popolazione cellulare, come quella rappresentata dalle DC, che sia critica per lo sviluppo di una risposta immune a seguito della vaccinazione

Caratteristiche del DNA plasmidico usato per le vaccinazioni genetiche.

Il DNA plasmidico utilizzato nelle vaccinazioni genetiche comprende l'antigene d'interesse clonato all'interno di un vettore ingegnerizzato per ottimizzarne l'espressione in cellule eucariotiche.

Un promotore forte è richiesto per una espressione efficiente del gene codificato in un vaccino a DNA in cellule di mammifero. Per questa ragione sono spesso utilizzati promotori derivati da virus come il cytomegalovirus (CMV) o il virus SV40 che, in generale, sono in grado di determinare una maggiore espressione genica ed i più alti livelli di risposte proliferative di cellule T antigene-specifiche *in vivo*, riflettendo la maggiore attività trascrizionale di tali promotori rispetto ad altri promotori eucariotici (Garmory *et al.*, 2003).

Le sequenze fiancheggianti il codone di inizio AUG del messaggero possono influenzare il suo riconoscimento da parte del ribosoma eucariotico. In particolare, la sequenza definita 'di Kozac' ($^{-6}\text{GCCA/GCCAUGG}^{+4}$), ha un ruolo importante nel determinare una traduzione efficiente di molti geni eucariotici e per questo è spesso inserita a monte del gene d'interesse nella preparazione dei costrutti genetici. I geni procariotici o virali ed alcuni geni eucariotici non possiedono, infatti, la sequenza di Kozac, ed il suo impiego può incrementare l'efficienza

di traduzione e, quindi, il livello di espressione di tali geni nelle vaccinazioni genetiche (Kozac, 1987; Kozac, 1997).

I costrutti per le vaccinazioni genetiche possiedono, in genere, anche sequenze palindromi non metilate contenenti oligonucleotidi citidina-fosfato-guanidinici (CpG-ODN) che sono in grado di attivare una risposta immune di tipo antigene-indipendente.

I motivi CpG sono presenti nel DNA batterico ed il loro riconoscimento come potenti molecole stimolatorie da parte del sistema immune ha un ruolo chiave nella difesa dell'ospite attraverso l'attivazione delle cellule B per la produzione di anticorpi, la stimolazione di cellule secernenti citochine e l'innescamento della risposta immune innata. La loro identificazione si è rivelata di profondo interesse per lo sviluppo di terapie immunologiche di nuova generazione.

I motivi CpG, attraverso il recettore "Toll-like 9" localizzato sulla superficie delle cellule dendritiche plasmacitoidi, infatti, stimolano le APC alla secrezione di citochine quali IL-6 e IL-12, TNF- α , IFN- α , IFN- γ che possono polarizzare la risposta cellulo-mediata in senso Th1, attivare cellule NK e stimolare cellule B alla proliferazione e alla secrezione di anticorpi. I motivi CpG hanno dimostrato di possedere proprietà adjuvanti quando somministrati con peptidi e VLP di HPV, e, allo stesso modo, possono incrementare l'immunogenicità dei vaccini anti-HPV a DNA (Krieg *et al.*, 1995; Klinman *et al.*, 1997; Gerber *et al.*, 2001; Moniz *et al.*, 2003; Klinman *et al.*, 2004).

Meccanismi di presentazione dell'antigene nella vaccinazione a DNA.

Molteplici studi hanno dimostrato che la quantità di antigene prodotto *in vivo* a seguito di somministrazione di DNA è dell'ordine dei picogrammi o dei nanogrammi. Visto il livello relativamente basso di proteina sintetizzata, le ragioni più probabili per l'efficiente induzione di una risposta immune sono legate alle proprietà intrinseche del DNA iniettato, come per esempio i motivi CpG e/o all'efficienza di trasfezione di APC di varia estrazione (professioniste e non).

Vi sono almeno tre meccanismi attraverso i quali l'antigene codificato dal DNA plasmidico può essere processato e presentato per indurre una risposta immune :

- a) "priming" diretto da parte di cellule somatiche (miociti, cheratinociti o qualsiasi cellula HLA-2 negativa);
- b) Trasfezione diretta di APC professioniste (come le DC);
- c) "cross-priming".

Le DC sono le principali responsabili dell'innescamento della risposta immune, anche nella vaccinazione con DNA plasmidico nudo. Il processo di acquisizione dell'antigene, secreto

oppure contenuto nei residui apoptotici o necrotici di cellule somatiche e/o di altre APC professioniste (a loro volta trasfettate) fagocitati dalle DC, ed il suo successivo processamento attraverso la via HLA-I per la presentazione a cellule T CD8+, è noto come “cross-priming” (Tighe *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 1997). I linfociti T CD8+ sono così attivati dall’interazione con l’APC e dalle citochine prodotte dai linfociti T helper, differenziati nella sottopopolazione Th1 (Fig. 18).

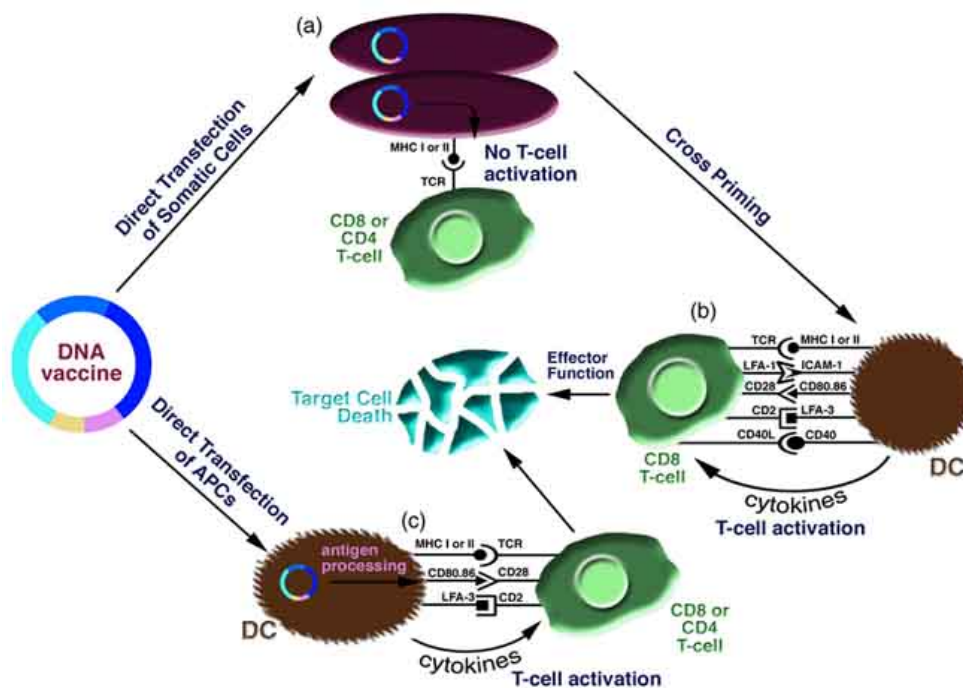


Fig. 18: Meccanismi di presentazione degli antigeni espressi dai vaccini genetici. L’antigene può essere presentato ai linfociti T da APC o da cellule somatiche che siano state direttamente trasformate con il DNA codificante per l’antigene. D’altra parte, l’antigene secreto o contenuto nei corpi apoptotici di cellule somatiche, può essere così presentato ad APC che, a loro volta, lo presenteranno a linfociti T di tipo CD4+ o CD8+ (Savelyeva *et al.*, 2003).

Modalità di somministrazione: via e dosaggio

I vaccini a DNA possono essere formulati in una varietà di solventi, principalmente in acqua distillata, in soluzione salina ed in saccarosio, ed, essendo privi di componenti batteriche infettive e quindi potenzialmente immunogeniche, necessitano in genere della combinazione con adiuvanti (Weiner & Kennedy, 1999).

Nonostante una singola vaccinazione con il DNA sia in grado di indurre sia risposte anticorpali che cellule-mediate in vari modelli, entrambe le risposte sono amplificate da richiami successivi (una o due immunizzazioni ulteriori). Tale effetto è ampiamente documentato nell'induzione di risposte di tipo umorale alle proteine dell'envelope di HIV (Lu *et al.*, 1998). In vari studi, poi, il DNA plasmidico è stato somministrato in regimi noti per stimolare l'immunità, come in associazione la tossina colerica (Kuklin *et al.*, 1997), in plasmidi co-esprimenti citochine (Okada *et al.*, 1997.), in liposomi (Klavinskis *et al.*, 1997), o con adiuvanti (Sasaki *et al.*, 1998a, b).

Molteplici sono le modalità di somministrazione dei vaccini a DNA. Tra questi la somministrazione intramuscolare, intradermica, endovenosa, intraperitoneale, epidermica tramite scarificazione, orale, intranasale o vaginale (Gurunathan *et al.*, 2000, Moniz *et al.*, 2001). La via di somministrazione più comunemente studiata è stata quella intramuscolare, seguita da quelle subcutanea ed intradermica.

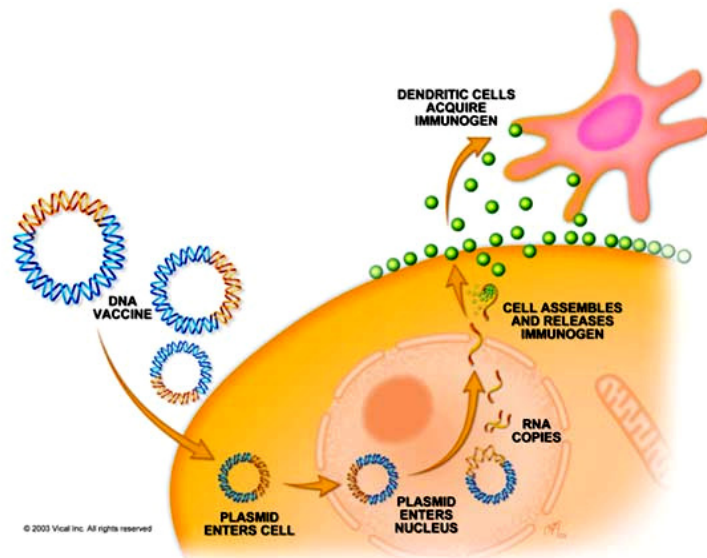
La maggior parte del DNA inoculato per via intramuscolare viene, in effetti, degradato da deossiribonucleasi extracellulari (Kawabata *et al.*, 1995). Ne consegue che la protezione del DNA plasmidico dalla degradazione extracellulare che deriva dall'inserirlo direttamente nelle cellule "target" dovrebbe risultare in un miglioramento dell'"uptake" del DNA stesso. Per questa ragione sono state sviluppate molte metodiche per la trasfezione del DNA mediate da "carrier" che non si avvalgono dell'uso di aghi (e che, quindi, consentono di evitare la possibile diffusione di agenti patogeni sistemici attraverso aghi infetti e tutte le altre problematiche correlate all'uso degli aghi) e si sono dimostrati strumenti efficaci, sicuri e indolori per la somministrazione dei vaccini genetici.

Tra queste, la tecnologia del "gene gun", messa a punto da Sanford nel 1987, sfrutta la tecnica del bombardamento biolistico a propulsione gassosa per inoculare sotto pressione particelle d'oro o di tungsteno del diametro di circa 1 μm rivestite di DNA plasmidico direttamente nelle cellule dell'epidermide e nelle mucose dell'ospite determinando livelli di espressione del transgene più alti di quelli ottenibili da dosi corrispondenti di DNA nudo. Sebbene, infatti, la dose ottimale dipenda dal particolare antigene e dal modello utilizzato, tipicamente 10-100 μg di DNA plasmidico sono richiesti per elicitare nel topo una risposta quando la somministrazione è intramuscolare o subcutanea. Al contrario, l'immunizzazione via "gene gun" spesso richiede solo 0.1-1 μg di DNA plasmidico per indurre risposte anticorpali o di tipo CTL (Fynan *et al.*, 1993).

La spiegazione probabilmente risiede nel differente meccanismo che presiede all'induzione della risposta immune nei due sistemi di somministrazione. A seguito della somministrazione

intramuscolare, infatti, sono principalmente i miociti ad essere trasfettati dal DNA plasmidico; nel loro nucleo il gene d'interesse viene trascritto, espresso e presentato attraverso la via HLA di classe 1 (trattandosi di un antigene "endogeno") ad APC professioniste ("cross-priming"). In alternativa, il DNA inoculato può anche muoversi come DNA libero nel sangue fino alla milza dove le DC iniziano la risposta immune (Robinson *et al.*, 1997) (Fig. 19).

Fig. 19: Induzione della risposta immune nella somministrazione intramuscolare dei vaccini genetici: i miociti sono trasfettati dal DNA plasmidico; nel loro nucleo il gene d'interesse viene trascritto, espresso e presentato attraverso la via HLA di classe 1 ad APC professioniste, come DC mediante "cross-priming".



La somministrazione intradermica via "gene-gun", invece, consente la trasfezione diretta delle cellule di Langerhans dell'epidermide con il DNA plasmidico. In questo caso, l'evento chiave è il "priming" diretto di cellule T di tipo CD8⁺ da parte di tale popolazione di cellule dendritiche dell'epidermide che, trasportando l'antigene fino ai linfonodi drenanti, può attivare cellule T vergini (Fig. 20) (Condon *et al.*, 1996; Feltquate *et al.*, 1997).

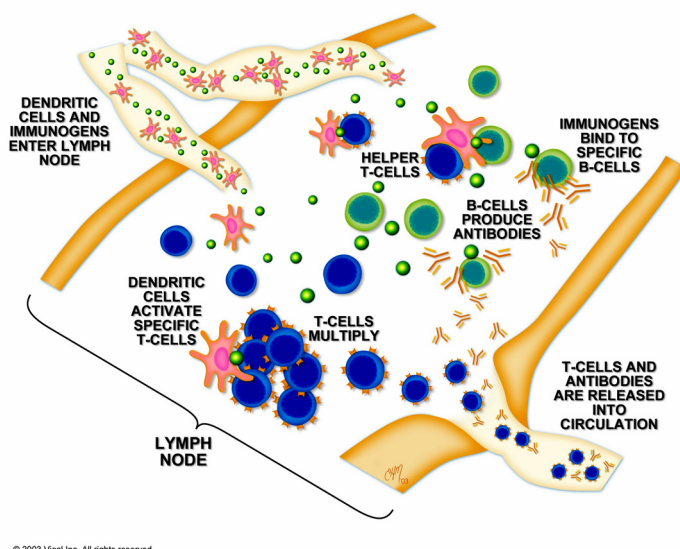


Fig. 20 trasfezione diretta delle cellule di Langerhans dell'epidermide con il DNA plasmidico nella somministrazione intradermica via "gene-gun": "priming" diretto di cellule T di tipo CD8⁺ nei linfonodi drenanti.

La somministrazione dei vaccini a DNA può anche essere effettuata mediante batteri intracellulari attenuati, i quali vengono fagocitati da APCs (dunque questo sistema di somministrazione coinvolge cellule di rilievo nell'induzione della risposta immune portando ad una efficiente induzione di una risposta immune), rilasciando così il plasmide nel fagosoma o nel citosol della cellula ospite. Il DNA rilasciato può essere dunque trascritto e tradotto portando all'espressione dell'antigene codificato.

Immunità

Uno dei principali vantaggi della vaccinazione a DNA è rappresentato dalla capacità di generare antigeni 'endogenamente' e di renderli dunque accessibili alle cellule CD8⁺ attraverso la via di presentazione HLA-1 (Ulmer *et al.*, 1993).

Sebbene risposte di tipo CD8 siano generate anche dai vaccini vivi (alcuni dei quali, comunque, possono presentare dei rischi in relazione alla sicurezza), esse sono difficilmente indotte dai vaccini a base di proteine. Inoltre, poiché i plasmidi a DNA possono essere facilmente modificati, questa metodica consente di ottimizzare la risposta CTL sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo.

Inoltre, poiché i motivi CpG possono indurre una risposta di tipo Th1, ne consegue che l'induzione di un tale tipo di risposta sia una caratteristica di tutti i vaccini a DNA.

In effetti, la vaccinazione genetica è stata applicata con successo a vari modelli animali di infezione in cui è stato possibile suscitare una risposta di tipo Th1 che correla con la protezione (ad esempio nella leishmaniosi e nella tubercolosi). Evidenze ulteriori che la vaccinazione genetica favorisca una risposta di tipo Th1 derivano dalla predominanza dell'isotipo IgG2a fra le immunoglobuline individuate a seguito della somministrazione (Roman *et al.*, 1997).

D'altra parte, in alcune circostanze, i vaccini a DNA possono anche indurre risposte di tipo Th2. Probabilmente, il miglior esempio al riguardo implica l'uso del metodo di immunizzazione via "gene gun". Pertmer e collaboratori hanno per primi dimostrato l'incremento della produzione di IL-4 in topi immunizzati ripetutamente via "gene gun" e la concomitante riduzione della produzione di IFN- γ ; inoltre, mentre l'isotipo predominante di immunoglobuline stimolato da questa via di somministrazione è il tipo IgG1, nel caso della somministrazione intra-muscolare è rappresentato dal tipo IgG2a (Pertmer *et al.*, 1996).

Queste osservazioni sono state ulteriormente sostenute da Feltquate e collaboratori: tipi differenti di citochine "T-helper" vengono generate nella vaccinazione via "gene gun" rispetto a quella intramuscolare (Feltquate *et al.*, 1997).

C'è qualche evidenza, inoltre, che la natura secreta od intra-cellulare dell'antigene utilizzato possa influenzare il tipo di risposta (Haddad *et al.*, 1997).

Per quanto concerne l'aspetto quantitativo della produzione di anticorpi a seguito di vaccinazione a DNA, è stato dimostrato in due differenti studi su vaccini a DNA codificanti per l'antigene emoagglutinina dell'influenza, che la risposta anticorpale raggiunge un picco massimo e poi va a "plateau" tra le 4 e le 12 settimane dalla singola immunizzazione nel topo. Inoltre, la produzione di anticorpi aumenta all'aumentare della dose, cioè delle somministrazioni, indipendentemente dalla via adottata. In ogni caso, una volta raggiunto il plateau, una somministrazione singola o più somministrazioni con una dose ottimale di DNA non modificano sostanzialmente il livello di anticorpi prodotti (Robinson *et al.*, 1997).

In ultimo, sebbene la durata della risposta anticorpale possa essere sostenuta nel tempo (livelli sierici significativi sono rilevati anche dopo un anno e 6 mesi dalla vaccinazione), tale durata è altamente variabile e dipende dal modello e dal vaccino (Raz *et al.*, 1994; Deck *et al.*, 1997).

I vaccini a DNA possono indurre una memoria immunologica contro molteplici epitopi. Da questo punto di vista, le vaccinazioni genetiche rassomigliano ai vaccini virali vivi poiché sollecitano ampiamente i precursori dei CTL e la loro memoria immunologica.

In termini di immunità cellulare, è stato recentemente dimostrato che il livello di cellule T CD4⁺ antigene-specifiche misurato attraverso test di proliferazione, resta elevato per ≈40 settimane dalla vaccinazione. Le cellule T CD4⁺ antigene-specifiche probabilmente vengono attivate nei linfonodi drenanti e migrano verso la milza ove possono persistere per più di 40 settimane anche in assenza di un livello rilevabile di antigene (Akbari *et al.*, 1999).

Risposte CTL di tipo CD8⁺ possono essere osservate per ≈68 settimane dopo somministrazione intra-dermica di DNA plasmidico codificante per una nucleoproteina del virus dell'influenza (Raz *et al.*, 1994).

Sicurezza

Tra le obiezioni sollevate all'uso dei vaccini a DNA, vi è quella riguardante la possibilità che tali vaccini possano:

- a) integrarsi nel genoma dell'ospite, aumentando il rischio di carcinogenesi (mediante attivazione inserzionale di oncogeni od inattivazione di geni onco-soppressori);
- b) indurre risposte immuni contro le cellule trasfettate, innescando lo sviluppo di disturbi auto-immuni;
- c) indurre tolleranza immunologica nei confronti dell'antigene codificato;

d) stimolare la produzione di citochine che alterano la capacità dell'ospite di rispondere ad altri vaccini e di rispondere ad altre infezioni (Klinman *et al.*, 1997).

Il DNA plasmidico può persistere al sito di inoculo per vari mesi. Esso può essere ritrovato anche lontano dal sito originale di inoculo, probabilmente trasportato da linfociti trasfettati o macrofagi; tuttavia ad oggi non vi sono prove certe che i plasmidi si integrino nei cromosomi dell'ospite, né, d'altra parte, tale eventualità può essere del tutto scongiurata. I tentativi di dimostrare che il DNA genomico dell'ospite non contiene plasmidi (prova che l'integrazione non ha avuto luogo) sono falliti, in parte per la contaminazione del DNA genomico con concatenameri plasmidici, in parte per l'estrema sensibilità della reazione di PCR (Martin *et al.*, 1999).

Le perplessità relative alla possibilità che i vaccini a DNA possano promuovere lo sviluppo di disturbi auto-immuni derivano dall'attività immuno-stimolatoria dei motivi CpG presenti nella struttura del DNA plasmidico utilizzato. D'altra parte, sebbene vi sia la possibilità teorica che una parte dei vaccini a DNA (in particolare quelli codificanti per determinanti che cross-reagiscono con antigeni "self") possa indurre o accelerare lo sviluppo di disturbi auto-immuni, alcuni recenti risultati suggeriscono che il livello di auto-anticorpi elicitato da dosi terapeutiche di vaccini a DNA o CpG ODN sia comunque insufficiente ad indurre tali manifestazioni (Mor *et al.*, 1997). Inoltre, finora, centinaia di volontari sono stati esposti alla vaccinazione a DNA senza conseguenze avverse.

Molti vaccini sono specificatamente intesi alla somministrazione a neonati e bambini. A causa dell'imaturità del sistema immune, i neonati esposti ad antigeni estranei sono a rischio di sviluppo di tolleranza, più che immunità (Silverstein *et al.*, 1975). Essendo le proteine codificate dai vaccini a DNA espresse endogenamente nel contesto di molecole HLA autologhe, esiste la possibilità che il sistema immune neonatale le riconosca come proprie e sviluppi tolleranza immunologica. Tuttavia, una varietà di fattori influenzano lo sviluppo di tolleranza neonatale, inclusa la natura, la concentrazione, e la modalità di presentazione dell'antigene al sistema immune, così come l'età dell'ospite (Marodon *et al.*, 1994).

Problematiche relative alla sicurezza potrebbero derivare anche dall'uso di plasmidi codificanti per motivi CpG o citochine come adiuvanti per il miglioramento delle risposte immuni elicitate *in vivo* dai vaccini a DNA. L'equilibrio tra la produzione di citochine Th1 (come già discusso responsabili della promozione di risposte immuni cellulo-mediate) e Th2 (che sostengono invece la risposta immune umorale e controbilanciano le risposte Th1) rappresenta una componente importante nell'omeostasi immunologica. Queste due classi di cellule secernenti citochine formano una rete mutuamente inibitoria, poiché le citochine Th1

possono bloccare la maturazione di cellule di tipo Th2 e viceversa. La sovrapproduzione di una delle due classi di citochine può alterare l'omeostasi e quindi la risposta dell'ospite ad altri vaccini, la sua suscettibilità ad altre infezioni, la predisposizione a sviluppare disturbi auto-immuni (Ishii *et al.*, 1999). D'altra parte non è stata finora osservata alcuna variazione nella frequenza dei precursori secernenti citochine di tipo Th1 o Th2 in topi immunizzati più volte con plasmidi codificanti per IFN γ , IL-4 o GM-CSF. Sembrerebbe dunque che le citochine rilasciate dalle cellule trasfettate influenzino principalmente l'immunità locale più di quella sistemica, lasciando il livello delle citochine del siero sostanzialmente invariato.

1.4.3.2 Vaccinazioni terapeutiche a DNA contro HPV.

L'efficacia di un vaccino anti-cancro è correlata alla sua capacità di interrompere lo stato di tolleranza dei linfociti T nei confronti dell'antigene tumorale, ripristinando la reattività del sistema immunitario. È fondamentale, dunque, la progettazione di formulazioni che incrementino e stabilizzino l'antigene vaccinale o riproducano un contesto simil-infiammatorio, necessario per l'attivazione dell'immunità innata e conseguentemente dei segnali costimolatori che inducono poi la risposta specifica (Pardoll, 1998).

I vaccini a DNA impiegati per la terapia delle lesioni tumorali HPV-indotte sono generalmente costituiti da plasmidi recanti i geni delle proteine E6 ed E7, le quali, come già ricordato, rappresentano i principali antigeni tumorali contro cui indurre la risposta immune cellulo-mediata. È necessario, tuttavia, che tali geni siano alterati per mutazioni puntiformi, inserzioni o delezioni, al fine di eliminare il potere trasformante delle proteine da essi codificate, preservandone l'immunogenicità (Da Silva *et al.*, 2001).

Il gene E7 è stato, ad esempio, modificato attraverso l'introduzione di tre mutazioni puntiformi nel sito di legame con pRb. Il livello di espressione, il "turnover" e la localizzazione cellulare della proteina mutata, denominata E7*, sono risultati paragonabili a quelli della proteina E7 "wild type"; l'impiego di un vaccino a DNA basato sul gene E7* ha indotto regressione tumorale in una proporzione significativa dei topi immunizzati. Il notevole incremento dell'immunogenicità dell'oncoproteina E7 alla base dell'efficacia di tale vaccino, è stato imputato proprio alla mutagenesi nel sito di legame a pRb. L'espressione di E7 nelle DC, infatti, attraverso l'interazione con pRb e quindi l'innescamento di cicli cellulari ripetuti, ne induce un'incontrollata proliferazione impedendone il processo differenziativo e ne sopprime, di conseguenza, la capacità di presentazione dell'antigene. Al contrario, E7*, incapace di interagire con l'oncosoppressore pRb, è priva di tale proprietà e permette la differenziazione

delle DC trasfettate che, dunque, possono esercitare l'attività di presentazione che si traduce nell'induzione di protezione nei confronti dell'oncoproteina (Smahel *et al.*, 2001).

Il gene E7 è stato, in un altro caso, modificato in modo da produrre una oncoproteina con quattro domini alterati ed alcune sequenze duplicate, incapace di indurre lo sviluppo neoplastico, ma ancora in possesso degli epitopi necessari per la stimolazione di una risposta immune T citotossica, come dimostrato in esperimenti *in vitro* (trasfezione di cellule di mammifero) e *in vivo* (vaccinazione di modelli murini) (Osen *et al.*, 2001).

Lo stesso effetto, accompagnato, in più, da un incremento dei livelli di IL-2, è stato ottenuto con le mutazioni introdotte in corrispondenza di due motivi leganti lo zinco al C-terminale del gene E7 (Zuo *et al.*, 2004).

Molti studi hanno dimostrato che nell'immunizzazione a DNA una migliore risposta immune può essere ottenuta con l'ottimizzazione della sequenza del transgene. L'ottimizzazione del gene E7 di HPV16 sulla base di quello consenso di mammifero, ha determinato, in effetti, un incremento del livello di traduzione rispetto al gene "wild type" in un vaccino polinucleotidico. Tale modificazione si è tradotta, inoltre, in un incremento della risposta di tipo CTL e della protezione dal tumore *in vivo* in un modello pre-clinico di vaccinazione (Steinberg *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2002b).

Il potere immunogeno di un antigene di interesse, ottenuto attraverso la modificazione molecolare dell'oncogene corrispondente, può, tuttavia, raggiungere livelli non del tutto soddisfacenti. Si rende necessario, quindi, lo sviluppo di strategie che incrementino l'efficacia della vaccinazione genetica sfruttando la tecnologia del DNA ricombinante

L'efficacia del vaccino precedentemente descritto, codificante la proteina E7*, è stata, ad esempio, notevolmente migliorata fondendo a valle del gene corrispondente il gene dell'enzima β -glucuronidasi (GUS) di *Escherichia coli*. Probabilmente, la localizzazione subcellulare della proteina di fusione E7*/GUS e la presenza di epitopi T helper nella β -glucuronidasi potrebbero essere responsabili della maggiore efficacia di tale vaccino (Smahel *et al.*, 2004). Dunque, la fusione di un gene codificante per un immunogeno con un gene "helper" può rappresentare un sistema efficiente per incrementare l'immunogenicità dell'antigene di interesse.

Recentemente, poi, è stata valutata la validità di due vaccini a DNA multiepitopici codificanti alcuni determinanti antigenici, sia murini (H-2b ristretti) sia umani (HLA-A*0201 ristretti), della proteina E7, nella stimolazione di una potente risposta T citotossica a lungo termine che si è dimostrata protettiva nei confronti di tumori indotti. Un altro vaccino, differente dal primo

per la mancanza di una sequenza di indirizzamento al reticolo endoplasmatico e di un epitopo T helper, ha manifestato una risposta CTL molto modesta e scarsi effetti protettivi nei confronti dello sviluppo neoplastico dimostrando la validità dell'approccio multiepitopico nella vaccinazione a DNA contro le neoplasie associate ad HPV (Doan *et al.*, 2005).

Sono state sviluppate numerose strategie per intensificare, in maniera mirata, le risposte T helper e/o T citotossica indotte dai vaccini a DNA.

Diversi sono stati, ad esempio, i tentativi di potenziare la presentazione ai linfociti T CD8⁺ di peptidi antigenici in associazione a molecole MHC I. Una delle principali caratteristiche dei tumori indotti da HPV è, infatti, la deregolazione dell'espressione delle molecole MHC I, che costituisce uno dei meccanismi con cui le cellule trasformate tentano di evadere la risposta immune dell'ospite e che è riscontrata nel 70-90% delle pazienti affette da cancro cervicale (Pawelec *et al.*, 2000). Le cellule T di tipo CD8 dirette contro antigeni tumore-specifici indotte da una vaccinazione, d'altra parte, sono ormai riconosciute come componenti fondamentali dell'immunità protettiva e terapeutica contro le lesioni neoplastiche in generale. Come già ricordato, l'immunizzazione con la proteina di fusione E7/Hsp65 o 70 è risultata efficace, in modelli murini, nella regressione di tumori HPV-indotti ed è una strategia attualmente valutata in "clinical trial". Questo costituisce un approccio potenziale per aumentare anche l'efficacia dei vaccini a DNA. Recentemente, è stato infatti dimostrato che la fusione del gene della Hsp70 di *Mycobacterium tuberculosis* al gene E7 può incrementare drammaticamente (attraverso la presentazione dell'antigene CD8-dipendente) l'efficacia di un vaccino a DNA anti-HPV somministrato tramite "gene gun": i topi immunizzati con tale plasmide hanno manifestato una risposta T CD8⁺ specifica per E7 potenziata rispetto alla vaccinazione con il solo gene E7 (30 volte più alta) ed ad azione antitumorale. La somministrazione tramite "gene gun" del vaccino favorisce già di per sé risposte di tipo CD8⁺ (poiché determina la trasfezione diretta delle cellule dendritiche e quindi la produzione da parte di queste di Hsp 70 come peptide endogeno); inoltre, Hsp70 è nota per essere coinvolta nel processamento degli antigeni MHC I-ristretti (Chen C.H. *et al.*, 2000). La presenza di Hsp70 rende E7 più immunogenica poiché la vaccinazione con costrutti esprimenti tale proteina espande la popolazione di cellule T Hsp70-reattiva già esistente a causa della continua esposizione a microrganismi patogeni o commensali, e tali cellule possono esercitare un forte effetto "helper" reagendo con i peptidi coniugati ad Hsp70 ed incrementando la popolazione di precursori di cellule TCD8⁺ E7 specifica.

Tuttavia l'applicazione del gene di Hsp70 nella vaccinazione a DNA nell'uomo solleva la problematica relativa all'induzione di autoimmunità che potrebbe generarsi nel momento in

cui i cloni CTL specifici per la Hsp70 di *Micobacterium* cross-reagiscono con le Hsp dell'ospite, problema che non sussiste se a fungere da gene 'attivatore' dell'immunogenicità dell'antigene di interesse è un gene totalmente estraneo all'organismo dell'ospite e contro il quale non esistono risposte immunitarie pre-esistenti.

Vaccini a DNA codificanti per la proteina di fusione calreticolina/E7 o per gli "chaperone" del reticolo endoplasmatico ER-60 e tapasina fusi al gene E7, hanno indotto, in modelli murini, un marcato effetto antitumorale, mediato dal potenziamento della risposta T CD8⁺. La calreticolina, proteina legante gli ioni Ca⁺⁺ e correlata alle Hsps, e gli "chaperone" ER-60 e tapasina sono, infatti, capaci di indirizzare l'antigene tumorale nel reticolo endoplasmatico e di indurne, di conseguenza, la presentazione sulla superficie cellulare in associazione a molecole MHC I. Inoltre, la calreticolina ed il suo frammento proteico vasostatina, sono potenti inibitori dell'angiogenesi, capaci perciò di arrestare la crescita tumorale (Cheng *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2005)

Risultati analoghi sono stati ottenuti fondendo al gene E7 quello del dominio extra-cellulare del ligando Ftl3 ("Fms-like tyrosine kinase"), capace di favorire l'ingresso dell'oncoproteina nel reticolo endoplasmatico; l'azione antitumorale di tale vaccino, mediata dai linfociti T citotossici, è risultata indipendente dall'induzione di una risposta immune T helper (Hung *et al.*, 2001c).

Sia l'ottimizzazione del gene E7 sia il "targeting" verso il lisosoma si sono dimostrati utili strumenti per ottenere un incremento della popolazione di CTL E7-specifica che ha determinato un effetto anti-tumorale superiore rispetto alla vaccinazione col solo gene E7 "wild type". Inoltre la consecutiva somministrazione di un plasmide codificante per l'IL-12 ha ulteriormente migliorato gli effetti di protezione (Kim & Sin, 2005).

Una strategia per accentuare la presentazione dell'antigene attraverso la via MHC I, e quindi l'immunogenicità dei vaccini a DNA, è quella di promuoverne la degradazione intracellulare. Gli antigeni prodotti nel citosol, infatti, così come le proteine intracellulari che hanno superato la propria emivita o non hanno raggiunto un corretto ripiegamento, sono degradate dal proteasoma. Questo è un complesso multiproteico, presente in molte copie nel citosol e nel nucleo della cellula e dotato di attività proteolitica ATP (Adenosina trifosfato)-dipendente. Generalmente, i proteasomi agiscono su proteine che sono state marcate per la distruzione dal legame covalente di copie multiple di una piccola molecola proteica nota come ubiquitina. Alcuni tipi di proteasomi sono in grado di degradare le proteine in frammenti peptidici di dimensioni e sequenza adatti a legarsi a molecole MHC I. Come già descritto in questa

introduzione, tali peptidi sono veicolati nel RE, dove si trovano le molecole MHC I, dal trasportatore associato alla processazione dell'antigene (TAP).

Alcune mutazioni, introdotte nell'oncogene E7, determinano un incremento della instabilità della proteina codificata e l'induzione di una sostenuta risposta T citotossica specifica. Infatti, l'aumentata instabilità della proteina, oltre a privarla dell'oncogenicità, ne favorisce la degradazione e la processamento. Ciò è stato ottenuto, ad esempio, da Shi e collaboratori che hanno preparato un gene E7 mutato con scarso potere trasformante ed incrementata immunogenicità dovuta all'introduzione di due cisteine. Tale alterazione ha determinato la rapida degradazione della proteina E7 attraverso la via del proteasoma e, di conseguenza, un'incremento dei livelli di presentazione di tale antigene attraverso la via MHC I e l'induzione di una marcata risposta CTL (Shi *et al.*, 1999).

Anche l'introduzione di due mutazioni puntiformi nella porzione di E7 codificante i due motivi conservati CXXC, che formano lo "zinc finger" determina una forma destabilizzata della proteina E7 che si è dimostrata capace di indurre una risposta CTL ed effetti antitumorali più marcati di quelli ottenibili con l'antigene selvatico (Shi *et al.*, 1999).

Un'altra strategia per accentuare la presentazione dell'antigene attraverso la via MHC I, è quella di indirizzare l'antigene al centrosoma (anche noto come 'centro di organizzazione dei microtubuli'), un organello perinucleare che contiene un'elevata densità di proteasomi e molte altre proteine, come la γ -tubulina e la β -tubulina (ben documentati marker del centrosoma) ed è associato con molte proteine regolatorie come le citate Hsp70 e 90 e l'ubiquitina. Il centrosoma è un compartimento intracellulare di fondamentale importanza nella degradazione secondo la via del proteasoma di proteine in peptidi antigenici ed è stato dimostrato che indirizzare e concentrare la proteina E7 nel centrosoma attraverso la fusione con la γ -tubulina, ne facilita la degradazione secondo la via del proteasoma determinando un incremento della generazione di epitopi per la presentazione di tipo MHC I, ed ottenendo, attraverso un marcato incremento della popolazione di precursori di cellule T CD8⁺ E7-specifici, una miglior efficacia del vaccino genetico contenente tale antigene (Hung *et al.*, 2003).

Gli effetti protettivi nei confronti dello sviluppo tumorale derivanti dall'impiego di un vaccino a DNA basato su un costrutto multiepitopico e, al tempo stesso, ubiquitinato, sono stati valutati in modelli murini; la somministrazione di un plasmide ricombinante, recante la sequenza di fusione L1-E7 ubiquitinata, ha indotto sia una potenziata risposta T citotossica, sia regressione tumorale. Inoltre, l'efficacia della vaccinazione è risultata dipendente dalla presenza di sequenze spaziatrici tra i vari epitopi, che, teoricamente, consente il corretto "cleavage" dei peptidi da parte del proteasoma (Liu *et al.*, 2002a).

Mentre i vaccini citati finora sfruttano l'incremento della presentazione antigenica di tipo MHC I per generare potenti risposte CTL (risposte T di tipo CD8⁺), altri costrutti a DNA possono indirizzare l'antigene verso la via di processazione/presentazione di classe II, determinando l'induzione di una potenziata risposta immune T CD4⁺.

Un vaccino a DNA chimerico basato sul gene E7 recante, a monte, il gene della proteina associata alla membrana lisosomale 1 (LAMP-1) ed, a valle, la sua sequenza segnale di indirizzo verso il comparto lisosomale (Sig/E7/LAMP1), è stato progettato con la finalità di indirizzare l'antigene tumorale verso la via di processazione di classe II (Wu *et al.*, 1995). Infatti, esperimenti *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che l'espressione di questo vaccino a DNA a tre componenti guida E7 nei compartimenti endosomali e lisosomali e intensifica la presentazione ai linfociti T CD4⁺ dell'antigene associato all'MHC II (Ji *et al.*, 1999).

Un vaccino a DNA recante il gene E7 fuso alla catena Invariante ha indotto, in topi, una notevole protezione antitumorale; infatti, la presenza di tale peptide incrementa la presentazione di epitopi MHC II-ristretti, inducendo l'attivazione delle cellule T CD4⁺, oltre che di quelle T CD8⁺ stimulate dai determinanti antigenici CTL presenti nel prodotto di fusione (De Marco *et al.*, 2003).

I vaccini a DNA potenziati appena descritti, basati su strategie di "targeting intracellulare", sono, tuttavia, in grado di generare solo un numero limitato di cellule dendritiche esprimenti l'antigene d'interesse. Ciò costituisce, del resto, un limite comune a tutti i vaccini genetici, in quanto il DNA "nudo" è privo della capacità di amplificarsi e diffondersi *in vivo*.

Sono state messe a punto delle strategie che mirano a facilitare, appunto, la diffusione intercellulare dell'antigene, in modo da coinvolgere nella risposta immune un maggior numero di cellule dendritiche (Moniz *et al.*, 2003). Si è fatto uso, ad esempio, della VP22 dell'Herpesvirus Simplex 1 (HSV1), una proteina tegumentale dotata di mobilità intercellulare e capace di traslocare dalle cellule infettate da HSV a cellule sane e, quindi, in grado potenzialmente di aumentare la traslocazione tra una cellula e l'altra anche di un partner ad essa legato. In effetti, esperimenti *in vitro* hanno permesso di dimostrare che la proteina di fusione HVP22/E7 è in grado di spostarsi dalle cellule di mammifero trasfettate con il plasmide che la codifica, a quelle limitrofe non trasfettate (Michel *et al.*, 2002). Inoltre, la vaccinazione di topi con DNA codificante la proteina di fusione HVP22/E7 ha indotto la proliferazione dei precursori dei linfociti T CD8⁺ ed un marcato effetto antitumorale (Hung *et al.*, 2001b).

Può essere ipotizzato, quindi, che segnali di secrezione siano in grado di migliorare l'immunogenicità di antigeni deboli come E7, dirigendo la proteina sintetizzata fuori dal citoplasma, dove potrebbe svolgere attività che modulano in maniera diretta o indiretta le attività di presentazione al sistema immune dell'ospite

Un plasmide può essere anche ingegnerizzato in modo che la proteina da esso codificata sia secreta oppure localizzata all'interno della cellula. Molti studi hanno dimostrato che il tipo e l'entità della risposta immune suscitata dipendono dalla localizzazione dell'antigene (legato alla superficie cellulare, ritenuto in ambiente intra-cellulare o secreto). Per esempio, la stessa proteina in forma secreta induce titoli più alti di IgG rispetto a quando localizzata sulla membrana cellulare o ritenuta nel citosol (Rice *et al.*, 1999) poiché le cellule B necessitano di determinanti antigenici lineari legati alla membrana o di epitopi conformazionali per iniziare il processo di espansione clonale per un'efficiente produzione di anticorpi (Akbari *et al.*, 1999).

Le cellule dendritiche trasfettate sono, però, bersaglio dei linfociti T CD8⁺ effettori da esse stesse generati che ne inducono l'apoptosi poiché esprimono gli antigeni che li hanno stimolati. Il prolungamento del periodo di vita e dunque di attività immunologica delle DC trasfettate da un vaccino a DNA potrebbe pertanto risultare in un prolungamento della loro attività di presentazione dell'antigene e, dunque, della stimolazione CTL. Co-somministrare, insieme al DNA plasmidico contenente il gene dell'antigene bersaglio, un DNA codificante fattori antiapoptotici come bcl-xL e bcl-2 previene il rilascio di fattori proapoptotici ed arresta l'azione della caspasi 8 incrementando l'attività e l'emivita delle DC trasfettate e sostenendo una risposta CTL E7-specifica ad effetto anti-tumorale (Kim *et al.*, 2003a, b).

Da quanto descritto, è intuibile che un impiego combinato delle strategie di "targeting" intracellulare ed intercellulare e di prolungamento della sopravvivenza delle cellule dendritiche consentirebbe di indurre una potenziata attività dei linfociti T CD8⁺, una marcata risposta T CD4⁺ contro l'antigene tumorale, incrementati effetti terapeutici antitumorali e una protezione a lungo termine dallo sviluppo di neoplasie.

Il gene dell'inibitore 6 della serin proteasi (SPI 6), naturalmente espresso dalle DC mature per inibire l'apoptosi indotta dai CTL attivati attraverso la produzione di granzima B e perforine, co-somministrato con DNA codificante per ciascuno dei vaccini genetici basati sui costrutti E7/Hsp70, calreticolina/E7, ETA (dII)/E7 e Sig/E7/LAMP-1 ha dimostrato di ridurre in modo significativo la morte per apoptosi delle cellule dendritiche trasfettate ed ha determinato un notevole incremento delle risposte immuni T CD8⁺ e T CD4⁺ E7-specifiche in modelli murini (Kim *et al.*, 2004).

D'altra parte, si potrebbero trarre vantaggi anche dall'applicazione della strategia opposta. Se geni pro-apoptotici fossero somministrati insieme all'antigene di interesse, ciò determinerebbe l'apoptosi delle cellule somatiche trasfettate dal vaccino genetico ed il loro riconoscimento da parte di APC professioniste attraverso l'esposizione sulla membrana, assieme all'antigene di interesse, di una varietà di molecole specifiche per le cellule apoptotiche (come i recettori CD36, ABC-1, CD14, CD19, o i recettori scavenger di classe A). Dopo la fagocitosi e la degradazione delle cellule apoptotiche caricate con l'antigene, le APC migrerebbero verso gli organi linfatici per la presentazione dell'antigene alle cellule T di tipo CD8 e CD4 (Kim *et al.*, 2003a).

Un altro interessante approccio atto ad incrementare l'efficacia dei vaccini a DNA consiste nell'impiego di citochine e di altre molecole costimolatorie, necessarie, come è noto, per indurre una potente risposta T CD8⁺ (Moniz *et al.*, 2003). E' possibile co-somministrarle insieme al vaccino genetico oppure inserire nel plasmide ricombinante le sequenze geniche che le codificano. E' stato, ad esempio, osservato che la somministrazione di IL-12, in corrispondenza del sito di iniezione di un vaccino a DNA codificante E7, ne ha migliorato l'effetto terapeutico (Tan *et al.*, 1999).

La combinazione di differenti tipi di vaccini di solito induce risposte immuni accentuate rispetto all'immunizzazione con vaccini singoli dello stesso tipo. La maggior efficacia nell'ambito di tale strategia in cui vaccinazione e richiamo possono essere definiti eterologhi, è raggiunta dopo una prima immunizzazione a DNA seguita da un "boost" con un vaccino a virus ricombinante o proteico. Il gene di fusione Sig/E7GGG/Lamp-1 già descritto, inoculato via "gene gun" e seguito da un richiamo effettuato con un vaccino cellulare costituito da cellule trasdotte con il gene codificante per il GM-CSF o per IL-2, ha indotto un certo livello di protezione dallo sviluppo di tumori esperimenti E7 in un modello murino (Rittich *et al.*, 2005).

Esempi di sperimentazioni cliniche di vaccini genetici

Studi clinici terapeutici sono stati condotti con vaccini a DNA codificanti per pg160 o per geni regolatori di HIV. In studi di dosaggio, i geni *env* e *rev* così come i geni regolatori sembrano sicuri in soggetti HIV infetti, ed è stato possibile dimostrare l'induzione di risposte CD4 specifiche dopo vaccinazione genetica con *rev*, *tat*, e *nef* ed un abbassamento della carica virale dopo immunizzazione con DNA codificante per le proteine *env* e *pol* (MacGregor *et al.*, 2005). Tale vaccinazione ha selezionato cloni linfocitari CD8 specifici reattivi nei confronti delle cellule infettate dimostrando che questo tipo di somministrazione

può indurre risposte immuni di tipo cellulo-mediato in pazienti immuno-compromessi senza dover ricorrere a terapie retrovirali ad alto dosaggio. Tuttavia la persistenza della risposta immune è limitata nel tempo e sembra necessario l'uso di adiuvanti.(Calarota *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2004).

Sono attualmente in “trial” clinico vaccini a DNA paziente-specifici per la terapia di linfomi a cellule B e mielomi multipli basati su scFv derivati dal tumore dei pazienti fusi al frammento C della tossina colerica che si erano già dimostrati efficaci in modelli animali. In questo studio 8 pazienti su 10 hanno mostrato un incremento dei livelli anticorpali oppure una risposta di tipo T. Sebbene queste possano essere risposte legate alla memoria immunologica nei confronti di precedenti esposizioni al tossoide tetanico, quanto meno ciò dimostra che il vaccino genetico riesce ad indurre la presentazione dell'antigene al sistema immune (Stevenson *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda HPV, è in corso un clinical trial di fase II negli Stati Uniti ed in Europa (Zycos Inc. - MGI Pharma) in cui DNA plasmidico incapsulato in particelle biodegradabili codificante per epitopi di E6 ed E7 di HPV16 ed HPV18 è stato somministrato a 161 pazienti con CIN2/3 suddivise in un due gruppi costituiti, rispettivamente, da soggetti di età maggiore o minore di 25 anni. I dati attuali indicano una risoluzione del 70% delle lesioni nel gruppo di soggetti giovani e nessuna risoluzione nel gruppo di soggetti di età maggiore di 25 anni (Tabella 4).

1.4.4 VACCINI ANTI-HPV IN PIANTA PER IL CONTROLLO DELL'INFEZIONE E PER LA TERAPIA DELLE LESIONI NEOPLASTICHE ASSOCIATE AD HPV

I risultati sperimentali finora ottenuti lasciano sicuramente intravedere la possibilità di un'applicazione futura dei vaccini terapeutici anti-HPV nella pratica clinica.

La tendenza attuale è, comunque, quella di giungere ad una produzione su larga scala di vaccini a basso costo e quindi di facile reperibilità soprattutto nei Paesi in via di sviluppo.

Lo sviluppo ed il miglioramento di nuovi vaccini richiede, infatti, un capitale monetario iniziale molto alto, che rappresenta un ostacolo insormontabile per le aree economicamente depresse del mondo dove le infrastrutture mediche e la politica sanitaria sono carenti e dove, quindi, misure preventive o terapeutiche sono ancor più necessarie. Di conseguenza l'attuazione dell'innovazione medica nei Paesi in via di sviluppo può rappresentare un “target” per le attuali strategie biotecnologiche.

Piante con specifiche proprietà sono state utilizzate a scopi terapeutici sin dall'antichità e sono state, dunque, il fondamento della medicina per millenni, principalmente come sorgente di composti medicinali da esse estratti. Oggi, il “plant molecular farming”, ossia l'insieme delle tecnologie di produzione di molecole a valore farmacologico in pianta, consente nuove possibilità terapeutiche ed ha gli strumenti per estendere l'uso medicinale delle piante alla produzione di vaccini combinando l'innovazione nelle scienze mediche con la biologia vegetale per produrre prodotti farmaceutici a basso costo. La lista degli antigeni prodotti in pianta potenzialmente utilizzabili come vaccini, infatti, diviene sempre più varia ed include proteine derivate da patogeni virali e batterici.

La ricerca negli ultimi 15 anni ha significativamente incrementato la conoscenza della regolazione dei geni e la sintesi proteica in pianta. Più di 100 proteine ricombinanti sono state prodotte in una varietà di specie diverse ed ora le prime proteine biofarmaceutiche derivate da pianta (tra cui anticorpi e vaccini) stanno per essere approvate per l'immissione sul mercato (Daniell *et al.*, 2001a; Giddings, 2001; Ma *et al.*, 2003, Twyman *et al.*, 2003).

Vi sono molte ragioni per produrre molecole a valore terapeutico in pianta:

1. La sola necessità di luce solare, acqua e sali minerali e la facilità di manipolazione e di utilizzo fa delle piante un sistema economico e semplice per la produzione di proteine eterologhe rispetto alle strutture industriali che utilizzano la tecnologia della fermentazione. Si stima che il costo delle proteine ricombinanti prodotte in pianta rappresenti solo il 2-10% di quello della fermentazione e solo lo 0,1% di quello delle colture di cellule di mammifero. Rese pari allo 0.1 – 1% di proteine solubili totali (TSP) sono sufficientemente competitive rispetto ad altri sistemi di espressione da rendere le piante un sistema economicamente sostenibile (Hood *et al.*, 2002) (*Fig. 21*). Inoltre si possono attuare tecnologie di “scale-up” per la raccolta ed il processamento su larga scala.

2. Le piante possono essere considerate più sicure rispetto ai microrganismi ed ai sistemi animali poiché generalmente non sono vettori di patogeni per l'uomo (come virus o prioni), e non contengono sequenze oncogene od endotossine. Ciò minimizza il rischio per la salute e contribuisce a ridurre i costi.

3. Il processo di sintesi delle proteine è conservato nel mondo vegetale ed in quello animale. Poiché, infatti, le piante possiedono un sistema endomembranoso sono in grado di provvedere alle modificazioni post-traduzionali come la glicosilazione o la fosforilazione (sebbene le modalità con cui tali processi si realizzano nelle piante debbano essere ancora studiati nel dettaglio) delle proteine ricombinanti per le quali possono garantire anche il corretto ed efficiente ripiegamento ed assemblaggio. Questo rappresenta un grosso

vantaggio sui sistemi di espressione batterici, nei quali molte proteine non vengono correttamente ripiegate e quindi vengono degradate (determinando bassi livelli o assenza di proteina) o si accumulano in corpi di inclusione insolubili.

4. Può essere sfruttato il “targeting” subcellulare per aumentare le rese delle proteine ricombinanti.

5. Le piante rappresentano un sistema potenzialmente in grado di consentire la somministrazione per via orale della proteina eterologa prodotta ed accumulata, ad esempio, in organi di riserva. In questo caso, semi polverizzati, endosperma, o frutti possono essere utilizzati per la realizzazione e per la somministrazione di vaccini edibili. Infatti, sebbene gli antigeni vaccinali prodotti in pianta possano essere facilmente purificati, le specie vegetali edibili rappresentano un’alternativa interessante per la somministrazione orale di vaccini che abbattano i costi della purificazione richiesti per i vaccini iniettabili. Molte proteine ricombinanti di interesse, quindi, potrebbero essere somministrate assieme al materiale vegetale non processato o processato parzialmente, abbattendo molti dei costi a valle del processo produttivo (che rappresentano più dell’85% dei costi totali). Molti preparati per uso topico già in uso sono derivati da piante, e vaccini ricombinanti a sub-unità prodotti in specie edule potrebbero essere somministrati attraverso l’assunzione alimentare di frutta e verdura crudi o parzialmente processati. Per le proteine di interesse farmaceutico che necessitano di essere purificate prima dell’assunzione, possono essere attuate semplici strategie per ridurre i costi di estrazione.

6. Un accumulo prolungato e stabile di proteina eterologa può essere ottenuto sfruttando la capacità delle piante di indirizzare le proteine ricombinanti in organi naturali di accumulo come semi e tuberi.

Esperimenti pionieristici sono stati condotti inizialmente in piante modello, ma più recentemente importanti specie coltivabili hanno dimostrato di essere dei sistemi efficienti di produzione (Fischer *et al.*, 2004).

1.4.4.1 Produzione di antigeni vaccinali in pianta

Sono due i principali sistemi per produrre antigeni vaccinali in pianta: la trasformazione stabile (del nucleo o del cloroplasto) e l’espressione transiente. La trasformazione stabile produce una linea genetica che può essere propagata vegetativamente o per via sessuata e rappresenta il metodo usato per l’ottenimento dei vaccini attualmente in trial clinico (Tacket *et al.*, 1998; Tacket *et al.*, 2000).

L'espressione transiente può essere ottenuta attraverso l'infiltrazione (manuale o sottovuoto) con *Agrobacterium tumefaciens* o *rhizogenes* oppure utilizzando un virus vegetale ricombinante che, provocando un'infezione che si propaga per via sistemica, induce la pianta ad esprimere l'antigene (Kapila *et al.*, 1997; Koprowski & Yusibov, 2001).

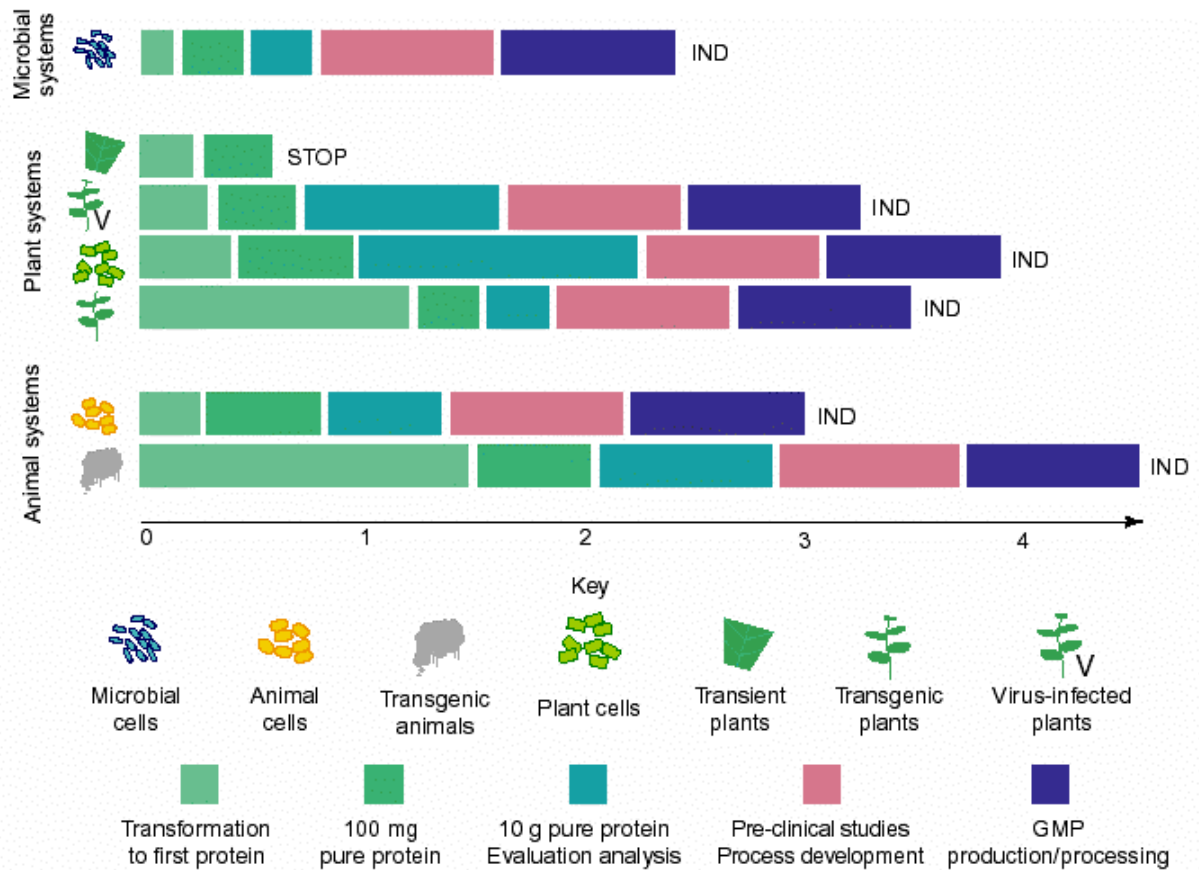


Fig. 21. Comparazione della “performance” dei differenti sistemi di produzione in pianta e le altre piattaforme commerciali per la produzione di proteine ricombinanti. Abbreviazioni: IND, “investigational new drug”. (Twyman *et al.*, 2003)

1.4.4.2 Trasformazione genetica stabile (piante transgeniche)

Come risultato della trasformazione stabile, il DNA ricombinante si integra nel genoma del nucleo o del cloroplasto.

Una delle principali scoperte che ha consentito la manipolazione delle specie vegetali è stata quella che il trasferimento di un gene nei cromosomi di una pianta può essere mediato dall'infezione con il batterio patogeno delle piante *Agrobacterium tumefaciens*. La trasformazione nucleare è spesso ottenuta utilizzando tale patogeno che, durante il processo naturale di infezione indotto dalla presenza di una lesione in un tessuto vegetale, trasferisce una copia a singolo filamento di un segmento del suo DNA (T-DNA) complessato con proteine e fiancheggiato da specifiche sequenze ripetute (“left” – “right borders”) richieste per

l'integrazione nel genoma della pianta ospite, attraverso un meccanismo simile alla coniugazione batterica (Zambryski, 1988). I ceppi di *Agrobacterium* sono stati modificati eliminando i geni della virulenza e mantenendo intatti quelli che mediano l'efficiente trasferimento del T-DNA, per cui, quando tessuti vegetali appositamente danneggiati sono in contatto con ceppi di *Agrobacterium* transgenici, si determina l'integrazione cromosomica del gene di interesse appositamente clonato nel T-DNA, in siti casuali del genoma. Tale gene è, dunque, trasferito stabilmente nel genoma della pianta ospite che può essere rigenerata per ottenere piante transgeniche con le proprietà richieste (Fig. 22).

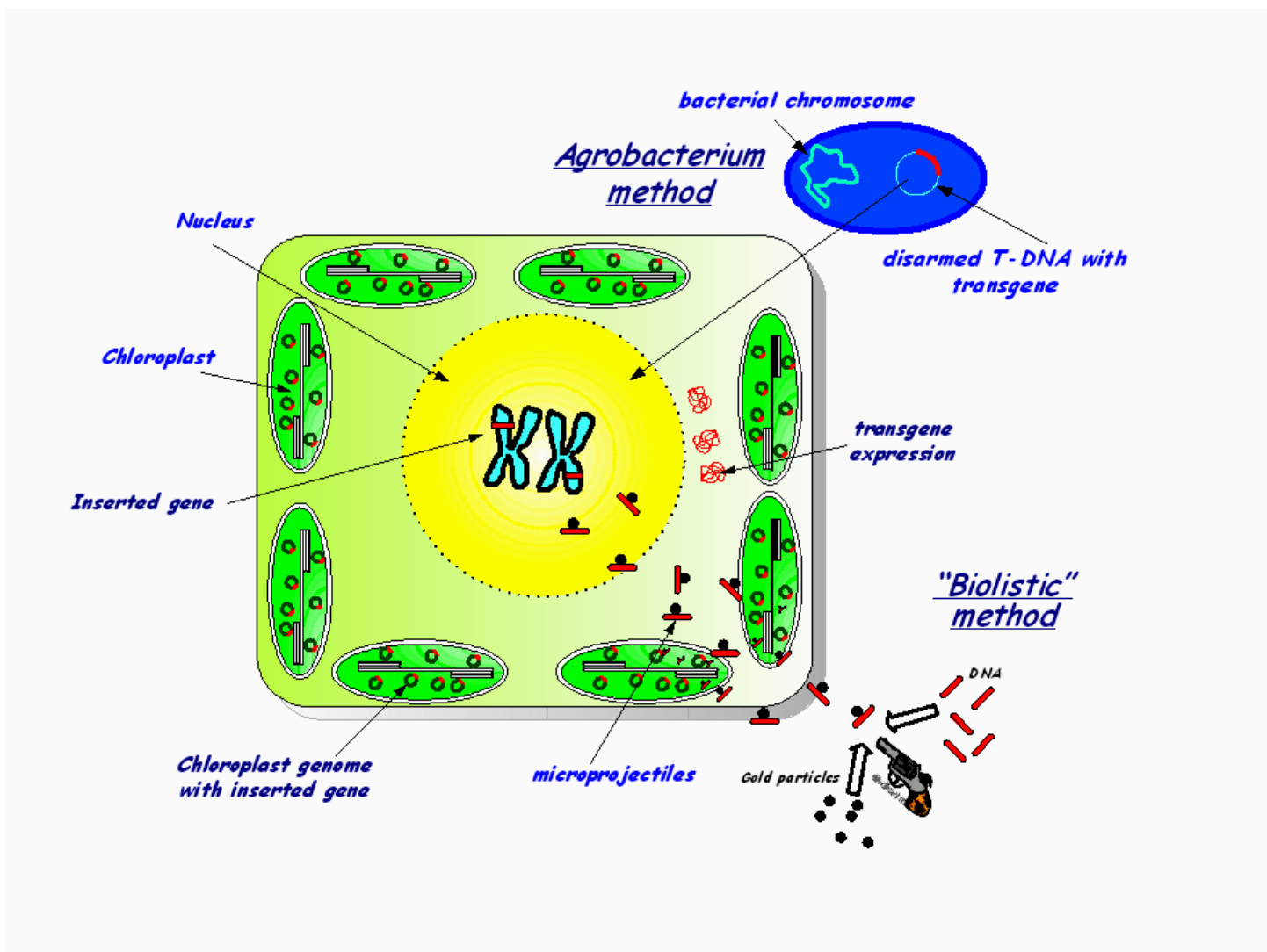


Fig. 22: Trasformazione stabile mediata da *Agrobacterium* (da Franconi & Venuti, 2005)

Tuttavia, la trasformazione mediante *Agrobacterium* non può essere utilizzata per molte specie di monocotiledoni agronomicamente importanti come la soia ed il frumento. Per queste specie, viene frequentemente utilizzato il metodo del bombardamento biolistico (Sanford *et al.*, 1993). I microproiettili sono costituiti da particelle d'oro del diametro dell'ordine dei

micron ricoperti di DNA plasmidico purificato (in cui il gene eterologo è inserito tra le sequenze “border” del T-DNA) che vengono ‘sparati’ nelle cellule vegetali con elio compresso. Attraverso i metodi di trasformazione mediata da *Agrobacterium* o dal bombardamento biolistico, il DNA estraneo si integra nel genoma nucleare producendo dei trasformanti stabili in cui il transgene è espresso e trasmesso alla progenie secondo modalità di tipo mendeliano. In generale questa tecnologia ha un limite nei bassi livelli di espressione dei transgeni integrati nel genoma (Hobbs *et al.*, 1993) e nel silenziamento genico dovuto all’inserimento nel genoma in siti casuali e multipli del transgene o a livelli particolarmente alti di espressione (Fig. 23).

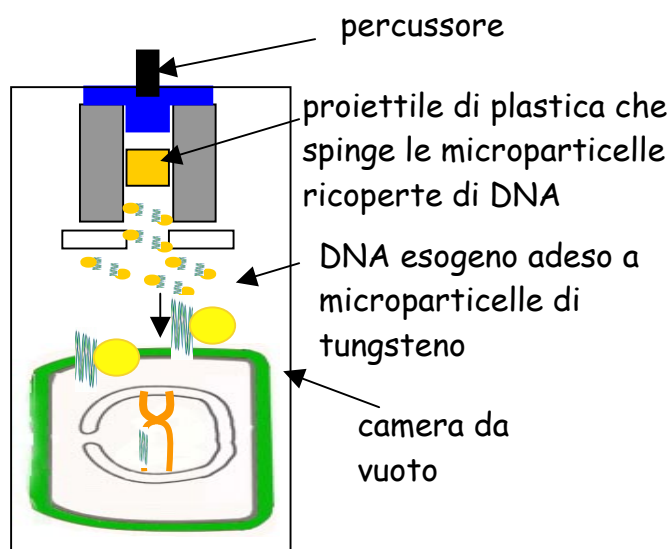


Fig. 23: Trasformazione con metodo biolistico

Il metodo biolistico è utilizzato anche per introdurre transgeni nel genoma del cloroplasto (Svab & Maliga, 1993). Le piante possiedono copie multiple di cloroplasti in ogni cellula. La trasformazione dei cloroplasti offre molteplici vantaggi, inclusi gli elevati livelli di espressione del transgene (Daniell *et al.*, 2002a), la possibilità di trasformare con più transgeni in un unico evento di trasformazione (“multi-gene engineering”) (De Cosa *et al.*, 2001; Daniell & Dingra, 2002b; Ruiz *et al.*, 2003), il contenimento del transgene nella via di eredità materna (Daniell, 2002c), l’assenza del silenziamento genico (De Cosa *et al.*, 2001) e la mancanza di effetti di posizione dovuta al fatto che l’integrazione del transgene è sito-specifica (Daniell *et al.*, 2002a). Nella trasformazione nucleare l’integrazione casuale del transgene per ricombinazione non omologa determina linee transgeniche caratterizzate da un’estrema variabilità di espressione del gene eterologo e ciò richiede lo “screening” di centinaia di eventi di trasformazione indipendenti, che, invece, non è richiesto per la selezione di linee transgeniche in cloroplasto grazie all’espressione uniforme del transgene dovuta all’integrazione sito-specifica per ricombinazione omologa tra le sequenze fiancheggianti il

transgene presenti nei vettori di trasformazione per il cloroplasto e regioni specifiche del genoma di tali organelli. L'alto numero di copie di DNA di cloroplasto in ciascuna cellula vegetale contribuisce poi ad incrementare i livelli di espressione della proteina ricombinante di interesse come già dimostrato per la subunità B della tossina colerica (CT) (Daniell *et al.*, 2001b) e per una proteina dalle proprietà insetticide espressa in cloroplasto ad un livello pari al 45% delle proteine solubili totali di foglie mature di tabacco (De Cosa *et al.*, 2001).

Molti esempi di “molecular farming” basato sul cloroplasto sono stati riportati in tabacco (dove la tecnologia per il trasferimento genico in cloroplasto è più avanzata) ed in poche altre specie. In ogni caso il potenziale della trasformazione in cloroplasto è forte anche in altre specie. Una limitazione a questa tecnologia è rappresentata dalla mancanza dei sistemi specializzati di processamento come la glicosilazione, per cui questo sistema potrebbe non essere adatto all'espressione di proteine che necessitino di queste modificazioni post-traduzionali.

“Hairy root cultures”

In alternativa alla generazione di piante transgeniche stabili mediante *Agrobacterium tumefaciens* od ai sistemi di espressione transiente, anche le colture di radici possono essere utilizzate per la produzione di proteine ricombinanti.

Agrobacterium rhizogenes, l'agente causale della sindrome della radice aerea, è un batterio Gram - comune del suolo, capace di penetrare i tessuti vegetali danneggiati e causare la proliferazione di radici secondarie. Il meccanismo alla base di questo fenomeno è il trasferimento di alcuni geni batterici nel genoma della pianta ospite, in particolare una parte di un plasmide noto come plasmide Ri (“root-inducing”).

Le radici così generate sono caratterizzate da alti tassi di crescita (0.1-2.0 g di peso secco /litro/giorno; tale tasso di crescita supera quello delle radici convenzionali ed è comparabile a quello delle colture in sospensione), anche in terreni privi di ormoni. Normalmente, infatti le colture di radici necessitano della somministrazione di fitoormoni e crescono piuttosto lentamente. Inoltre, tali organi non sono più sottoposti al geotropismo, sono geneticamente stabili e producono in maniera altrettanto stabile metaboliti secondari o composti utili come prodotti farmaceutici, per più generazioni e senza perdere stabilità genetica o biosintetica.

Una caratteristica interessante di alcune radici aeree è quella di poter secernere i metaboliti secondari prodotti nel terreno di crescita, anche se la quantità di metaboliti secondari rilasciati nel mezzo di coltura varia ampiamente da specie a specie. Le radici aeree rappresentano, quindi, un grosso valore al fine della produzione di molecole naturali a scopi commerciali.

Un altro vantaggio è rappresentato dalla possibilità della manipolazione genetica. Le radici trasformate rappresentano un'alternativa promettente per lo sfruttamento biotecnologico delle cellule vegetali. Le colture di radici trasformate rappresentano un sistema alternativo per la produzione di proteine eterologhe, poiché sono un sistema riproducibile caratterizzato da crescita più rapida delle sospensioni di colture cellulari anche in mezzi di coltura privi di regolatori della crescita. La trasformazione mediata da *Agrobacterium rhizogenes* può, inoltre, essere eseguita in modo analogo a quella mediata da *Agrobacterium tumefaciens* per cui ci si avvale di procedure ormai ben note.

Le radici trasformate di molte specie di piante sono state studiate per la produzione *in vitro* di metaboliti secondari. Linee di radici trasformate rappresentano una sorgente per la produzione standardizzata e costante anche di altri composti di interesse come, ad esempio, gli anticorpi (Wongsamuth & Doran, 1997; Sharp & Doran, 2001; Martinez *et al.*, 2005).

Come già accennato, le proteine ricombinanti espresse in colture di radice ottenute dalla trasformazione con *Agrobacterium rhizogenes* possono essere secrete nel terreno di coltura o ritenute nelle cellule. La localizzazione dipende dal “targeting” della proteina di interesse, dalla permeabilità della parete cellulare alla proteina in questione, che è funzione, principalmente, del suo peso molecolare, per cui, molecole del peso di 20-30 kD in genere riescono ad attraversare la parete cellulare, mentre proteine di dimensioni maggiori vengono ritardate proporzionalmente al peso.

Le colture di radici trasformate possono essere mantenute come colture di organo per lungo tempo, dopodiché può essere ottenuta la rigenerazione di germogli senza alcuna anomalia citologica. I rigeneranti dimostrano alti tassi di crescita e elevati livelli di formazione di gemme laterali, dimostrandosi un sistema utile per la micropropagazione di piante difficili da riprodurre.

Le radici trasformate sono, infatti, capaci di rigenerare in piante intere geneticamente stabili anche se a volte caratterizzate da un fenotipo diverso rispetto al selvatico. Un vantaggio del trasferimento genico mediato dal plasmide Ri è che la rigenerazione di radici spontanee è ottenuta senza la necessità del passaggio attraverso la fase di callo e quindi evitando il problema della variabilità somaclonale. Inoltre il trasferimento genico basato sul plasmide Ri ha un tasso di trasformazione e di rigenerazione più alti; al contrario, la trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* ha un alto tasso di “escape”.

1.4.4.3 Espressione transiente di proteine eterologhe in pianta

Il principale vantaggio nell'uso dei sistemi di espressione transiente è rappresentato dalla replicazione batterica o virale stessa, che amplifica il numero di copie del gene d'interesse e tipicamente determina un livello di espressione del gene di interesse molto più alto rispetto alla trasformazione stabile ed è specialmente vantaggiosa per specie recalcitranti alla rigenerazione; inoltre, non richiedendo l'integrazione del gene di interesse nel genoma dell'ospite, determina livelli di espressione della proteina di interesse che non sono influenzati da effetti di posizione e sono valutabili in tempi brevi; inoltre, non viene permessa la diffusione del transgene all'esterno con il polline.

Espressione transiente mediata da *Agrobacterium* (Agro-infezione).

Sono disponibili differenti sistemi per l'espressione transiente in pianta come alternativa alla trasformazione stabile. Tra questi, vi è l'infiltrazione con ceppi ricombinanti dello stesso *Agrobacterium tumefaciens* utilizzato per la generazione di piante transgeniche. Mentre per la trasformazione stabile è richiesta l'integrazione del T-DNA nel genoma dell'ospite, nel caso transiente (che si ottiene mediante agro-infiltrazione manuale o sotto-vuoto di tessuti o piante intere con sospensioni cellulari di *Agrobacterium tumefaciens* transgenici in opportune condizioni di induzione dei geni *vir*), copie di T-DNA che non si integrano, rimangono transientemente presenti nel nucleo dell'ospite e vengono trascritte per portare all'espressione transiente dei geni clonati al loro interno. (Kapila *et al.*, 1997). Il sistema di espressione transiente mediato da *Agrobacterium tumefaciens*, tuttavia, a differenza dei sistemi transienti basati sui vettori virali, non porta all'espressione sistemica del gene d'interesse. D'altra parte, però, presenta il vantaggio di poter ospitare sequenze esogene di lunghezza anche superiore a 2kb per la generazione di costrutti che sarebbero altrimenti instabili in vettori virali (Voinnet *et al.*, 2003). Un ulteriore vantaggio è rappresentato dalla possibilità, quindi, di trasformare la pianta con più di transgene, cosicché proteine multimeriche come gli anticorpi o proteine di fusione possono essere espressi ed assemblati; inoltre vi è la possibilità di co-esprimere più transgeni attraverso la co-infiltrazione con differenti colture di *Agrobacterium* mescolate. Il livello di espressione del transgene in queste condizioni di solito presenta un picco a 72 ore dall'infiltrazione e dopo declina rapidamente principalmente a causa di fenomeni di "silencing" post-trascrizionale (Kapila *et al.*, 1997; Voinnet *et al.*, 2003).

La tecnica dell'agro-infezione può essere utilizzata per produrre limitate quantità di proteina di interesse al fine di verificarne l'espressione prima di procedere alla produzione di piante transgeniche stabili, oppure per produrre elevate quantità di proteina e, dunque, come

piattaforma principale di produzione. In linea di principio, dunque, il sistema di espressione transiente mediato da *Agrobacterium* può essere applicato su scala industriale.

Espressione transiente mediata da vettori virali.

L'espressione di proteine eterologhe mediata da virus in tabacco si è dimostrata uno strumento valido e potente per la produzione di proteine a valore farmaceutico come anticorpi e vaccini a sub-unità rispetto alla tecnologia della trasformazione stabile che richiede tempo per la rigenerazione di piante transgeniche (Koprowski & Yusibov, 2001, Awram *et al.*, 2002). Il gene codificante per la proteina di interesse è clonato nel genoma virale che quindi viene utilizzato per l'infezione di piante ospiti all'opportuno stadio di crescita. Il virus così ingegnerizzato si diffonde e si replica, e come conseguenza, numerose copie del gene eterologo sono prodotte dalla pianta ospite ed alti livelli di espressione vengono raggiunti in un periodo di tempo relativamente breve (*Fig. 24*). I vettori virali presentano molti vantaggi come la rapidità di espressione, le alte rese, i costi ridotti. Inoltre, essi non sono diffusi dal polline, impedendo così la contaminazione di altre piante con il gene di interesse. In più, nei casi in cui il gene eterologo codifica per un prodotto tossico o che interferisce con il metabolismo della pianta (e che, dunque, non potrebbe essere espresso in piante transgeniche stabili), l'espressione mediata da virus vegetali rappresenta la sola possibilità di esprimere il gene di interesse. Tuttavia, il sistema dei virus vegetali può essere inficiato dall'instabilità del costrutto che può portare alla perdita del gene se questo è più grande di 1 kb. Inoltre la necessità di inoculare singolarmente ogni pianta fa della produzione su larga scala un lavoro piuttosto intenso.

Sostanzialmente, vettori virali efficienti consistono di virus pienamente funzionali che, di solito, si comportano come il virus selvatico e, dunque, mantengono l'infettività, sono stabili, hanno la capacità di diffondersi sistemicamente nella pianta ospite (generalmente in due-tre settimane) e producono particelle virali infettive, ma sono stati modificati in modo da poter sostenere il clonaggio e consentire l'espressione del gene che codifica per la proteina eterologa di interesse. Inoltre, in molti casi, è possibile incrementare i livelli di proteina espressa semplicemente effettuando più re-infezioni nello stesso o in un altro ospite utilizzando gli estratti di piante infette (*Fig. 24*). I vettori derivati da virus vegetali sono basati principalmente su virus ad RNA come il virus del mosaico del tabacco (TMV) ed il virus X della patata (PVX). A volte, come nel caso di PVX, sono già disponibili i DNA plasmidici contenenti il cDNA del virus vegetale. Alcune caratteristiche di PVX, come l'assenza di vettori animali e l'ampio spettro d'ospite, ne fanno uno strumento sicuro per l'espressione

transiente in pianta (Chapman *et al.*, 1992). L'uso dei vettori virali basati sui virus vegetali ad RNA è limitato dalla comprensione non ancora completa dei meccanismi di replicazione virali e dalle limitazioni che geni clonati al loro interno possono infliggere all'efficienza di replicazione. Molti sono stati i tentativi di incrementare l'efficienza di produzione di proteine eterologhe migliorando i vettori stessi o le piante ospiti (Gleba *et al.*, 2004).

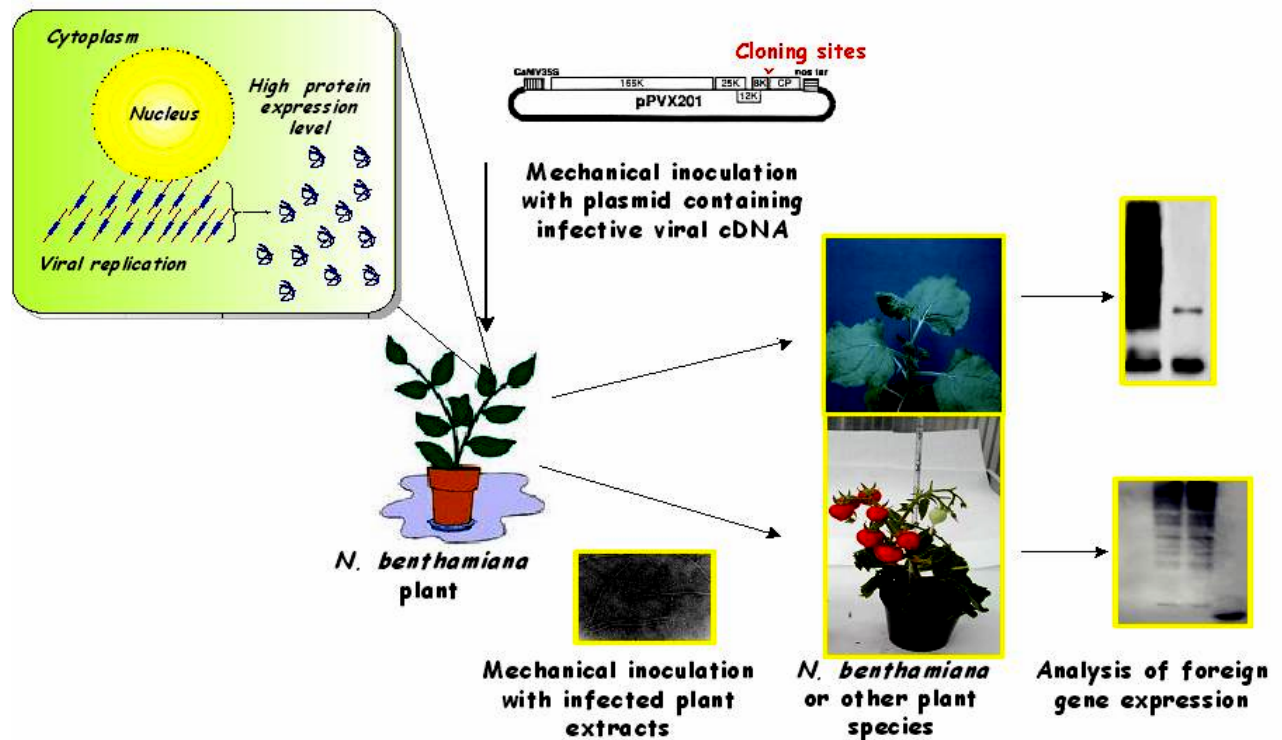


Fig. 24: Espressione transiente mediata da vettori virali (PVX) (da Franconi & Venuti, 2005).

1.4.4.4 Ottimizzazione dell'espressione della proteina eterologa

Per ottimizzare i livelli di espressione transiente o stabile, sia la trascrizione del gene che la traduzione del messaggero devono essere massimizzate. Inoltre, sequenze segnale possono essere usate per indirizzare la proteina per l'accumulo in regioni specifiche della cellula o in specifici tessuti.

Il sistema endomembranoso della cellula rappresenta un ambiente più adatto al ripiegamento ed all'assemblaggio delle proteine rispetto al citosol. Il reticolo endoplasmatico (RE) offre un ambiente ossidante e abbondanza di "chaperone" (come le BiP), e poche proteasi. In assenza di altri segnali di indirizzamento, la proteina espressa viene secreta nell'apoplasto. In funzione del peso molecolare, la proteina può essere ritenuta all'interno delle cisterne o fuoriuscire dalla cellula, con importanti implicazioni nel caso dell'allestimento di sistemi di produzione basati su colture cellulari in sospensione o di radici. Indirizzare una proteina di interesse verso

la secrezione potrebbe anche determinare la sua essudazione dalle radici o dalle foglie, e la rizosecrezione consentirebbe di estrarre più facilmente le proteine rispetto all'essudazione dalle foglie.

I livelli di espressione possono essere aumentati anche ulteriormente se la proteina è ritenuta nel lume del reticolo endoplasmatico aggiungendo il tetrapeptide H/KDEL alla sua estremità C-terminale (Twyman *et al.*, 2003). Le molecole che vengono ritenute in questo comparto sub-cellulare non vengono modificate nell'apparato di Golgi.

Esistono comunque delle differenze nelle modificazioni post-traduzionali operate nelle piante rispetto ai mammiferi. In effetti solo i primi eventi relativi al processo di glicosilazione sono simili in piante ed animali. Le proteine umane ricombinanti derivate da pianta tendono ad avere residui di xilosio e fucosio assenti nei mammiferi, e mancano dei residui terminali di galattosio ed acido sialico che invece si ritrovano in molte glicoproteine native umane. Le molecole ritenute nel reticolo endoplasmatico presenteranno residui di mannosio ma non i residui specifici di pianta xilosio e fucosio. Recentemente è stato dimostrato che è possibile manipolare specifiche glicosiltransferasi nelle cellule vegetali per ottenere "pattern" di glicosilazione simili a quelli umani su proteine ricombinanti (Gomord & Faye, 2004). In ogni caso è possibile che nella formulazione di vaccini in pianta più efficaci, le catene di glicani che derivano dalle modificazioni post-traduzionali della proteina di interesse sintetizzata in pianta rappresentino più un vantaggio che un inconveniente. Infatti, è stato dimostrato che gli N-glicani di pianta sono immunogenici per l'uomo (Bardor *et al.*, 2003). Altri approcci consistono nell'introduzione di sequenze di indirizzamento al cloroplasto od al vacuolo. In questo modo, proteine potenzialmente tossiche per la pianta ospite potrebbero essere più facilmente espresse.

Molteplici aspetti vanno, inoltre, tenuti in considerazione nella scelta di una specie vegetale ospite per la produzione di una proteina ricombinante (Menkhaus *et al.*, 2004). Il sistema di espressione più appropriato deve essere scelto caso per caso: alcune piante ospiti possono accumulare naturalmente una maggior quantità di proteina di altre oppure possono produrre il prodotto appropriato mentre altre falliscono in questo proposito. Inoltre, va considerata la differenziale presenza e localizzazione nella pianta o nella cellula, di proteasi.

Nicotiana tabacum è una specie dicotiledone che rappresenta un sistema di espressione ben conosciuto nell'ambito del "molecular farming" (Fischer *et al.*, 2004). Il principale vantaggio offerto da questa specie include l'esistenza di una tecnologia di trasferimento genico ben stabilita sia per la trasformazione transiente che per quella nucleare o del cloroplasto, alte rese di biomassa, abbondanza nella produzione di semi e la possibilità di realizzare ultrastrutture

per il processamento su larga scala. Inoltre, non trattandosi di una specie destinata all'alimentazione dell'uomo od alla realizzazione di mangimi animali, il rischio che materiale vegetale proveniente da piante esprimenti proteine eterologhe possa contaminare la catena alimentare, è pressoché inesistente. La composizione chimica della foglia è significativamente diversa fra le differenti varietà: molte di queste hanno un elevato contenuto in alcaloidi, ma varietà a basso contenuto di questi composti possono essere utilizzate per la produzione di proteine a valore farmaceutico. La foglia di questa specie, dato l'abbondante numero prodotto per pianta, rappresenta l'organo principale per la raccolta delle proteine eterologhe che vengano espresse. Le foglie fresche, infatti, sono di solito raccolte ed omogenizzate per l'estrazione delle proteine. In alternativa, le proteine ricombinanti (tra cui anche anticorpi), sono state prodotte in colture cellulari. Tale specie è stata adottata da molte compagnie che si occupano di biotecnologie, ed almeno due di queste (Placet Biotechnology Inc. e Meristem Therapeutics) hanno prodotto farmaci derivati da pianta attualmente in trias clinico di fase II.

1.4.4.5 Vaccini edibili

Uno dei principali svantaggi della somministrazione orale (che potrebbe limitare l'uso dei vaccini orali vegetali a subunità ai soli basati su antigeni stabili nell'apparato digerente o incapsulati), è rappresentato dalla possibile degradazione dell'antigene nell'apparato gastro-intestinale. A tal riguardo, l'uso di sistemi di espressione vegetali consente l'accumulo intracellulare dell'antigene nella cellula vegetale che provvede di per sé ad un guscio protettivo grazie alla presenza della parete cellulare. In effetti, attualmente, i vaccini edibili sono considerati più stabili nell'ospitale ambiente del lume gastro-intestinale rispetto ad antigeni vaccinali purificati (Daniell, 2001a). Inoltre, il vettore d'espressione virale utilizzato per l'espressione nella pianta ospite può essere ingegnerizzato in modo da indirizzare l'accumulo della proteina di interesse in specifici compartimenti sub-cellulari dove essa può accumulata in condizioni ancora più stabili (Walmsley & Arntzen, 2000). In piante transgeniche di patata è stato sviluppato un vaccino a più componenti che esprime fusioni della tossina colerica con due differenti antigeni, uno virale e l'altro batterico in grado di fornire protezione contro le corrispondenti infezioni (Yu & Langridge, 2001). Recentemente, la subunità B della tossina labile (LT-B) di ceppi enterotossici di *E. coli* è stata espressa ad elevati livelli in mais e, somministrata attraverso l'assunzione alimentare della stessa cariosside, ha indotto una risposta immune protettiva (Streatfield *et al.*, 2001). La LT-B prodotta in mais, inoltre, è in grado di elicitare una risposta immune mucosale più alta rispetto a quella ottenuta alimentando i topi con LT-B prodotta in batterio, probabilmente proprio

perché l'antigene prodotto in pianta e somministrato con la cariossida è protetto dalla degradazione nel tratto gastro-intestinale (Streatfield *et al.*, 2001). Dunque questi risultati sostengono l'idea di vaccini vegetali che hanno un intrinseco potere adiuvante e che consentono di presentare l'antigene di interesse al sistema immune mucosale in modo efficace.

I vaccini edibili derivati da pianta non sono comunque destinati ad essere somministrati senza essere processati poiché è necessario ottenere dosi uniformi e stabili con un contenuto di antigene ben definito. Come già ricordato la protezione dell'antigene dalla degradazione nel tratto gastro-intestinale è necessaria per una somministrazione efficace e dovrebbe essere garantita dalla stessa matrice del tessuto vegetale nel caso dell'assunzione orale di vaccini derivati da pianta, sebbene il processamento anche solo parziale del materiale vegetale potrebbe ridurre la protezione offerta dalla parete cellulare.

Sono da considerare importanti problematiche riguardanti l'immunità mucosale, tra cui la possibilità di indurre tolleranza con la somministrazione orale dell'antigene che, tuttavia, potrebbe probabilmente essere evitata incrementando i livelli di espressione e quindi il contenuto di antigene nelle dosi (riducendo, così, il numero di richiami), oppure impiegando opportuni adiuvanti. Un'altra questione da considerare, tanto più nel caso dello sviluppo di vaccini anti-tumorali a somministrazione orale, è la necessità di indurre un'immunità di tipo cellulo-mediato. Formulando il vaccino con un adiuvante opportuno o ingegnerizzando l'antigene in modo che esso venga indirizzato verso APC professioniste, potrebbe essere possibile superare l'apparente limite dell'immunizzazione mucosale rappresentato dall'induzione della sola risposta immune di tipo umorale.

Immunità mucosale

Una volta superata la barriera intestinale, il vaccino somministrato per via orale deve essere in grado di indurre una risposta immune da parte del sistema immune mucosale che saggia gli antigeni giunti in sede intestinale e protegge gli epitelii che rivestono il tratto gastro-intestinale, respiratorio e urogenitale (Ogra *et al.*, 2001).

I tessuti linfoidei intestinali organizzati, tra cui le placche di Peyer (PP), l'appendice ed i linfonodi intestinali, collettivamente chiamati tessuti linfoidei associati all'intestino (GALT), ed i tessuti linfo-reticolari associati al rinofaringe (NALT) contengono tutte le popolazioni di cellule immuno-competenti incluse le cellule B, Th e CTL necessarie per lo sviluppo di cellule B memoria e cellule T a seguito di presentazione dell'antigene da parte delle DC e dei macrofagi.

La superficie delle PP è rivestita da un epitelio monostratificato noto come epitelio follicolo-associato (FAE), ricco di cellule specializzate nel saggiare gli antigeni chiamate cellule M (“microfold cells”) per la presenza di microvilli brevi ed irregolari sulla loro membrana apicale (Owen & Jones, 1974). Le cellule M formano al sito della membrana basale una sorta di tasca contenente cellule T e B, macrofagi e DC. Si ritiene che l’antigene captato dalle cellule M non sia degradato ma da esse trasportato, intatto, verso le sottostanti APC (Owen & Bhalla, 1983) che lo processano e lo presentano alle cellule Th e CTL. Le cellule M trasportano preferenzialmente antigeni particolati come virus e batteri dal lume intestinale al follicolo sottostante, e sono considerate la ‘porta d’ingresso’ verso il sistema immune mucosale. Sono state descritte almeno due sub-popolazioni di DC nell’ambito delle PP: La popolazione DC1 è in grado di indurre risposte immuni cellulo mediate (Th1), mentre la popolazione DC2 induce cellule Th2 per la generazione di IgA (Banchereau *et al.*, 2000; Iwasaki & Kelsall, 2001). Le risposte immuni mucosali sono appunto caratterizzate dalla produzione di IgA secretorie che vengono trasportate attraverso l’epitelio fino alla superficie mucosale del lume intestinale dove agiscono come prima linea di difesa contro la colonizzazione e l’infezione da parte di patogeni legandosi alle cellule batteriche o alle particelle virali ed impedendone l’interazione con i recettori delle cellule di rivestimento della superficie mucosale del lume intestinale. Le PP sono anche popolate da cellule B in grado di produrre IgG sieriche (Ogra *et al.*, 2001). Dunque, in linea di principio, l’ingestione di materiale vegetale contenente un antigene vaccinale può determinare la produzione di specifiche IgA mucosali ed IgG sieriche protettive e la generazione di risposte immuni cellulo-mediate contro il patogeno che espone tale antigene.

Gli organi edibili di specie da frutto ed ortaggi potendo essere consumati senza essere cotti, senza essere processati o processati solo parzialmente, rappresentano un sistema ideale per la produzione di biofarmaceutici ricombinanti. *Solanum tuberosum* è stata frequentemente usata come utile sistema modello poiché linee transgeniche per un dato gene possono essere facilmente ottenute mediante trasformazione con *Agrobacterium*. Tali piante sono state utilizzate per l’espressione di varie proteine e rappresentano finora il principale sistema per la produzione di vaccini edibili in pianta. Tuberi transgenici sono stati somministrati a volontari in almeno tre differenti trias clinici.

Tuttavia si rende necessario un sistema più appetibile per la somministrazione orale, dal momento che il vaccino andrebbe consumato crudo per impedire la degradazione mediata dal calore dell’antigene.

Lactuca è stata utilizzata come ospite per la produzione di vaccini ricombinanti edibili in una serie di trias clinici per un vaccino a subunità contro l'epatite B (Kapusta *et al.*, 1999). Uno dei principali svantaggi nell'uso di varietà con foglie è la sintesi della proteina eterologa in ambiente acquoso e quindi instabile che può determinare basse rese. Le foglie devono quindi essere congelate o disidratate per poter essere trasportate o processate immediatamente dopo la raccolta ed estrarre quantità utili di prodotto. Al contrario. L'accumulo della proteina ricombinante nei semi (si pensi alle varietà cerealicole ed alle leguminose) consente la conservazione a lungo termine del prodotto a temperatura ambiente. I semi sono infatti in grado di accumulare proteine per mezzo di compartimenti di accumulo specializzati (corpi proteici e vacuoli), che derivano dalle strutture della via di secrezione ed in cui le proteine sono protette dalla degradazione proteolitica. Dunque, le varietà da seme possono essere prodotte in grandi quantità, protette e trasportate anche a lunga distanza a temperatura ambiente consentendo un più ampio serbatoio per la vaccinazione mondiale.

Pomodoro (*Lycopersicon esculentum*) rappresenta, a tal proposito, un sistema più appetibile e presenta anche altri vantaggi, tra cui l'elevata biomassa e la possibilità del contenimento in serra. Questo sistema è stato utilizzato per esprimere la proteina di fusione del virus respiratorio sinciziale che si è rivelata immunogenica quando somministrata oralmente (Sandhu *et al.*, 2000).

Altre specie come carota e banana o varietà olearie stanno emergendo come specie edibili promettenti dal punto di vista del "molecular farming", rispettivamente per la possibilità di essere consumate crude o coltivate nei Paesi in via di sviluppo o per la semplicità di estrazione delle proteina eterologa espressa attraverso i corpi oleosi (Seon *et al.*, 2002).

Gli studi condotti su modelli animali hanno dimostrato che l'ingestione di materiale vegetale transgenico contenente proteine vaccinali determina la produzione di anticorpi antigene-specifici nel siero e nelle secrezioni mucosali (Mason *et al.*, 1998).

1.4.4.6 "Trials" clinici con vaccini derivati da pianta

Ad oggi, sono stati pubblicati i risultati di cinque studi clinici riguardanti l'immunizzazione con vaccini derivati da pianta nell'uomo. Ciascuno si basa su modalità di somministrazione orali ed ha riportato la stimolazione di anticorpi circolanti e/o di anticorpi mucosali.

Due studi tra questi riguardano la somministrazione di vaccini edibili contro la subunità B della tossina labile (LT-B) di ceppi enterotossici di *E. coli*. Tra l'altro, il primo tra questi due studi, rappresenta il primo studio clinico in assoluto sull'uomo basato sulla somministrazione di un vaccino derivato da piante transgeniche.

14 volontari hanno ingerito 100 o 50 g di tuberi di piante di patate transgeniche esprimenti LT-B, oppure 50 g di tuberi di piante non transgeniche. Il contenuto di tossina nei tuberi era compreso tra 3.7 e 15.7 $\mu\text{g/g}$ di tubero. Una seconda somministrazione è stata effettuata a 7 giorni dalla prima, ed una terza somministrazione a 14 giorni dalla seconda. A seguito della vaccinazione, i volontari avevano riportato solo piccoli effetti collaterali (nausea o crampi), ed avevano ben tollerato l'ingestione del tubero crudo. Al termine dello studio, 10 degli 11 volontari che avevano ingerito i tuberi transgenici, avevano sviluppato un incremento pari a quattro volte dei titoli di IgG sieriche neutralizzanti contro LT-B, mentre nessuno dei volontari che avevano ingerito il placebo ha mostrato alcuna variazione dei titoli anticorpali contro LT-B. Inoltre 5 dei 10 volontari responsivi, hanno mostrato un incremento pari a 4 volte dei titoli di IgA anti -LT-B (Tacket *et al.* 1998). Lo stesso gruppo ha riportato uno studio clinico più recente dai risultati simili, basato sulla somministrazione di LT-B in semi parzialmente processati di mais transgenico (Tacket *et al.*, 2004).

E' stato riportato un altro studio clinico sull'uomo basato sulla somministrazione di tuberi di patate transgeniche esprimenti il gene della proteina capsidica del virus Norwalk (NVCP), la quale è in grado di assemblare in VLP. Venti volontari adulti hanno ingerito due o tre dosi da 150 g di tuberi crudi di patate transgeniche contenenti 215-750 μg di NVCP. Poiché solo il 50% delle subunità di NVCP aveva dimostrato di assemblare in VLP in preparati allestiti dallo stesso materiale somministrato ai volontari (probabilmente a causa dei bassi livelli di espressione del transgene), la dose effettiva di antigene somministrato è stata, quindi, pari alla metà del contenuto stimato (125-375 $\mu\text{g/dose}$). Le subunità non assemblate, infatti, sono probabilmente meno stabili nel tratto gastro-intestinale e dunque meno immunogeniche. In ogni caso, 19 dei 20 soggetti vaccinati ha dimostrato un incremento significativo nei livelli di cellule produttrici IgA contro NVCP, e 6 soggetti su 20 hanno incrementato la popolazione di cellule secernenti IgG. 4 volontari hanno inoltre dimostrato un incremento nei titoli di IgG circolanti contro NVCP, 4 soggetti un incremento nei titoli di IgM, e 6 volontari hanno mostrato un incremento pari a 17 volte dei livelli di IgA.

Sebbene le risposte anticorpali generate da questo vaccino non siano state impressionanti come nel caso della LT-B, tale studio dimostra comunque come, un antigene prodotto in pianta non in grado di replicarsi e diverso dalla tossina enterotossica LT-B o dalla tossina colerica (note come potenti immunogeni orali), sia in grado di stimolare risposte immuni dopo somministrazione orale (Tacket *et al.*, 2000).

Studi più recenti effettuati in frutti di pomodoro transgenici esprimenti una versione ottimizzata del gene per NVCP, hanno mostrato elevati livelli di espressione e risposte immuni più potenti rispetto allo studio in tuberi di patata in topi alimentati con frutti liofilizzati somministrati in capsule di gelatina (Kirk *et al.*, 2004).

E' stato pubblicato un lavoro riguardante l'immunogenicità nell'uomo dell'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) espresso in pianta e somministrato oralmente (Kapusta *et al.*, 1999). Due dei tre volontari che avevano assunto due dosi da 150 g di lattuga transgenica contenenti circa 1-2 µg di HBsAg / dose, hanno sviluppato, dopo la seconda dose, un titolo anticorpale nel siero che può ritenersi protettivo, ma che è declinato rapidamente dopo 4 settimane, probabilmente a causa del contenuto estremamente basso di antigene.

Un altro studio clinico ha valutato l'immunogenicità di HBsAg somministrato oralmente con patate transgeniche in 33 soggetti già siero convertiti che avevano ricevuto in precedenza il vaccino convenzionale iniettabile anti-epatite B derivato da lievito. I volontari hanno ingerito due o tre dosi da 100 g di tuberi di patate transgeniche contenenti approssimativamente 1mg di HBsAg / dose e più del 50% di essi ha mostrato un significativo innalzamento dei titoli di IgG anti HBsAg (Thanavala, Mason and Arntzen, risultati non pubblicati). In precedenza, lo stesso gruppo aveva riportato la stimolazione di risposte anticorpali (produzione di tutte le classi di IgG e IgM specifiche nei confronti dell'antigene) in proporzioni simili al vaccino convenzionale da parte dell'Antigene HBsAg purificato da pianta (Thanavala *et al.*, 1995)

Tali risultati, insieme, suggeriscono che la somministrazione orale di HBsAg prodotto in pianta rappresenta un sistema efficace per la realizzazione di un richiamo vaccinale

Yusibov e collaboratori hanno somministrato a 14 volontari epitopi della glicoproteina e della nucleoproteina del virus della rabbia fusi alla coat protein del virus del mosaico di alfalfa (AIMV) contenuti in fogli di spinaci transgenici. 5 dei 14 soggetti avevano precedentemente ricevuto un vaccino anti-rabbia convenzionale. 3 di questi 5 soggetti e tutti e 9 i volontari naive rimanenti, hanno sviluppato risposte anticorpali significative contro gli epitopi virali. A 7 giorni dall'ultima somministrazione orale di vaccino vegetale, i 9 soggetti inizialmente naive sono stati vaccinati con la formulazione convenzionale del vaccino anti-rabbia, e tre di essi hanno prodotto anticorpi neutralizzanti (Yusibov *et al.*, 2002). Questi dati dimostrano come il vaccino anti-rabbia di origine vegetale somministrato oralmente possa rappresentare, ancora una volta, un vaccino "di rinforzo" per quello convenzionale.

Attualmente circa 60 anticorpi diversi sono in clinical trial, a dimostrazione della crescente importanza ed applicazione medica di queste molecole. Le piante offrono un'alternativa alla

tecnologia dell'ibridoma, alle colture di cellule di mammifero, di lievito o batteriche per meglio soddisfare la richiesta di una produzione su larga scala. Le piante hanno dimostrato di poter produrre diversi anticorpi “full length” oppure loro frammenti (Warzecha & Mason, 2003).

Un ultimo esempio di studio clinico è, appunto, sostenuto dalla produzione in tabacco di un anticorpo chimerico secretorio contro *Streptococcus mutans* e *sobrinus*, gli agenti causali della carie dentaria. Tale anticorpo prodotto in pianta (CaroRx) è attualmente in corso di valutazione in “trial” clinico di fase II ed ha confermato la sua efficacia nell'uomo in assenza di effetti tossici contro la parte murina della molecola (Ma *et al.*, 1998).

Per una panoramica sulle principali proteine a valore farmaceutico prodotte in pianta, si rimanda alla *Tab. 5*

Product	Medical condition treated by the drug	Source	Status
Vaccines			
<i>E. coli</i> heat labile toxin	Diarrhea	Maize, potato	Two independent phase I trials
HBsAg	Hepatitis B	Lettuce, potato	Two independent phase I trials
Norwalk virus capsid protein	Sickness and diarrhea	Potato	Phase I trials
Rabies glycoprotein	Rabies	Viral vectors in spinach	Phase I trials
Antibodies			
LSBC scFVs	Non-Hodgkin's lymphoma	Viral vectors in tobacco	At least 12 personalized antibodies submitted for phase I trials
Avicidin	Colorectal cancer	Transgenic maize	Withdrawn from phase II trials in 1998
CaroRX	Dental caries	Transgenic tobacco	Phase II trials
Other products			
Gastric lipase	Cystic fibrosis, pancreatitis	Transgenic maize	Phase II trials
Human intrinsic factor	Vitamin B12 deficiency	Transgenic <i>Arabidopsis</i>	Phase II trials
Lactoferrin	Gastrointestinal infections	Transgenic maize	Phase I trials

Tab. 5: Principali proteine a valore farmaceutico in “trial” clinico (Ma et al., 2005)

1.4.4.7 Vaccini anti-cancro derivati da pianta

Alcuni presidi biomedici anti-tumorali sono già stati prodotti utilizzando l'espressione transiente mediata da vettori virali sono attualmente in corso di valutazione (Awram *et al.*, 2002). Tra questi un epitopo tumorale scFv tumore-specifico derivante da un linfoma a cellule B murino è stato prodotto ad elevati livelli in piante di *Nicotiana benthamiana* e secreto in forma correttamente ripiegata in ambiente extracellulare (attraverso la fusione con una sequenza segnale derivata da pianta) utilizzando un vettore TMV modificato (McCormick *et al.*, 1999). In effetti, l'elicitazione di una risposta specifica anti-idiotipo per una efficace vaccinazione contro tale forma di tumore, si basa sulle immunoglobuline espresse sulla superficie delle cellule tumorali. Tuttavia, la produzione di immunoglobuline tumorali

personalizzate per ogni paziente e' laboriosa e richiede tempo. Il sistema citato ha consentito di ottenere in poche settimane un scFv purificato in forma correttamente ripiegata e funzionale che, somministrato per via sotto-cutanea come vaccino terapeutico, ha indotto una risposta immune anti-idiotipo ed ha protetto i topi dalla sfida con dosi letali di cellule tumorali singeniche. E' interessante notare che gli animali immunizzati con il solo scFv purificato da pianta senza l'aggiunta di alcun adiuvante hanno dimostrato elevati livelli di protezione statisticamente equivalenti a quelli mostrati dagli animali immunizzati con il scFv insieme all'adiuvante QS-21 (McCormick *et al.*, 1999) indicando che, sia l'appropriata conformazione, sia qualche altro fattore ancora sconosciuto fornito dall'espressione in pianta, migliora l'efficacia dell'immunogeno. Lo stesso effetto adiuvante è stato ottenuto quando altri scFv umani (ottenuti da biopsie tumorali, prodotti in pianta e purificati dalla frazione interstiziale) sono stati testati in un modello murino per l'appropriata risposta anti-idiotipo (McCormick *et al.*, 2003). Tale vaccino è attualmente in "trial" clinico di fase I.

Questo esempio rafforza l'idea dell'uso delle piante come sistema d'espressione su larga scala, anche se fa sorgere problematiche riguardanti l'impatto ambientale dell'uso di patogeni vegetali ingegnerizzati e del loro possibile trasferimento a specie da coltivazione. Queste considerazioni potrebbero essere controbattute con l'impiego di misure di contenimento

Altri due lavori riportano di un antigene coloretale (GA733-2) e del corrispondente anticorpo prodotti in *Nicotiana benthamiana* utilizzando un vettore basato su TMV. L'antigene derivato da pianta e purificato è stato in grado di stimolare la proliferazione di cellule T antigene-specifiche ed ha mostrato un certo effetto adiuvante (Verch *et al.*, 1998; Verch *et al.*, 2004).

Questo studio ha comparato i risultati dell'immunizzazione con o stesso antigene espresso in pianta o in cellule di insetto, dimostrando che la risposta immune umorale generata dall'antigene prodotto in piante di tabacco è stata simile a quella generata dallo stesso antigene prodotto in cellule di insetto. Alcune lievi differenze sono state osservate nelle caratteristiche della risposta immune cellulo-mediata che potrebbero essere dovute a qualche impurezza nella preparazione

1.4.4.8 Vaccini profilattici derivati da pianta contro HPV

Gli studi clinici condotti contro il virus Norwalk e contro l'antigene di superficie dell'epatite B (le cui proteine ricombinanti del capsido hanno proprietà auto-assemblanti come nel caso degli HPV), hanno dimostrato la formazione delle VLP rispettivamente nei tuberi e nelle foglie delle piante transgeniche di patata o di lattuga esprimenti i succitati antigeni. Tali VLP possono essere efficientemente campionate dalle cellule M dell'intestino mimando particelle

virali vere, hanno dimostrato di reagire con sieri di pazienti infetti e di resistere alla degradazione nel tubo digerente (Ball *et al.*, 1999). In effetti, affinché un antigene somministrato tramite vaccinazione orale sia in grado di indurre una risposta immune, è necessario che esso venga presentato alle cellule M intatto e con una configurazione conservata rispetto al virione nativo; per ciò è necessario innanzitutto che l'antigene sia in grado di auto-assemblare in capsomeri in pianta VLP e che tali particelle restino intatte nel tubo digerente. In generale, si può assumere che la resistenza della parete cellulare delle cellule vegetali fornisca un ambiente protetto per gli antigeni espressi in pianta. Si può dunque supporre che la produzione di un vaccino edibile derivato da pianta e rivolto contro il papillomavirus sia attuabile. D'altra parte è stato già dimostrato che gli antigeni capsidici di papillomavirus sono immunogenici quando somministrati oralmente (Rose *et al.*, 1999; Gerber *et al.*, 2001) molto probabilmente perché sono riconosciuti dal sistema immune per via della struttura simile a quella di virioni nativi.

Vari studi recenti hanno dimostrato che VLP di HPV possono essere prodotte in una varietà di piante, tra cui tabacco, patata e pomodoro (Biemelt *et al.*, 2003; Varsani *et al.*, 2003; Warzeka *et al.*, 2003).

La proteina maggiore del capsido di HPV, dopo l'individuazione e la rimozione di sequenze interne di poliadenilazione o di "splicing", ed altre sequenze destabilizzanti il messaggero, è stata espressa in piante transgeniche di tabacco, e localizzata nel nucleo. E' stata poi prodotta in piante di patata una versione ottimizzata per l'uso dei codoni in pianta con e senza sequenza di localizzazione nucleare (NLS). L'espressione della proteina L1 "full length" sembra influenzare la vitalità dei rigeneranti, mentre la rimozione della NLS sembra consentirne l'espressione e l'assemblaggio in VLP. La proteina L1 espressa in pianta conserva le proprietà immunologiche degli HPV nativi e l'ingestione di proteina in tuberi crudi è associata ad una risposta immune anti-HPV qualitativamente molto simile a quella promossa da VLP ricombinanti purificate da cellule di insetto somministrate per via parenterale, ed è in grado di indurre memoria immunologica specifica (Warzeka *et al.*, 2003).

In un altro lavoro, l'ottimizzazione dell'uso dei codoni non ha prodotto alcuna espressione della proteina L1 (Biemelt *et al.*, 2003). Un altro studio in *Nicotiana tabacum* ha poi dimostrato che non è necessario modificare significativamente il gene L1 per ottenere l'espressione di VLP di HPV in pianta (Varsani *et al.*, 2003). I principali problemi correlati con l'espressione della proteina L1 di HPV sembrano essere rappresentati dalla sua tossicità per la pianta ospite, che determina bassi livelli di espressione e basse rese di produzione in termini di VLP o capsomeri prodotti per grammo di materiale vegetale.

1.4.4.9 Vaccini terapeutici derivati da pianta contro HPV

I nostri dati recenti indicano che un effetto adiuvante è ottenuto anche dopo immunizzazione con estratti crudi di *Nicotiana benthamiana* contenenti la proteina E7 di HPV16. Abbiamo dimostrato, infatti, che oltre ad indurre una risposta immune anticorpale, tale vaccino formulato in pianta senza adiuvanti è in grado di elicitarne anche una risposta immune di tipo Th1 in un modello murino (Franconi *et al.*, 2002).

Abbiamo, infatti, ottenuto con successo l'espressione transiente della proteina E7 di HPV 16 in piante di *Nicotiana benthamiana*, utilizzando un vettore derivante, dal PVX. Topi immunizzati con l'estratto crudo di foglia (che ha dimostrato di non avere effetti tossici sugli animali in esperimenti preliminari) somministrato per via sub-cutanea, hanno sviluppato alti titoli di IgG totali ed IgG2a contro E7 e la selezione di cloni CTL E7-specifici. Tale vaccino è stato, dunque, in grado di indurre una potente risposta cellulo-mediata ed ha fornito protezione dallo sviluppo di tumore dopo sfida con una dose tumorigenica di cellule esprimenti E7 (circa il 40% degli animali immunizzati sono risultati protetti). I dati ottenuti hanno dato, inoltre, indicazioni che tale vaccino derivato da pianta possiede un intrinseco potere adiuvante poiché la protezione indotta dal solo estratto di pianta contenente la proteina E7 si è dimostrata paragonabile a quella prodotta da elevate quantità di proteina ricombinante purificata da *E. coli* somministrate in formulazioni contenenti l'adiuvante Quil-A. Dai dati di protezione ottenuti, è stato ipotizzato che sia possibile ottenere una maggiore percentuale di topi responsivi aumentando il contenuto dell'antigene E7 in ciascuna dose di estratto crudo di pianta somministrata con il vaccino. Infatti, utilizzando 10 µg di proteina E7 ricombinante purificata da *E. coli*, la protezione ottenuta dopo l'immunizzazione è stata pressoché totale. Dunque, un fattore limitante l'efficacia dell'immunogeno E7 in tale vaccino, potrebbe essere rappresentato dal contenuto della proteina E7 stessa negli estratti utilizzati per l'immunizzazione. Questo rappresenta uno dei principali problemi tecnici associati con l'espressione di antigeni vaccinali in pianta, che potrebbe essere superato con strategie di targeting che aumentino i livelli di espressione della proteina in pianta (Franconi *et al.*, 2002).

2. SCOPO DEL LAVORO

I papillomavirus umani ad alto rischio, in particolare HPV16, sono gli agenti eziologici del carcinoma della cervice uterina e sono implicati nello sviluppo di altri tumori della pelle, della testa e del collo (Zur Hausen, 2002). In genere, l'infezione da HPV si risolve senza conseguenze, ma un'intera casistica di individui sviluppa infezioni persistenti che progrediscono in forme croniche con le caratteristiche clinico-istologiche di lesioni squamose intraepiteliali (Tindle, 2002). A questo stadio, l'intervento terapeutico può ancora essere efficace e determinare la risoluzione della patologia impedendo la progressione verso il carcinoma *in situ* od invasivo.

A causa del lungo periodo di latenza dell'infezione prima della sua manifestazione conclamata in carcinoma cervicale, i benefici di una vaccinazione profilattica, in termini di calo dell'incidenza del cancro cervicale nella popolazione mondiale, potrebbero essere visibili tra vari decenni. Si rende, dunque, necessario lo sviluppo di vaccini terapeutici in grado di impedire la progressione delle lesioni e delle forme neoplastiche e, possibilmente, di eradicarle. Tali vaccini dovrebbero essere basati sulle oncoproteine E5, E6, od E7 degli HPV ad alto rischio, responsabili per l'innescò ed il mantenimento del processo di trasformazione neoplastico delle cellule infettate e, dunque, "target" appropriati per lo sviluppo di vaccini terapeutici (Kadish *et al.*, 2005). La proteina E7 rappresenta l'antigene tumorale d'elezione su cui basare lo sviluppo di vaccini terapeutici anti-HPV, essendo costitutivamente espressa dalle cellule di carcinoma cervicale.

2.1 REALIZZAZIONE DI VACCINI TERAPEUTICI A DNA CONTRO HPV: SCELTA DI MOLECOLE "ATTIVATRICI DELL'IMMUNITÀ"

E' ormai generalmente accettato che per lo sviluppo di vaccini anti-tumoralì, sono necessarie molecole o formulazioni capaci di indurre una risposta immunitaria di tipo cellulo-mediato. L'impiego dei vaccini a DNA per l'induzione di risposte cellulari antigene-specifiche nel trattamento del cancro è stata ampiamente investigato e tale tipo di strategia ha ormai una provata efficacia nella generazione di risposte immunologiche antigene-specifiche mediate sia dai linfociti CD8⁺ citotossici, sia dai linfociti CD4⁺ produttori IFN- γ (Chen *et al.*, 1998;

Restifo *et al.*, 2000). I vaccini a DNA hanno dimostrato di indurre immunità a lungo termine che conferisce protezione da infezioni e dalla tumorigenesi in modelli animali, e sono utilizzati per immunoterapie antigene-specifiche in virtù della stabilità delle preparazioni e della semplicità di somministrazione.

Una parte del lavoro sperimentale di seguito esposto è stato, appunto, svolto con l'obiettivo di sviluppare vaccini genetici ad azione terapeutica, basati su fusioni del gene E7 di HPV 16 con sequenze derivate da pianta e/o da virus vegetali, con la finalità di incrementare l'immunogenicità di tale proteina virale.

Tuttavia, un vaccino genetico che codifichi per un'oncoproteina pone problematiche di sicurezza ed implica la necessità di introdurre nel gene che la codifica mutazioni che annullino l'attività trasformante del suo prodotto d'espressione, pur preservandone l'immunogenicità (Da Silva *et al.*, 2001). L'introduzione di tre specifiche mutazioni puntiformi nella regione dell'oncogene E7 che costituisce il sito di legame con pRb (sostituzione dell'adenina in posizione 62, della timina in posizione 70 e dell'adenina in posizione 77 con tre guanine: ciò comporta, nella struttura primaria della proteina, la presenza di tre glicine nelle posizioni 21, 24, 26, in luogo di un aspartato, una lisina e un glutammato) determina l'abolizione delle proprietà trasformanti della proteina virale, addirittura incrementandone l'immunogenicità (Smahel *et al.*, 2001).

Di qui l'idea di impiegare, nella costruzione del nostro vaccino, il gene E7 così mutagenizzato (di seguito indicato come E7GGG), il cui prodotto d'espressione, portando tali modificazioni nella regione N-terminale, presenta una drastica riduzione dell'affinità di legame con pRb e, dunque, non esercita alcuna funzione deregolatrice sul ciclo cellulare. Il razionale della progettazione di una sequenza di fusione ha il proprio fondamento nella naturale, scarsa capacità della proteina E7 di stimolare il sistema immune sia quando introdotta nell'organismo in forma di vaccino, sia quando patologicamente sintetizzata, processata ed esposta sulla superficie delle cellule neoplastiche. Infatti, come già ricordato, nel corso della trasformazione maligna delle cellule dell'epitelio cervicale, l'esposizione di E7 al riconoscimento da parte del sistema immune avviene in un contesto non infiammatorio e di "down-regulation" del sistema di presentazione dell'antigene secondo la via HLA-1, inducendo tolleranza immunologica (Pardoll, 1998). L'evidente capacità dell'oncoproteina di eludere i meccanismi di difesa dell'ospite, ha portato, dunque, a numerosi studi sperimentali per lo sviluppo di vaccini basati su E7 basati sul tentativo di potenziarne l'immunogenicità.

Nel presente lavoro, pertanto, i "partners" di fusione con il gene E7GGG sono stati scelti con la precisa finalità di costruire proteine chimeriche dotate di un potere immunogeno aggiunto.

La nostra attenzione si è, in particolare, rivolta a sequenze derivate da pianta e da virus vegetali, considerato l'indirizzo biotecnologico vegetale del tema del dottorato e del nostro laboratorio. L'idea che sottende questa ricerca è che, infatti, le piante ed i virus che le infettano possano essere utilizzati come sorgenti di molecole immuno-stimolatorie in grado di potenziare l'efficacia di vaccini a DNA.

Nello specifico, sono state scelte la sequenza codificante la proteina di rivestimento ("Coat Protein", CP) del virus X della patata (PVX, famiglia potexvirus) e la sequenza segnale di secrezione della proteina inibitrice della poligalatturonasi (PGIP) di *Phaseolus vulgaris*. Ne è conseguita la creazione di tre tipi di sequenze di fusione, costituite da due o tre unità funzionali, clonate in un apposito vettore per l'espressione in mammifero e codificanti proteine chimeriche auspicabilmente dotate di un elevato potere immunogeno.

La CP di PVX è l'unica proteina di rivestimento posseduta dal virus, è composta da 237 aminoacidi, e si assembla in strutture flessuose bastoncellari che definiscono la morfologia virale. Il genoma di PVX è codificato da una molecola di RNA a singolo filamento, in cui si distinguono 5 ORFs (Koenig & Letemann, 1989). La CP, avente un pM teorico di 25 kDa (pM apparente 27-29 kDa) è codificata dalla ORF 5, situata all'estremità 3' della molecola di RNA (Atabekov *et al.*, 2001). La sua estremità C-terminale è situata all'interno del virione e circonda il materiale genetico mentre la porzione N-terminale genera, sulla superficie virale, una struttura super-secondaria a foglietto β a tre strati (Baratova *et al.*, 2004). La CP del PVX non riveste solo un ruolo strutturale, ma è anche indispensabile per la movimentazione dei virioni e per la loro diffusione sistemica nelle piante infettate (Atabekov *et al.*, 2001).

Le proteine inibitrici della (PGIP) costituiscono, invece, una famiglia di proteine enzimatiche extracellulari della parete cellulare delle piante, caratterizzate da differente regolazione e specificità nei confronti delle poligalatturonasi prodotte da microrganismi fitopatogeni. Esse sono, infatti, tipicamente indotte in risposta a segnali di stress o da infezioni, in particolare in difesa dalle invasioni fungine. Le PGIP di *Phaseolus vulgaris*, attraverso ripetizioni di motivi di leucine, interagiscono con le endopoligalatturonasi secrete dai funghi fitopatogeni inattivandole, e modulano l'attività di queste ultime favorendo l'accumulo di frammenti di parete cellulare di opportuna taglia, gli oligogalatturonidi, che sono degli elicitori della risposta di difesa delle piante all'attacco fungino (Di Matteo *et al.*, 2003).

In *Phaseolus vulgaris*, la famiglia genica delle PGIP consiste di almeno 5 membri (Frediani *et al.*, 1993). L'estremità amino-terminale delle PGIP mature è preceduta da un peptide segnale tipico che ne determina il "targeting" attraverso il sistema endomembranoso per la secrezione

nello spazio interstiziale tra la membrana e la parete della cellula vegetale. La sequenza per il segnale di secrezione della proteina inibitrice della poligalatturonasi 1 (PGIPs) di *Phaseolus vulgaris* codifica un peptide di 29 aminoacidi, contenente una regione centrale di 7 residui idrofobici (*figura 1* - colore verde), necessaria per l'interazione con la particella di riconoscimento del segnale che veicola il ribosoma, da cui il peptide emerge, verso la membrana del reticolo endoplasmatico, consentendo l'ingresso della proteina neosintetizzata nel "pathway" secretorio.

¹Met-Thr-Gln-Phe-Asn-Ile-Pro-Val-Thr-¹⁰Met-Ser-Ser-Ser-Leu-Ser-Ile-Ile-Leu-Val-
²⁰Ile-Leu-Val-Ser-Leu-Arg-Thr-Ala-Leu-Ser

Figura 1: struttura primaria del peptide segnale codificato dalla PGIPs.

Diverse sono le caratteristiche che rendono il gene CP e la sequenza PGIPs potenziali candidati nello sviluppo di nuovi vaccini genetici basati su fusioni con il gene E7 di HPV 16. Anzitutto, le sequenze peptidiche da essi codificate sono, per l'uomo, antigeni primari, (e quindi immunogeni più potenti) data l'assenza di una loro pregressa esposizione al riconoscimento da parte del sistema immunitario umano (Savelyieva *et al.*, 2003). Ciò esclude l'esistenza di un'immunità protettiva precedentemente acquisita, nei loro confronti, dal soggetto che venga successivamente vaccinato con essi, e quindi impedisce effetti deleteri dovuti alla "clearance" dell'immunogeno e del partner di fusione (nel caso specifico E7) da parte del sistema immune a cui sia stato già esposto, e che ne vanificherebbe, quindi, l'uso. Inoltre, le origini vegetale e virale di tali sequenze geniche garantiscono la distanza filogenetica degli antigeni codificati rispetto a quelli "self" che di solito il sistema immunitario umano ignora o nei confronti dei quali sviluppa tolleranza; tale distanza scongiura, perciò, il pericolo di eventuali reazioni auto-immuni.

2.1.1 Razionale delle fusioni con CP

La caratteristica principale della CP che ne suggerisce l'impiego, con funzione di adiuvante, in presidi vaccinali è l'elevato potere immunogeno. La CP ha, infatti, capacità auto-assemblanti, anche in assenza di RNA virale, che determinano la formazione di aggregati multimerici, visibili come serie di formazioni discoidali impilate, ciascuna costituita da due strati di 9 subunità proteiche (Goodman *et al.*, 1975). Tali aggregati, riproducendo la morfologia virale, costituiscono un potente stimolo alla risposta immunitaria.

E' stato dimostrato, inoltre, che all'estremità N-terminale della CP del PVX è possibile legare anche lunghi polipeptidi, preservando l'integrità strutturale di ambo i "partners" della fusione (Santa Cruz *et al.*, 1996; Smolenska *et al.*, 1998) ed ottenendo ancora la formazione di strutture auto-assemblanti dall'elevato potere immunogeno (Brennan *et al.*, 1999; Marusic *et al.*, 2001).

D'altra parte, è già stata dimostrata l'efficacia, nella terapia del mieloma e del linfoma, di un vaccino genetico codificante la CP del PVX fusa all'estremità C-terminale di un determinante idiotipico (Id) specifico di cellule B maligne (Savelyeva *et al.*, 2001). Esso è stato fuso, a monte, con una sequenza segnale di secrezione, derivante dall'immunoglobulina del clone B maligno e, a valle, con il gene CP, con l'obiettivo di incrementare l'immunogenicità del determinante idiotipico. La trasfezione di cellule di mammifero con il plasmide ricombinante pcDNA3.0/ scFv-CP ha consentito di verificare la sintesi del prodotto di fusione atteso. Quest'ultimo è stato inoltre individuato nell'ambiente extracellulare dopo ultracentrifugazione del mezzo condizionato, data la naturale destinazione secretoria dell'anticorpo ricombinante codificato dalla sequenza scFv. La possibilità di precipitare il prodotto di fusione scFv-CP mediante ultracentrifugazione ha, inoltre, dimostrato l'effettiva generazione, ad opera della CP, di particelle multimeriche auto-aggreganti, che ha poi trovato conferma in analisi di microscopia elettronica. La vaccinazione con il plasmide ricombinante pcDNA3.0/scFv-CP ha determinato, in modelli murini, l'induzione di una risposta anticorpale e garantito una protezione antitumorale pressoché totale preminentemente legata alla popolazione linfocitaria di tipo CD4+ (Savelyeva *et al.*, 2003).

Considerate tali premesse, abbiamo pensato di utilizzare la CP di PVX per studiare la natura delle risposte immuni generate da vaccini a DNA la cui somministrazione avviene in un contesto caratterizzato da assenza di immunità preesistente per uno dei partners della fusione codificata (CP), e quindi per valutare l'effetto di una molecola "carrier" sull'entità della risposta immune sviluppata nei confronti di un antigene 'silente' (E7).

A tale scopo, il gene PVXCP è stato fuso all'estremità 5' del gene E7GGG, in modo che la proteina E7 codificata, beneficiando auspicabilmente dell'azione adiuvante del proprio "partner" di fusione, incrementasse il proprio potere immunogeno.

Per evitare che la fusione E7GGG-CP costituisse un impedimento sterico al corretto ripiegamento delle due proteine o all'auto-assemblamento della CP, è stata realizzata un'altra sequenza di fusione, inserendo, tra i due geni, una sequenza di 12 coppie di basi, codificante il peptide "linker" flessibile Gly-Pro-Gly-Pro. La presenza di aminoacidi dotati di catene laterali poco ingombranti e prive di carica elettrica garantisce, infatti, l'ampia flessibilità di tale

braccio spaziatore (“linker”), consentendo alle due proteine di preservare la propria autonomia di struttura.

Sono state, dunque, realizzate le sequenze di fusione E7GGG-CP ed E7GGG-L-CP, poi clonate nel vettore di espressione eucariotico pcDNA3.0(+).

2.1.2 Razionale delle fusioni con PGIPss

Come già descritto nel paragrafo dedicato dell'introduzione, numerosi lavori sperimentali hanno dimostrato l'efficacia dell'impiego di strategie di “targeting” intercellulare nell'incremento dell'efficacia dei vaccini a DNA. In particolare, versioni secretorie della proteina E7 hanno determinato un incremento della captazione antigenica da parte delle APC e un notevole potenziamento della risposta immunitaria (Michel *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2002). Basandosi su tali premesse e considerando che la notevole efficacia del vaccino genetico sviluppato da Savelyeva e collaboratori (2001) fosse imputabile anche all'intrinseca natura secretoria del prodotto di fusione codificato, si è pensato di impiegare una sequenza segnale di secrezione per veicolare la proteina E7 nell'ambiente extracellulare.

La sequenza PGIPss di *Phaseolus vulgaris* è stata già impiegata, nel nostro laboratorio, per la progettazione della versione secretoria di un anticorpo ricombinante di tipo scFv (Franconi *et al.*, 1999). Inoltre, svolgendo un'altra sezione del lavoro previsto nell'ambito di questo dottorato, è stato possibile ottenere in piante di *Nicotiana benthamiana*, alte rese di produzione della proteina E7, attraverso la fusione del gene corrispondente con la PGIPss. Quest'ultima, infatti, ha dimostrato di poter veicolare la proteina nel “pathway” secretorio, aumentandone i livelli di espressione. In topi immunizzati con estratti fogliari contenenti E7 è stata indotta una risposta immunitaria cellulo-mediata ed una migliore protezione anti-tumorale rispetto ad un vaccino basato sulla stessa proteina e descritto precedentemente (Franconi *et al.*, in press).

Ci è sembrato pertanto possibile che la fusione della PGIPss a monte del gene E7GGG potesse favorire, anche in cellule di mammifero e nell'individuo vaccinato mediante immunizzazione genetica, la veicolazione della proteina codificata nell'ambiente extracellulare. Ciò sarebbe funzionale anzitutto ad evitare l'accumulo intracellulare della proteina estranea, impedendo così il raggiungimento di concentrazioni tossiche e favorendo, di conseguenza, un incremento della sua sintesi. In secondo luogo, come già ricordato, la veicolazione dell'oncoproteina nell'ambiente extracellulare dovrebbe favorirne la captazione da parte delle cellule dendritiche residenti nei linfonodi (necessarie per attivare le funzioni T helper) e dei linfociti B, localizzati nei follicoli linfatici e pronti a differenziarsi in

plasmacellule produttrici di anticorpi. In questo modo, la risposta immunitaria umorale si affiancherebbe a quella cellulo-mediata, soddisfacendo, così, alla necessità di ottenere, ai fini di una terapia anti-cancro, vaccini in grado di indurre ambo le branche dell'immunità.

In un altro costrutto è stata inserita all'estremità C-terminale del costrutto PGIP-E7GGG anche la sequenza segnale di ritenzione nel reticolo endoplasmatico KDEL (lisina, acido aspartico, acido glutammico, leucina), è stata inserita all'estremità C-terminale del costrutto PGIP-E7GGG con l'obiettivo, invece, di favorire la segregazione dell'oncoproteina nel reticolo endoplasmatico.

Sono state, pertanto, effettuate le fusioni della sequenza PGIPss a monte del gene E7GGG da solo (provvisto o meno della sequenza KDEL) o, a sua volta legato a valle con il gene CP, con o senza l'interposizione della sequenza "linker".

Le sequenze di fusione risultanti, PGIPss-E7GGG, PGIPss-E7GGG-KDEL, PGIPss-E7GGG-CP e PGIPss-E7GGG-L-CP, sono state poi clonate in un apposito vettore d'espressione eucariotico per valutare l'espressione dei vari prodotti di fusione e la capacità della PGIPss di assolvere alla funzione di segnale secretorio nei confronti dei prodotti di fusione diversi (nelle dimensioni e nella complessità strutturale) dalla sola proteina E7GGG.

Questa parte del lavoro sperimentale si è perciò proposta di valutare se l'impiego di strategie di "targeting" extracellulare od intracellulare, congiunte o meno all'uso di un gene "carrier" (come PVX-CP) che incrementi il potere immunogeno della vaccinazione genetica progettata, risulti funzionale a migliorare i livelli di protezione contro i tumori indotti da HPV promossi dal solo gene E7GGG in un modello pre-clinico.

2.2 SVILUPPO DI VACCINI PROTEICI A SCOPO TERAPEUTICO DERIVATI DA PIANTA

Come già descritto, la risposta immune cellulo-mediata rappresenta una componente critica nel controllo dello sviluppo delle neoplasie associate all'infezione da HPV. La possibilità di un intervento immunologico nella terapia delle neoplasie indotte da HPV è stata per la prima volta suggerita in un modello tumorale murino esprimente E7 attraverso la vaccinazione con un epitopo della proteina E7 di HPV 16 MHC I-ristretto. La risposta CTL epitopo-specifica elicitata è stata in grado di conferire protezione ai topi vaccinati in seguito a sfida con una dose tumorigenica di cellule C3 trasformate con HPV 16 (Feltkamp *et al*, 1993). Successivi studi hanno confermato che la sollecitazione dell'immunità naturale di tipo Th1/CTL contro le proteine E6 ed E7 di HPV 16 ad uno stadio iniziale della patologia, rappresenta un approccio promettente per la terapia delle neoplasie associate ad HPV (Da Silva *et al*, 2001).

In modelli pre-clinici, come già descritto nell'introduzione, sono state realizzate differenti formulazioni vaccinali basate sulla proteina E7 tra cui l'uso di peptidi, vettori virali, VLP chimeriche e proteine ricombinanti di fusione. I vaccini basati sulla proteina E7 ricombinante sembrano rappresentare l'approccio più promettente, poiché la proteina "full length" possiede tutti gli epitopi di tipo CD4 e CD8 per ogni possibile alotipo, eliminando così la restrizione HLA, che limita notevolmente l'impiego, invece, dei vaccini peptidici. Inoltre, i vaccini proteici presentano minori problematiche relative alla sicurezza delle formulazioni basate sui virus o su sistemi di espressione animali. D'altra parte, E7 di HPV è una proteina dall'emivita breve, proteolizzata, *in vitro* ed *in vivo*, dal sistema ubiquitina-proteasoma (Reinstein *et al.*, 2000); tentativi di produrre elevate quantità di proteina E7 tal quale in sistemi di espressione eucariotici, in baculovirus o in *E. coli*, in cui la sequenza non venisse modificata o fusa ad altri geni, sono praticamente falliti, principalmente a causa della rapida degradazione cui è normalmente sottoposta (Fernando *et al.*, 1999).

Sebbene alcuni vaccini terapeutici basati sulla proteina E7 siano attualmente in trial clinico, tuttavia essi necessitano di ulteriori miglioramenti e dell'associazione con gli appropriati adiuvanti per stimolare in maniera efficace l'immunità cellulo-mediata (Frazer, 2004).

In effetti, l'uso di adiuvanti e di schede di vaccinazione che prevedano immunizzazioni multiple è generalmente richiesto per la sollecitazione di una risposta immune efficace. Nel caso dei vaccini basati sulla proteina E7 la scelta dell'adiuvante è addirittura cruciale poiché è stato dimostrato, in modelli murini, che l'uso di differenti adiuvanti è associato con la generazione di un potenziale terapeutico diverso contro lo sviluppo e l'accrescimento delle neoplasie HPV indotte (Gerard *et al.*, 2001; Duggan-Keen *et al.*, 1998).

E', inoltre, importante puntare su vaccini di seconda generazione basati su tecnologie che consentano di ottenere formulazioni immunologicamente più efficaci e più accessibili soprattutto per i Paesi in via di sviluppo (in cui i "test di screening" cervicale non sono una pratica diffusa), superando le attuali limitazioni imposte dai costi elevati e dall'uso improprio di aghi e siringhe nella somministrazione di vaccini iniettabili.

Le risorse offerte dal mondo vegetale non sono solo, infatti, legate alle recenti acquisizioni dell'immunologia, che ne promuovono l'uso come "sorgenti" di sequenze ad elevato potere immunologico. Da millenni sono note le proprietà farmacologiche possedute da molte specie vegetali che ne determinano tuttora un largo impiego nella pratica terapeutica. progressi nel campo dell'ingegneria genetica consentono ora l'uso delle piante come sistema per l'espressione eterologa di proteine ricombinanti, trasformandole in vere e proprie biofabbriche di nuovi e potenzialmente efficaci agenti terapeutici tra cui anche vari antigeni vaccinali

(Twyman *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004). Gli antigeni prodotti in pianta hanno dimostrato di essere in grado di elicitare risposte immuni, e di possedere dei vantaggi rispetto agli antigeni ottenuti con strategie tradizionali tra cui l'efficacia, maggiori garanzie di sicurezza (le piante non sono, infatti, vettori di patogeni per gli animali o per l'uomo), versatilità, stabilità ed economicità.

Le biotecnologie vegetali sono state utilizzate negli ultimi anni per la produzione di antigeni vaccinali attraverso sistemi che consentono l'espressione transiente della proteina eterologa, mediante l'impiego del patogeno vegetale *Agrobacterium* o di virus vegetali ricombinanti che incorporano il gene codificante per la proteina di interesse, e che consentono di produrre livelli di espressione più elevati ed in tempi più brevi rispetto alla trasformazione stabile, con il vantaggio di rendere possibile l'espressione di antigeni potenzialmente tossici o deleteri per il metabolismo della pianta come potrebbero essere le oncoproteine.

2.2.1 Vaccino terapeutico derivato da pianta basato sull'espressione della proteina E7 mediata da PVX

Alcuni virus ad RNA (+) a singolo filamento si sono dimostrati utili e promettenti strumenti ingegnerizzabili per l'espressione rapida di geni eterologhi in piante ospiti suscettibili all'infezione. Il potexvirus Potato Virus X (PVX), già introdotto, si è dimostrato un efficace vettore per l'espressione in forma solubile di proteine eterologhe. Alcune caratteristiche di PVX (assenza di vettori animali, ampio spettro d'ospite) lo rendono un efficace strumento per l'espressione transiente in pianta evitando il molto più laborioso e costoso ottenimento di piante transgeniche.

In un precedente studio, come già accennato, abbiamo ottenuto con successo l'espressione transiente della proteina E7 di HPV 16 in piante di *Nicotiana benthamiana*, utilizzando un vettore derivante, appunto, dal PVX. Topi immunizzati con l'estratto crudo di foglia somministrato per via sub-cutanea (e che aveva dimostrato di non avere effetti tossici sugli animali in esperimenti preliminari) hanno sviluppato alti titoli di IgG totali contro E7 contro E7 e la selezione di cloni CTL E7-specifici. Tale vaccino è stato, dunque, in grado di indurre una potente risposta cellulo-mediata ed ha fornito protezione dallo sviluppo di tumore dopo sfida con una dose tumorigenica di cellule esponenti E7 (circa il 40% degli animali immunizzati sono risultati protetti) (Franconi *et al.*, 2002). I dati ottenuti hanno dato, inoltre, indicazioni che tale vaccino derivato da pianta possiede un intrinseco potere adiuvante, poiché la protezione indotta dal solo estratto di pianta contenente la proteina E7 si è dimostrata paragonabile a quella prodotta da elevate quantità di proteina ricombinante purificata da *E.*

coli somministrate in formulazioni contenenti l'adiuvante Quil-A. Dai dati di protezione ottenuti, è stato ipotizzato che fosse possibile ottenere una maggiore percentuale di topi responsivi aumentando il contenuto dell'antigene E7 in ciascuna dose di estratto crudo di pianta somministrata con il vaccino. Infatti, utilizzando 10 µg di proteina E7 ricombinante purificata da *E. coli*, la protezione ottenuta dopo l'immunizzazione è stata pressoché totale. Dunque, un fattore limitante l'efficacia dell'immunogeno E7 in tale vaccino, potrebbe essere rappresentato dal contenuto della proteina E7 stessa negli estratti utilizzati per l'immunizzazione. Questo rappresenta uno dei principali problemi tecnici associati con l'espressione di antigeni vaccinali in pianta, ma potrebbe essere superato aumentando i livelli di espressione della proteina in pianta (Franconi *et al.*, 2002).

L'indirizzamento verso compartimenti sub-cellulari potrebbe avere un ruolo fondamentale nell'accumulo di una proteina di interesse. Il "targeting" verso la secrezione fornisce generalmente un sistema più adatto ad un ripiegamento ed ad un assemblaggio appropriati di una proteina di quanto non sia l'ambiente riducente offerto dal citoplasma, come dimostrato da studi condotti sull'espressione di anticorpi in pianta (Franconi *et al.*, 1999; Schillberg *et al.*, 1999) e rappresenta, dunque, un sito vantaggioso per un accumulo ad alto livello di una proteina d'interesse. Il RE è caratterizzato da un ambiente ossidante, caratterizzato da un'abbondanza di "chaperone" molecolari che assistono il "folding" della proteina e, al contrario, carenza di proteasi, limitando, così, il rischio di proteolisi. Inoltre, soprattutto proteine potenzialmente tossiche come E7 potrebbero essere più facilmente espresse se segregate in un compartimento sub-cellulare oppure secrete nell'apoplasto. In questo caso, il "targeting" nella via secretoria oltre ad incrementare i livelli di espressione, determinando l'accumulo nei fluidi interstiziali, potrebbe semplificare le procedure di estrazione ed aumentare la quantità di proteina ottenuta con l'estratto, rappresentando un sistema naturale per concentrare proteine eterologhe in un tessuto vegetale.

La sequenza PGIPss di *Phaseolus vulgaris* era stata impiegata in precedenza, nel nostro laboratorio, per la produzione della versione secretoria di un anticorpo ricombinante di tipo scFv per la realizzazione di piante transgeniche resistenti ai tospovirus. Per determinare se l'espressione del scFv fosse compatibile con la produzione di un prodotto funzionale, è stata inizialmente effettuata l'espressione transiente utilizzando, appunto, un vettore epicromosomico d'espressione derivato da PVX. In tale vettore il gene del scFv era stato clonato in modo da ottenere un anticorpo citosolico oppure secretorio. Per ottenere la forma secretoria, era stata utilizzata la PGIPss di *Phaseolus vulgaris*. Successivamente, il gene codificante per la versione secretoria dell'anticorpo è stato usato per la trasformazione stabile

di *Nicotiana benthamiana* e, sia le piante infettate per l'espressione transiente sia quelle trasformate stabilmente con il gene codificante per tale versione secretoria, sono state in grado di esprimere molecole scFv completamente funzionali nei fluidi interstiziali (Franconi et al., 1999).

Scopo di questa sezione del presente lavoro è stato, dunque, la produzione dell'oncoproteina E7 di HPV16 attraverso il "targeting" nella via secretoria di pianta con l'impiego della sequenza PGIPss (ottenendone auspicabilmente la secrezione nei fluidi interstiziali), oppure attraverso la ritenzione nel RE con l'uso della sequenza KDEL, con l'obiettivo di incrementare i livelli di espressione dell'oncoproteina E7 in pianta in modo da aumentarne la resa di produzione / grammo di tessuto e, in ultima analisi, il contenuto / dose di vaccino. Questo al fine di migliorare l'attività immunogenica della formulazione vaccinale che prevede l'immunizzazione con estratti crudi di *Nicotiana benthamiana* ed ottenere un maggior livello di protezione contro i tumori indotti da HPV in un modello pre-clinico.

E' stata inoltre prodotta una versione mutata del gene E7 di HPV16 nel sito di legame al pRb per ottenere vaccini a sub-unità più accettabile basati sulla stessa strategia.

Per semplificare le procedure di purificazione (qualora questa si rendesse necessaria per lo sviluppo del vaccino in alternativa alla somministrazione dell'estratto crudo di foglia), è stata prodotta una proteina E7 provvista di un "tag" di poli-istidine utile alla purificazione mediante cromatografia per affinità all'estremità N-terminale dell'onco-proteina con o senza la sequenza KDEL all'estremità C-terminale.

2.2.2 Vaccino terapeutico derivato da pianta basato sull'espressione della proteina di fusione Lichenasi B-E7 mediata da agroinfezione

Le piante ed alcuni microrganismi tra cui batteri anaerobi cellulolitici come *Clostridium thermocellum* o alcuni funghi fitopatogeni, possiedono un complesso multienzimatico noto come cellulosoma. Generalmente esso include differenti enzimi appartenenti alla famiglia delle glicosil-idrolasi (come glucanasi, glucosidasi, xilanasi e cellulasi) ed alcune proteine di "scaffolding" che sostengono l'integrità strutturale del cellulosoma attraverso l'interazione con gli stessi enzimi che lo costituiscono. La lichenasi nativa è una beta glucanasi ed idrolizza i legami endo- β -1,4-glicosidici dei poliglucani caratterizzati da legami endo- β -1,3-1,4-glicosidici della parete delle cellule vegetali. Come la maggior parte delle glicosil-idrolasi, la lichenasi possiede un'unica subunità che consiste di differenti domini: il peptide segnale all'estremità N-terminale (27 residui aminoacidici), la regione catalitica (224 residui aminoacidici), una regione ricca di residui di prolina e treonina (sequenza Pro-Thr, 13 residui

aminoacidici) ed il dominio di legame al cellulosa (CBD, 65 residui aminoacidici). La sequenza Pro-Thr rappresenta un linker flessibile (“loop”) che raccorda la regione N-terminale a quella C-terminale (Chen *et al.*, 1997). Tale enzima è estremamente stabile in condizioni estreme di temperatura e di pH, e resta attivo in estratti di tessuto anche dopo un anno resistendo a molti cicli di congelamento/scongelo (Piruzian *et al.*, 1998)

Tali proprietà, possedute anche dalla lichenasi B di *C. thermocellum*, potrebbero essere sfruttate per migliorare la stabilità della proteina E7 caratterizzata, come già ricordato, da un'emivita breve perché proteolizzata dal proteasoma, ed ottenere ancor più elevate rese di produzione rispetto alle nostre precedenti esperienze. Tutto ciò sempre con l'obiettivo di incrementare il contenuto di proteina E7 / dose di vaccino, al fine di migliorare l'attività immunogenica degli estratti crudi di *Nicotiana benthamiana* contenenti la proteina E7, ed ottenere un maggior livello di protezione contro i tumori indotti da HPV in un modello pre-clinico. L'eventuale stabilizzazione di E7 attraverso la fusione con la lichenasi, potrebbe anche migliorare le rese di una eventuale purificazione che è, evidentemente, difficoltosa quando i livelli di espressione nel tessuto non sono soddisfacenti. La stabilizzazione e l'incremento dei livelli di espressione di E7 fusa alla lichenasi potrebbero essere anche raggiunti grazie alla natura secretoria di tale proteina, provvista di una sequenza segnale per l'indirizzamento verso il compartimento endomembranoso della cellula.

Inoltre, le considerevoli dimensioni della lichenasi, potrebbero costituire un potente stimolo alla risposta immunitaria e quindi conferire alla strategia di fusione con E7 il potere di incrementare la scarsa immunogenicità dell'oncoproteina. Come già ricordato, la proteina E7, a causa del suo ridotto potere immunogeno, è, nella maggior parte dei vaccini proteici, co-somministrata con adiuvanti o impiegata in forma di proteina di fusione.

Inoltre, come nel caso della CP di PVX, è stato dimostrato che all'interno del “loop” o all'estremità C-terminale della lichenasi di *C. thermocellum* è possibile legare anche lunghi polipeptidi, preservando l'integrità strutturale di ambo i “partners” della fusione migliorando la presentazione degli epitopi (dati non pubblicati).

Il gene E7 “wild type” ed il gene E7GGG sono stati, pertanto, clonati nella regione del “loop” del gene lichenasi. E' stato inoltre aggiunto un “tag” di poli-istidine per la purificazione mediante cromatografia per affinità mentre in alcuni costrutti sono state anche aggiunte sequenze per la ritenzione nel reticolo endoplasmico o nel vacuolo per una maggior produzione dovuta alla segregazione in questi due compartimenti subcellulari di tale oncoproteina. Sono stati quindi costruiti i vettori per l'agro-infiltrazione di *N. benthamiana* con *Agrobacterium tumefaciens* per l'espressione transiente di proteine chimeriche derivanti dalla

fusione della proteina E7 di HPV 16 e della sua versione non mutagena con l'enzima batterico, al fine di produrre una vaccinazione più efficace basata sulla somministrazione di estratti crudi o di proteina purificata da pianta.

Le caratteristiche di stabilità ed attività della lichenasi sono state anche alla base dello sviluppo di un nuovo sistema reporter traduzionale. La presenza della lichenasi in proteine ibride ha, infatti, già dimostrato di facilitare l'analisi dell'espressione di proteine ad essa fuse in microrganismi transgenici. Inoltre, grazie all'elevata attività relativa ed alla termostabilità della lichenasi, la presenza di questo enzima in proteine ibride può essere valutata attraverso metodi quantitativi e qualitativi semplici, rapidi e sensibili che non richiedono equipaggiamenti e reagenti costosi. Utilizzando il metodo dello zimogramma (basato sulla valutazione delle bande di attività enzimatica della lichenasi in SDS-PAGE in presenza del substrato lichenano), la quantità delle proteine ibride contenenti la lichenasi possono essere stimate con precisione in alternativa all'uso dell'immuno-blotting.

L'uso della lichenasi come reporter traduzionale consente, quindi, di ottenere dati che sarebbe problematico ottenere utilizzando metodi tradizionali di analisi dell'espressione (Komakhin *et al.*, 2005).

L'uso della lichenasi, dunque, anche come reporter traduzionale, renderà più semplice l'analisi dei livelli di espressione delle varie versioni delle proteine chimeriche E7-Lichenasi ed E7GGG-Lichenasi.

2.2.3 Vaccino terapeutico derivato da pianta basato sull'espressione stabile della proteina di fusione Lichenasi B-E7 in radici

Una nuova tecnologia sviluppata presso il "Fraunhofer Center for Molecular Biotechnologies" (Newark, Delaware) è rappresentata dall'istituzione di linee clonali di radice che esprimono proteine ricombinanti ottenute da tessuti o piante inoculati con vettori virali sviluppati in tale centro.

Le piante restano un sorgente indispensabile di composti chimici difficili da sintetizzare chimicamente a causa della struttura complessa. Tuttavia, l'instabilità della produzione a volte riscontrata nelle colture da callo, indica la necessità di tipi di coltura alternative quali le colture d'organo. Radici aeree ottenute dopo trasformazione genetica di cellule o tessuti ospiti con *Agrobacterium rhizogenes* sono geneticamente stabili e presentano livelli di espressione e di crescita più alti delle normali radici (Doran *et al.*, 2002). Tali radici sono in grado di crescere in assenza di ormoni, e tale natura indipendente dagli ormoni deriva dal loro stato di organi trasformati, appunto, da *Agrobacterium rhizogenes* (Hamill & Lidgett, 1997).

Soprattutto, le radici sono dei sistemi di espressione ideali per lo “scale-up” in bioreattori e sono dunque preferite per la produzione di varie sostanze chimiche congeniali al sistema di espressione di quest’organo.

Poiché ci si aspetta che ciascun clone di radice ottenuto da ciascuna cellula vegetale trasformata sia geneticamente differente a causa di variazioni dovute al sito di integrazione ed al numero di copie del T-DNA nel genoma dell’ospite (Doran *et al.*, 2002), ogni clone si comporterà in modo differente rispetto alla crescita ed alla produzione della proteina di interesse. Di conseguenza, la selezione dei cloni di radice con le desiderate proprietà di accumulo di biomassa e di produzione della proteina rappresenta uno degli aspetti più laboriosi nell’ambito di questa strategia che mira alla produzione di proteine stabili ed ad elevati livelli.

In molti dei precedenti studi, la trasformazione dei tessuti di pianta da parte di *Agrobacterium rhizogenes* e la conseguente espressione della proteina di interesse, è stata generalmente confermata attraverso metodi biochimici come i saggi per la rilevazione delle opine, per mezzo di PCR che rilevino la presenza del transgene, oppure attraverso “Southern blot”.

Utilizzando la lichenasi di *C. thermocellum*, la rilevazione della espressione della proteina ibrida che la contiene, diviene molto più semplice ed immediata.

Il gene E7 “wild type” ed il gene E7GGG sono, pertanto, stati clonati nella regione del “loop” del gene lichenasi (dotato o meno di sequenze per la secrezione o per la ritenzione nel reticolo endoplasmico o nel vacuolo e di un “tag” di poli-istidine) sono stati inseriti in vettori per la trasformazione di pianta mediata da *Agrobacterium rhizogenes* per la generazione di colture di radici da dischi fogliari. I costrutti sono attualmente allo studio in piante di *Nicotiana benthamiana* e potrebbero consentire di migliorare le nostre attuali rese di produzione del gene E7 in pianta, e quindi ridurre il numero di immunizzazioni nel nostro modello.

Un “tag” di poli-istidine inserito nei costrutti sarà utile alla purificazione mediante cromatografia per affinità qualora questa si rendesse necessaria per lo sviluppo del vaccino in alternativa alla somministrazione dell’estratto crudo o i liofilizzati di radice.

3. MATERIALI E METODI

3.1 REAGENTI DI BASE, PER COLTURE BATTERICHE E DI CELLULE DI MAMMIFERO

3.1.1 Soluzioni di base:

- **PBS 10X** (“Phosphate Buffered Saline”).
Composizione per litro: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 30 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.56 g, NaCl 88 g, H_2O , pH 7.2.
- **TAE 50X**.
Composizione per litro: Tris Base 242 g, acido acetico glaciale 57.1 ml, 0.5 M EDTA pH 8.0 100 ml, H_2O .
- **TBE 5X**.
Composizione per litro: Tris Base 54 g, acido borico 27.5 g, 20 ml EDTA 0.5 M pH 8.0, H_2O .
- **“RUNNING BUFFER” 10X** (per SDS-PAGE).
Composizione per litro: glicina 72 g, Tris Base 15 g, SDS 5 g, H_2O , pH 8.3.
- **“TRANSFER BUFFER” 10X** (per SDS-PAGE).
Composizione per litro: glicina 144 g, Tris Base 30.3 g, H_2O , metanolo 20%, pH 8.3.
- **PBST**.
PBS contenente 0.1% TWEEN-20.
- **PBST + NaCl**.
PBS 1 x contenente TWEEN 20 0.1% e NaCl 1 M.
- **MPBS**.
PBS 1 x contenente “no fat dry milk”(2%w/v, 5% w/v, o 10%).
- **“Gel loading buffer” per DNA**.
Glicerolo 6%, blu di bromofenolo 0,02%, SDS 0.02%.
- **“Gel loading buffer” per proteine**.
Glicerolo 10%, Tris-HCl 0.06 M pH 6.8, blu di bromofenolo 0.025%, SDS 2% e β -mercaptoetanol 3%.
- **“Denaturation buffer” per RNA**.
Composizione per 1 ml: Formamide deionizzata 500 μl , Formaldeide 150 μl , MOPS 10x, 100 μl , EtBr 10 mg/ml 10 μl . Conservare a -20°C .
- **“Loading Buffer” per RNA**.
Glicerolo 30% 500 μl , BromoFenoloBlu 1% 50 μl , entrambi preparati in H_2O /DEPC (Dietilpirocarbonato). Conservare a -20°C

3.1.2 Terreni di coltura

“TSS BUFFER” Impiegato per la trasformazione chimica di *E. coli*.
Composizione per litro: bacto-triptone 10 g, bacto-estratto di lievito 5 g, NaCl 5 g, polietilenglicole (PEG MW 3350) 100 g, dimetilsolfossido (DMSO) 50 ml, 1 M MgCl_2 50 ml, H_2O , pH 6.5. Sterilizzare per filtrazione.

- **LB** (Luria Bertani). Impiegato per la crescita ed il mantenimento di *E. coli* e per *Agrobacterium rhizogenes*.
Composizione per litro: bacto-triptone 10 g, bacto-estratto di lievito 5 g, NaCl 5 g, H_2O , pH 7.2. Autoclavare a 121°C per 20 minuti. Per la crescita dei batteri su terreno solido in piastra *petri*, sono stati aggiunti 15 g/l di agar.

- **2YT** Impiegato per la crescita ed il mantenimento di *E. coli*.
Composizione per litro: bacto-triptone 16 g, bacto-estratto di lievito 5 g, NaCl 5 g, H₂O, pH 7.2. Autoclavare a 121°C per 20 minuti.
- **NZY+** Impiegato per la selezione dei cloni di *E. coli* trasformati con il plasmide pQE30-E7GGG all'atto della mutagenesi del gene E7.
Composizione per litro: NZ amina (idrolisato di caseina) 10 g, estratto di lievito 5 g, NaCl 5 g, pH 7.5. Autoclavare. Prima dell'uso vengono aggiunti: 12.5 ml di MgCl₂ 1 M e 12.5 ml di MgSO₄ 1 M, 10 ml di glucosio 2 M filtrato 0.22 µm, o 20 ml di glucosio 20% (w/v). Sterilizzare per filtrazione.
 - **TB** (“Terrific broth”). Impiegato, con l'aggiunta di glicerolo, per la coltura dei ceppi ricombinanti di *E. coli* trasformati con i plasmidi destinati alle vaccinazioni genetiche. Sostiene maggiori densità di crescita ed è quindi impiegato per incrementare le rese di purificazione del DNA plasmidico.
Composizione per litro: NZ amina (idrolisato di caseina) 12 g, estratto di lievito 24 g, K₂HPO₄ 9.4 g, KH₂PO₄ 2.2 g. Risospendere in 900 ml di H₂O, aggiungere 8 ml di glicerolo e H₂O a volume. Autoclavare a 121°C per 20 minuti.
 - **YEB** Impiegato per la crescita ed il mantenimento di *Agrobacterium tumefaciens*.
Composizione per litro: estratto di carne 5 g, bacto-estratto di lievito 1 g, bacto-peptone 5 g, saccarosio 5 g, MgSO₄ 2 mM, pH 7.2. Autoclavare a 121°C per 20 minuti. Per la crescita dei batteri su terreno solido in piastra *petri*, sono stati aggiunti 15 g/l di agar.
 - **MMA** Impiegato per l'induzione dei geni *Vir* prima dell'agro-infiltrazione con l'aggiunta di acetosiringone 20 µM nelle colture di *Agrobacterium rhizogenes* ed *Agrobacterium tumefaciens*.
Composizione per litro: Sali Murashige 1x (4.44 g/l); acido 2-(N-morpholino)ethansulfonico (MES) 10 mM, pH: 5.6; saccarosio 20 g. Sterilizzare per filtrazione.
- **DMEM** (“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”) con L-Glutamina, senza sodio piruvato. Terreno provvisto di sali minerali e vitamine, impiegato per la crescita ed il mantenimento della linea cellulare di mammifero HEK-293. Siero fetale bovino (FBS) 10% e gentamicina 500 µg/ml sono aggiunti prima dell'uso.

3.1.3 Ceppi batterici

XL1 blue: 3 *recA1 endA1 gyrA46 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac⁻ F' [proAB⁺ lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)]*.

Il ceppo XL-1 blue di *Escherichia coli* è difettivo nella ricombinazione e manca dei geni per le endonucleasi di restrizione, consente la selezione mediante α-complementazione su substrato X-Gal dopo trasformazione (paragrafo 3.1.7) e l'espressione di proteine ricombinanti.

Ceppi di *Agrobacterium*

I ceppi modificati di *Agrobacterium* possiedono un plasmide Ti helper modificato in cui la regione del T-DNA è stata deleta ma conserva le funzioni *Vir* necessarie al trasferimento del

T-DNA del plasmide binario (con cui siano state precedentemente trasformate) durante il processo di infezione. Per tale lavoro sperimentale sono stati utilizzati i seguenti ceppi:

Agrobacterium tumefaciens ceppo 1031-GV:

Il ceppo 1031-GV di *Agrobacterium tumefaciens* (pMP90RK, Gm^R Km^R Rif^R) è provvisto di plasmide “helper” di tipo MP90 (a nopalina).

Agrobacterium rhizogenes ceppo A4

Il ceppo A4 di *Agrobacterium rhizogenes* è un ceppo virulento ad agropina che possiede tre plasmidi: plasmide a (pArA4a, 180 kb) non necessario per la trasformazione della pianta ospite, il plasmide b (250 kb) rappresenta il plasmide Ri (pRiA4), il plasmid c (pArA4c) è un plasmide cointegrato.

3.1.4 Linea cellulare HEK 293 (“Human Embryo Kidney”).

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

3.1.5 Anticorpi

3.1.5.1 Anticorpi primari

- Anticorpo policlonale contro la proteina E7 di HPV16, derivante da topi BALB/c immunizzati con la proteina di fusione His₆-E7 purificata dopo espressione in *Escherichia coli* (pAb α-E7). Diluizione d’uso: 1:1000.
- Anticorpo policlonale di coniglio contro E7. Diluizione d’uso: 1:1000
- Anticorpo policlonale di coniglio contro il virus PVX, (pAb α-PVX, Adgen). Diluizione d’uso: 1:5000.
- Anticorpo policlonale di coniglio contro la proteina lichenasi di *Clostridium thermocellum*, (pAb α-Lich). Diluizione d’uso: 1:5000.
- Anticorpo monoclonale di topo contro l’epitopo “His₆-tag” (SIGMA). Diluizione d’uso: 1:200.

3.1.5.2 Anticorpi secondari

- Anticorpo policlonale, “anti-mouse” biotinilato, 1021 (Amersham Pharmacia biotech). Diluizione d’uso: 1:5000.
- Anticorpo policlonale, “anti-rabbit” biotinilato (Amersham Pharmacia biotech). Diluizione d’uso: 1:5000.
- Streptavidina perossidasi (Amersham Pharmacia biotech). Diluizione d’uso: 1:2000.
- Anticorpo policlonale, “anti-rabbit” coniugato con perossidasi di rafano (Amersham Pharmacia biotech). Diluizione d’uso: 1:10000.
- Anticorpo policlonale, “anti-mouse” coniugato con perossidasi di rafano (Amersham Pharmacia biotech). Diluizione d’uso: 1:10000.
- Anticorpo policlonale, “goat-anti-mouse” coniugato con perossidasi di rafano (Pierce) Diluizione d’uso 1: 10000.

3.1.6 **Oligonucleotidi.**

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

- T3
 - T7
 - Sp6
- } oligonucleotidi commerciali utilizzati per il sequenziamento

3.1.7 **Plasmidi**

3.1.7.1 pQE-30 (QIAGEN, QIAespress system)

Il vettore di clonaggio e d’espressione batterica pQE30 (*Fig. 25*) ha una complessità pari a 3400 pb. A monte del “polylinker”, contiene un sito di legame per il ribosoma (RBS) ed un “tag” di sei istidine (His₆ tag) che viene aggiunto a monte della proteina espressa dal gene di interesse clonato per la purificazione della stessa mediante cromatografia per affinità. Il plasmide contiene l’origine di replicazione batterica ColE1 ed il marcatore di selezione Amp^r. Il sistema di espressione è regolato dalla regione promotore/operatore costituita dal promotore del fago T5 (PT5) e da due sequenze operatore *lacO*.

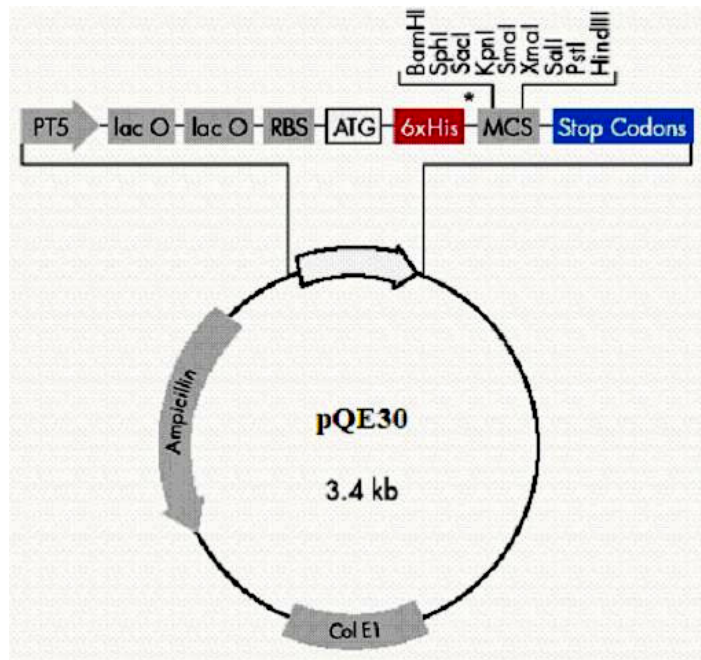


Fig. 25: Mappa del vettore d'espressione pQE-30.

3.1.7.2 pBlueScriptSK(+)(Stratagene)

Il vettore di clonaggio pBlueScriptSK(+) (Fig. 26) è un fagemide di 2958 bp, derivato dal plasmide pUC19. Contiene l'origine di replicazione di *Escherichia coli* e del fago filamentoso f1 ed il marcatore di selezione Amp^r. Il "polylinker" è parte integrante del gene lacZ, codificante l'enzima β -galattosidasi e generalmente represso, in assenza di lattosio, dal legame del prodotto del gene lacI al sistema promotore.

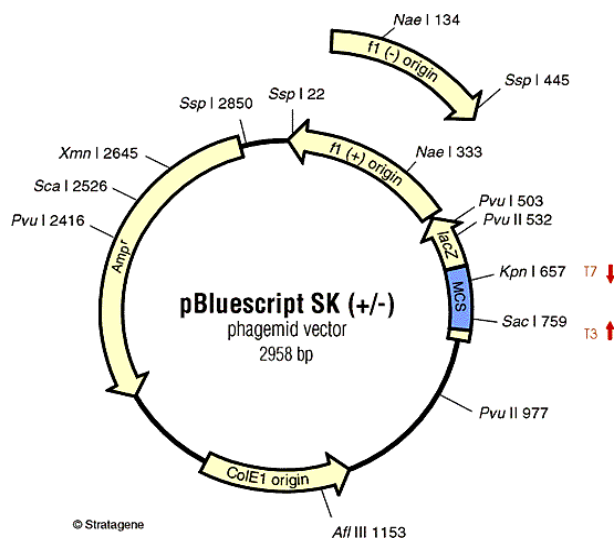


Fig. 26: Mappa del vettore pBlueScriptSK

Il gene lacZ è attivato dall'isopropil- β -D-tiogalattoside (IPTG), che induce l'espressione dell'enzima e quindi l'idrolisi del substrato incolore 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galattoside

(X-Gal) aggiunto al mezzo di coltura, convertendolo in un composto blu insolubile. Il clonaggio di un gene di interesse nel “polylinker” determina l’interruzione del gene lacZ e l’espressione di una β -galattosidasi incapace di idrolizzare il cromogeno X-Gal. I cloni trasformati con il plasmide ricombinante e quelli contenenti il vettore ‘scarico’ saranno, pertanto, distinguibili risultando incolori i primi e blu i secondi (sistema di selezione mediante alfa-complementazione). Il “polylinker” è fiancheggiato dai promotori T3 e T7, per la trascrizione *in vitro* del gene clonato ed il suo sequenziamento.

3.1.7.3 pcDNA3.1(+) (Invitrogen)

pcDNA3.1(+) (Fig. 27) è un vettore di circa 5.400 bp per l’espressione di proteine ricombinanti in cellule di mammifero. Tale plasmide contiene una sequenza promotrice derivante dal Citomegalovirus (CMV) per l’efficiente trascrizione del gene clonato, ed il segnale di poliadenilazione e le sequenze di terminazione della trascrizione del gene dell’ormone della crescita bovino (BGH), che incrementano la stabilità dell’RNA. E’ presente l’origine di replicazione di *Escherichia coli*, del virus 40 della scimmia (SV40), e del fago filamentoso f1. I geni di resistenza all’ampicillina e alla neomicina (questo ultimo è provvisto del promotore e del terminatore della trascrizione di SV40) consentono la selezione, rispettivamente, dei cloni trasformati di *Escherichia coli* e delle cellule di mammifero trasfettate stabilmente. Il “polylinker” è fiancheggiato dai promotori T7 e Sp6, per la trascrizione *in vitro* del gene clonato ed il suo sequenziamento.

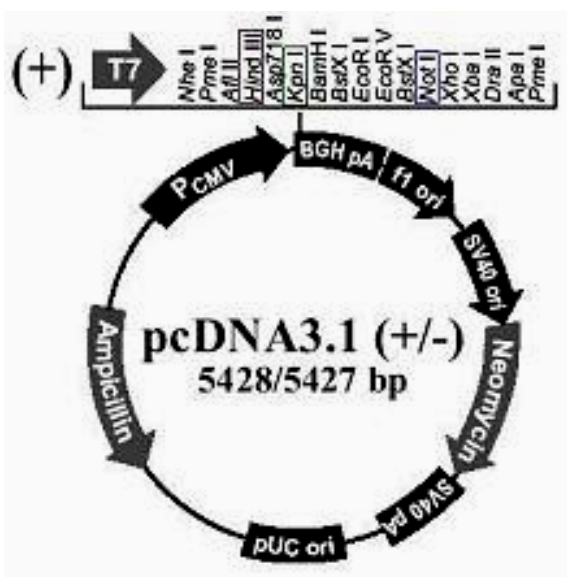


Fig. 27: Mappa del vettore pcDNA3.1 del suo polylinker. Sono stati evidenziati i siti di restrizione utilizzati per i clonaggi.

3.1.7.4 pPVX201

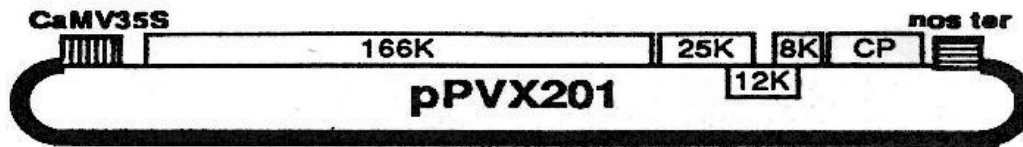


Fig. 28: Diagramma con le principali caratteristiche del vettore pPVX201 (descritte nel testo)

Il vettore pPVX201 (Fig. 28) è un vettore basato sul virus PVX (virus ad RNA (+) a singolo filamento, membro della famiglia dei *potexvirus*). In tale vettore è stato clonato il cDNA corrispondente al genoma virale che comprende 5 ORF: la ORF situata all'estremità 5' (ORF1) codifica la replicasi virale RNA-dipendente di 166 kDa; le ORFs 2,3,4, parzialmente sovrapposte e costituenti il "blocco genico triplo" (TGB) codificano tre proteine (TGBp1, TGBp2, TGBp3), essenziali per la diffusione del virus da cellula a cellula. La ORF 5 situata in 3' codifica per la "coat protein" (CP) del virus. Nel vettore pPVX201 il promotore subgenomico (sgP) per l'RNA della CP è stato duplicato. Tale duplicazione consente il controllo della trascrizione dell'RNA subgenomico della CP tramite il promotore al 3', mentre la regolazione della trascrizione della sequenza di interesse clonata nel polylinker è affidata al promotore duplicato in 5' posizionato, appunto, a monte del sito multiplo di clonaggio. A monte del cDNA virale così modificato è stato inserito il promotore 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV35S); a valle, si trova il terminatore della trascrizione del gene della nopalina sintasi di *Agrobacterium tumefaciens* (nos ter).

Lo scheletro del vettore pPVX201 contiene anche l'origine di replicazione di *Escherichia coli* ed il marcatore di selezione Amp^r. (Baulcombe *et al.*, 1995).

3.1.7.5 pET-32a

I vettori pET sono plasmidi batterici progettati per consentire la rapida produzione di proteine ad elevati livelli, quando attivati. Tale plasmide contiene il gene lacI che codifica per il repressore lac, un promotore T7 specifico per la RNA polimerasi di T7, un operatore lac che può bloccare la trascrizione, il "polylinker", l'origine di replicazione f1 (per la produzione di un plasmide a singolo filamento durante la co-infezione con il fago helper M13), il marcatore di selezione Amp^r e l'origine di replicazione ColE1 (Fig. 29).

pET-32a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	764-780
T7 transcription start	763
Trx*Tag coding sequence	366-692
His*Tag coding sequence	327-344
S*Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites (Nco I - Xho I)	158-217
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	1171-2250
pBR322 origin	3684
<i>bla</i> coding sequence	4445-5302
f1 origin	5434-5889

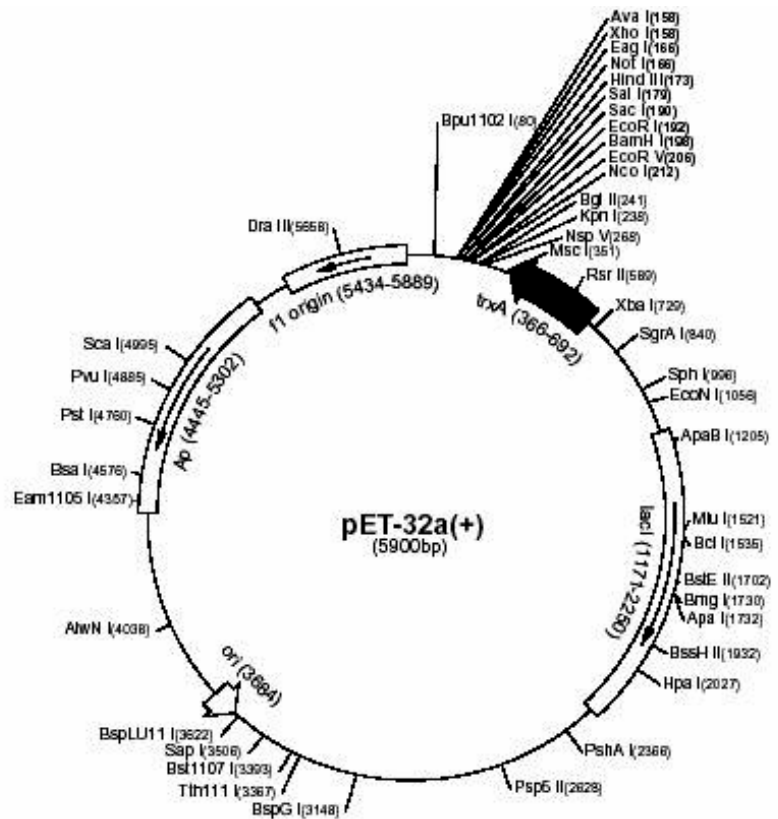


Fig. 29: Mappa del plasmide pET32a. In alto a sinistra è indicata la regione compresa tra il promotore T7 ed il terminatore T7 della trascrizione mancante nel plasmide modificato utilizzato per i clonaggi.

Nel presente lavoro, il plasmide pET-32a è stato meramente utilizzato ai fini della fusione dei geni E7 ed E7GGG nella regione del “loop” del gene della lichenasi di *Clostridium thermocellum*, poiché quest’ultimo era stato già clonato in tale plasmide.

Infatti, la regione corrispondente al dominio catalitico della lichenasi provvisto della sequenza per la secrezione PR-1A (“pathogen-related protein A”) all’estremità 5’, di un His₆ tag all’estremità 3’(preceduto o meno dalla sequenza di ritenzione nel reticolo endoplasmatico KDEL o da una sequenza di indirizzamento al vacuolo) e dei siti di restrizione Pac I ed XhoI (rispettivamente a monte ed a valle), era stato già ligato in un plasmide pET-32a modificato (mediante excisione della regione compresa tra il promotore ed il terminatore T7) tra i siti Bam HI e SacI introdotti artificialmente con l’uso di due primers. In questo modo erano stati ottenuti i costrutti pET-PRACS-Lic-KDEL e pET-PRACS-Lic-VAC (Fig. 30).

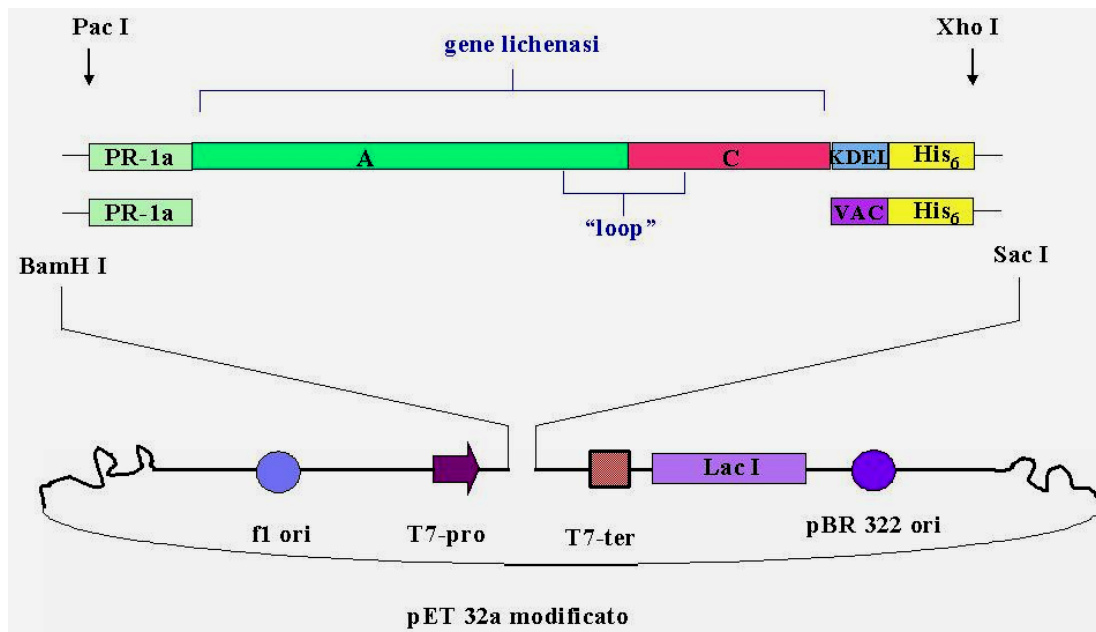


Fig. 30: Antefatto alla fusione delle sequenze E7 ed E7GGG al gene della lichenasi (sono indicate le regioni A e C del dominio catalitico): realizzazione dei costrutti pET-PRACS-Lic-KDEL e pET-PRACS-Lic-VAC derivanti dal clonaggio delle sequenze PRACS-Lic-KDEL e PRACS-Lic-VAC in un vettore pET modificato.

3.1.7.6 Plasmidi derivati da TMV e vettore pBI-D4

pBI-D4 è un vettore derivato dal vettore binario pBI121 in cui il gene "reporter" della beta-D-glucuronidasi di *Escherichia coli* (GUS) è stato sostituito con un "polylinker" (Fig. 31) nel quale, fra i siti Xba I e Sac I è stato clonato un vettore derivato dal virus del mosaico del tabacco (TMV), in cui il gene per la CP virale è stato sostituito da un altro "polylinker" per l'espressione di un gene di interesse sotto il controllo del promotore subgenomico della CP (Fig. 32) (Shivprasad *et al.*, 1999). Tale vettore era stato già ottenuto presso il "Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology", Newark -DE).

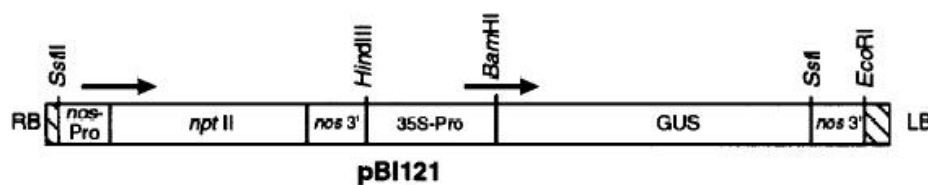


Fig. 31: Diagramma schematico dell'organizzazione del vettore pBI121

Il virus del mosaico del tabacco è un virus a RNA (+) di 6395 nucleotidi a simmetria elicoidale il cui cDNA è alla base di diversi vettori per l'espressione transiente ad elevati livelli in pianta di proteine eterologhe. L'RNA virale genomico esprime due proteine associate alla replicazione (R1 e R2); la proteina del movimento (M) e la CP sono espresse da RNA

subgenomici. L'efficienza del sgP della CP (freccia verde in *Figura 8*) e di un altro sgP situato più a monte di questo (che promuove la trascrizione di un RNA subgenomico relativo sia alla proteina del movimento M, sia alla CP - freccia viola), fa sì che la CP del TMV rappresenti il 10% delle proteine solubili totali (TSP) contenute nelle piante infettate da questo virus.

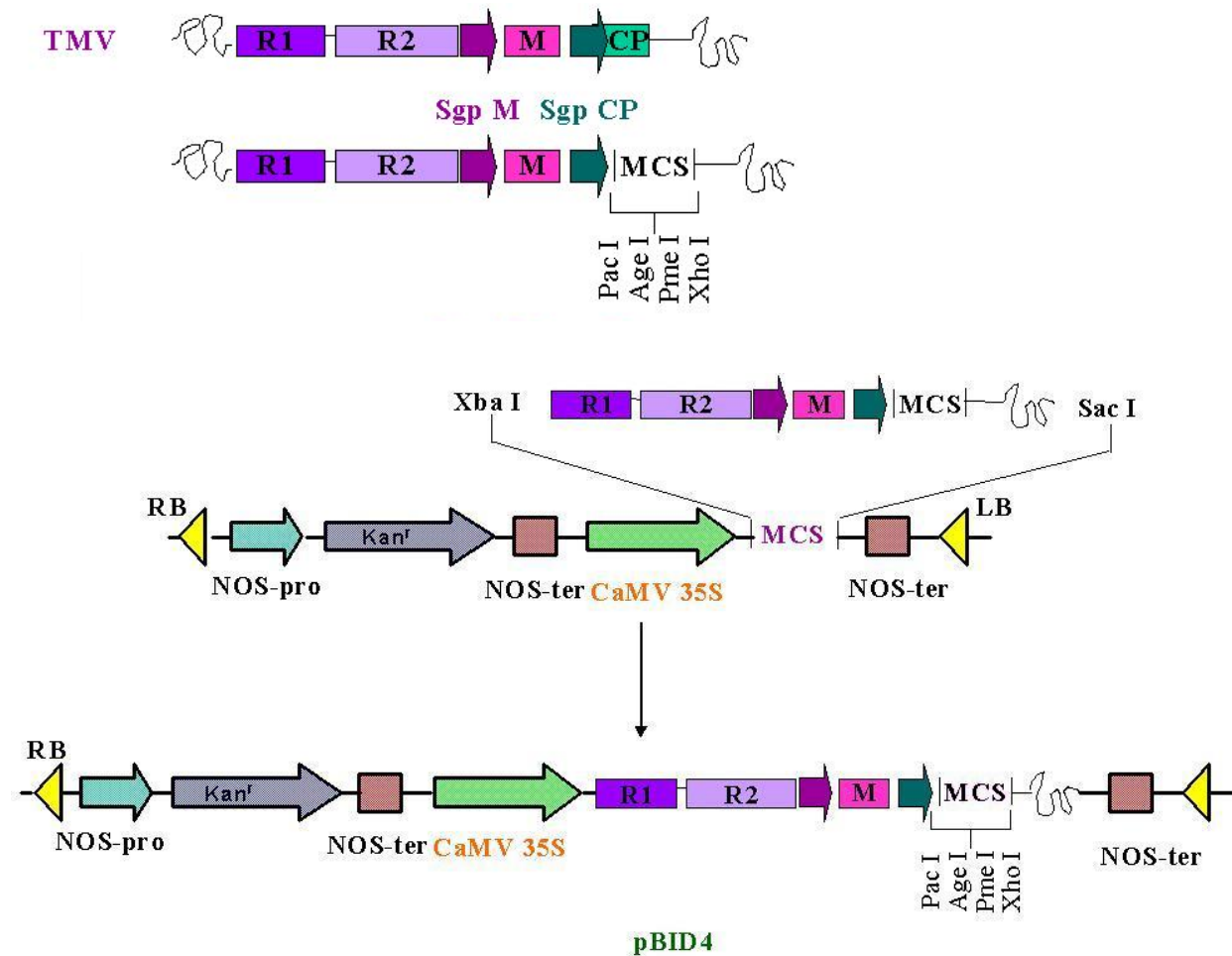


Fig. 32: Diagramma schematico della derivazione del plasmide pBID4 da un vettore pBI dopo escisione del gene GUS in cui è stato clonato un plasmide derivato da TMV (tale vettore è stato ottenuto presso il "Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology", Newark -DE).

A) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO A DNA BASATO SU UNA VERSIONE NON ONCOGENA DEL GENE E7 DI HPV16 FUSA ALLA SEQUENZA CODIFICANTE PER LA CP DI PVX E/O ALLA SEQUENZA SEGNALE DELLA PGIP DI *Phaseolus vulgaris*

3.2. MUTAGENESI DEL GENE E7 NEL SITO DI LEGAME A pRb

Per ragioni di sicurezza, il gene E7 di HPV16 già clonato nel plasmide pQE30 (pQE30-E7) (siti *BamHI/ PstI*) dal plasmide recante l'intero genoma di HPV 16 (KO2718, Seedorf *et al.*, 1985), è stato mutato nel sito di legame al pRb utilizzando il "Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene) per generare il plasmide pQE30-E7GGG. Tre mutazioni puntiformi che abbattano il potere trasformante della proteina E7 sono state, in questo modo, introdotte mediante opportuni oligonucleotidi (GC=40%, provvisti di una base pirimidinica al 3', e purificati mediante "fast polynucleotide liquid chromatography" secondo le indicazioni della ditta produttrice del kit) recanti le mutazioni puntiformi come indicato dal carattere in grassetto:

- *E7GGG dir:*

5'-CAACAAGAgACAACCT **gg₆₁T** CTCTAC **g₆₉gT** TAT **gg₇₆g** CAATTAAATgACAgC -3'

┌───┐
┌───┐
┌───┐
Asp₂₁>Gly
Cys₂₄> Gly
Glu₂₆>Gly

- *E7GGG rev:*

5'-gCTgTCATTTAATTg **CCC** ATA **ACC** gTAgAg **ACC** AgTTgTCTCTggTTg C-3'

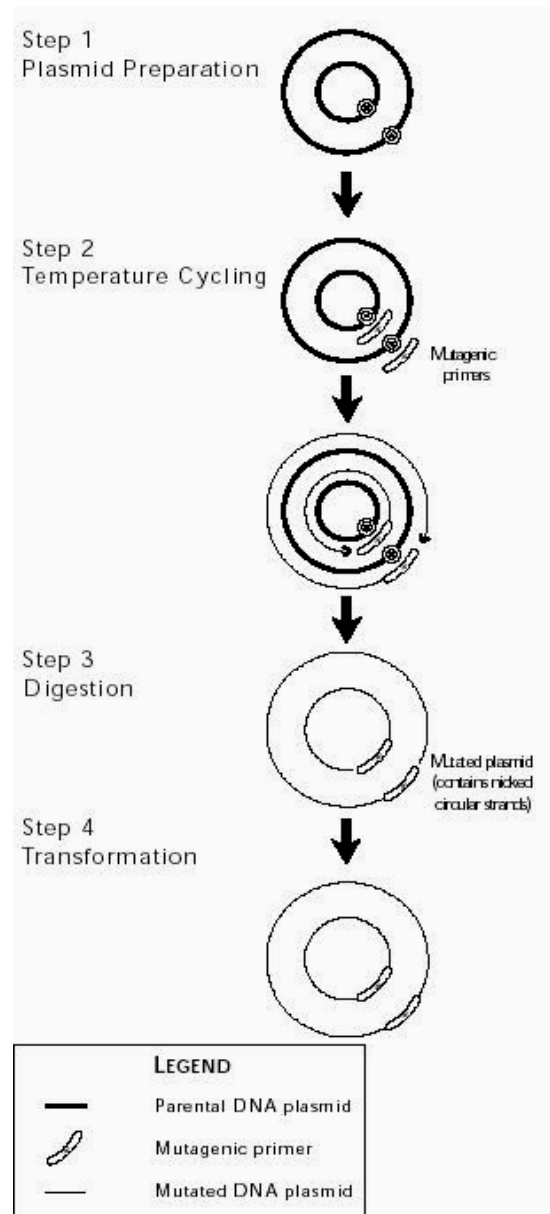
┌───┐
┌───┐
┌───┐
Glu₂₆>Gly
Cys₂₄> Gly
Asp₂₁>Gly

La procedura di base per la mutagenesi secondo il kit, prevede l'uso del DNA stampo a doppio filamento contenente il gene di interesse isolato da un ceppo (*dam+*) di *E. coli*, e dei due oligonucleotidi di sintesi contenenti le mutazioni desiderate. L'incorporazione degli oligonucleotidi genera filamenti circolari con un "nick" contenenti le mutazioni ma non metilati. L'endonucleasi *DpnI* (sequenza target: 5'-Gm6ATC-3'), specifica per il DNA, opera, quindi, la digestione del DNA stampo parentale e seleziona il DNA neo-sintetizzato contenente le mutazioni. Il plasmide generato (contenente i "nick" e le mutazioni desiderate) viene quindi trasformato in XL1-Blue "supercompetent cells", che riparano i tagli (*Fig. 33*).

Reazione di sintesi del filamento mutato

Per l'amplificazione durante la mutagenesi sito-diretta è stato impiegato l'enzima *PfuTurbo* DNA polimerasi, derivante dall'archeobatterio marino ipertermofilo *Pyrococcus furiosus*. La frequenza di errore che caratterizza l'attività di tale enzima è pari a 1.3 errori introdotti ogni 10^6 coppie di basi (2.6% di prodotti errati/reazione) contro un tasso pari a 8×10^{-6} (12% di prodotti errati/reazione) della Taq DNA polimerasi. L'impiego della *Pfu Turbo* DNA polimerasi è, quindi, assolutamente dovuto nel caso presente, in cui è prevista l'introduzione, e l'amplificazione di 3 mutazioni sito-specifiche, il cui mantenimento è critico per l'abolizione del potere trasformante rispetto al prodotto del gene "wild type" E7 di HPV 16.

Fig. 33: Procedura di mutagenesi mediante kit "Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit"



Reazione di mutagenesi sul template pQE30-E7:

- 5 μ l buffer di reazione 10 \times
- 50 ng di DNA pQE30-E7
- 125 ng di oligonucleotide E7GGG dir
- 125 ng of oligonucleotide E7GGG rev
- 1 μ l di dNTP mix
- H₂O fino a volume (50 μ l)
- 1 μ l di *PfuTurbo* DNA polimerasi (2.5 U/ μ l)

pQE30-E7, secondo le istruzioni, è stato sottoposto a PCR nelle seguenti condizioni:

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

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

Trasformazione delle cellule *XL1-blue* Supercompetenti:

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

L'autenticità della sequenza del gene E7GGG risultante è stata verificata mediante sequenziamento dopo aver estratto il DNA plasmidico dai cloni trasformati.

3.3 ESPRESSIONE DELLA PROTEINA E7GGG IN *E. coli*.

3.3.1 Induzione di cellule *XL1 blue* contenenti il costrutto pQE30-E7GGG

Una singola colonia di cellule *XL-1 blue* trasformate con il plasmide pQE30-E7GGG è stata inoculata in 25 ml di terreno liquido LB contenente ampicillina (100 µg/ml) e cresciuta in agitazione a 250 rpm per 16 ore a 37°C. 20 ml della coltura cresciuta O.N (“over night”). sono stati diluiti in 500 ml finali dello stesso terreno liquido LB contenente ampicillina (100 µg/ml) e lasciati crescere fino a $O.D.(\lambda=600\text{ nm}) \sim 0.6$. La coltura è stata poi indotta con IPTG 1 mM, lasciata in agitazione (250 rpm a 30°C) per 3 ore, e, quindi, centrifugata a 5000 rpm per 15 minuti a 4°C. Eliminato il sovrnatante, il pellet ottenuto è stato pesato e congelato a -80°C per procedere alla purificazione.

3.3.2 Purificazione della proteina E7GGG con His₆-tag in condizioni native tramite cromatografia per affinità con ioni metallici immobilizzati

La cromatografia per affinità con ioni metallici immobilizzati, permette di purificare una proteina di interesse mediante un complesso metallico immobilizzato su un supporto cromatografico (agarosio). Nel caso specifico, il complesso utilizzato è costituito da ioni nichel

(Ni²⁺) covalentemente legati all'acido nitrilotriacetico (NTA) che è un tetrachelante e costituisce la resina Ni-NTA (Qiagen). Tale complesso lega le proteine espresse con un tag di 6 istidine (His₆-tag) tramite le due posizioni libere della sfera di coordinazione degli ioni Ni²⁺. L'eluizione avviene con alte concentrazioni di imidazolo che compete con i gruppi imidazolici dell'His₆-tag.

La proteina His₆-E7 di HPV16 indotta in *E. coli*, poiché tossica per il microrganismo o semplicemente perché super-espressa, si accumula in corpi di inclusione, aggregati insolubili di proteine non correttamente ripiegate, rivestiti da doppia unità di membrana. Tali corpi di inclusione possono essere purificati facilmente ma, la solubilizzazione della proteina espressa in queste condizioni, necessaria per ottenerne la purificazione mediante cromatografia per affinità, è ottenuta utilizzando condizioni fortemente denaturanti. La denaturazione, modifica la struttura secondaria, terziaria o quaternaria delle proteine (*Figura 34*) e comporta perdita delle attività biologiche, aggregazione, ed incremento della sensibilità agli enzimi proteolitici.

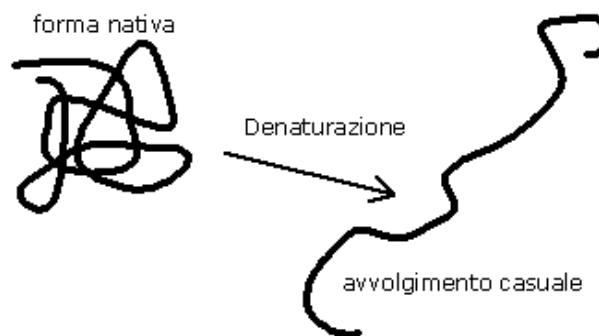


Fig. 34: Esempificazione delle alterazioni della struttura e perdita della conformazione nativa a seguito di denaturazione.

Per tale ragione è preferibile ottenere la purificazione di una proteina di interesse in condizioni che ne preservino la conformazione, e quindi in forma nativa. Essendo stato già messo a punto un protocollo per la purificazione mediante cromatografia per affinità in condizioni native per la proteina His₆-E7 di HPV16 nel nostro laboratorio, tale protocollo è stato applicato anche alla proteina His₆-E7GGG. I tamponi utilizzati sono i seguenti:

TAMPONE DI LISI

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

10 mM Imidazolo

TAMPONE DI LAVAGGIO

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

20 mM Imidazolo

TAMPONE DI ELUIZIONE

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

250 mM Imidazolo

Il pellet ottenuto dalle colture batteriche dopo induzione è stato risospeso in Tampone di Lisi (3,5 ml/g) in presenza di inibitori di proteasi alla concentrazione finale 1x (“*complete*, EDTA-*free*” Boehringer). In seguito è stato aggiunto Lisozima (1 mg/ml) e Triton X-100 (1% finale) ed è seguita incubazione in ghiaccio per 1 ora.

Sono state poi effettuate quattro sonicazioni della durata di 20 secondi a frequenza 10 Hz per la frammentazione del DNA residuo, mantenendo il campione in ghiaccio. Il campione è stato centrifugato a 15000 rpm per 45 minuti a 4°C. Il sovrantante è stato incubato per 16 ore su ruota con resina Ni-NTA (circa 1 ml) precedentemente risospesa con lo stesso Tampone di Lisi. La resina è stata fatta sedimentare in una colonna per cromatografia e, quindi, sottoposta a lavaggi successivi con circa 100 ml di Tampone di Lisi e circa 500 ml di Tampone di Lavaggio, finchè la O.D._(λ= 280 nm) è risultata minore di 0.01. A questo punto si è eluito con 4 volumi (6 ml) di Tampone di Eluizione, raccogliendo frazioni da 1 ml. Le frazioni riunite e dializzate, per eliminare l’imidazolo e gli altri sali, contro PBS + 0.1 mM ZnCl₂, O.N., a 4°C, sono state conservate a -20°C e da esse sono stati preparati i campioni per la verifica tramite SDS-PAGE ed “immunoblotting”.

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

La verifica dell’espressione batterica e della purificazione delle proteine His₆-E7 ed His₆-E7GGG, è stata effettuata utilizzando il sistema SDS-PAGE secondo Laemmli. Il gel di separazione di poliacrilammide (acrilammide/bisacrilammide 29: 1) è stato preparato ad una concentrazione finale del 12% in presenza di SDS 0.1%. I campioni preparati in “gel loading buffer” per proteine sono stati sottoposti a bollitura per 4 minuti per favorirne la denaturazione. La corsa elettroforetica è stata effettuata su apparato MiniProtean III (BioRad) a 100 Volts in “running buffer” 1x.

3.3.4 Colorazione delle proteine con Blu di Coomassie

Dopo la corsa elettroforetica si è proceduto alla colorazione del gel con Blu di Coomassie R 250 allo 0.1% in 40% metanolo e 20% acido acetico per circa 30 minuti. Il gel è stato quindi decolorato in “destaining solution” (40% metanolo e 20% acido acetico v/v) O.N. Tutti i passaggi sono stati svolti in leggera agitazione.

3.3.5 “Immunoblotting”

Le proteine separate su SDS-PAGE sono state sottoposte a trasferimento elettrico a voltaggio costante di 100 Volts, per 1 ora a 4°C in “transfer buffer” freddo in agitazione, dal gel denaturante di poliacrilammide su membrana di “polyvinylidene fluoride” (PVDF: “Immobilon-P, Millipore”), precedentemente attivata per 10 minuti con un bagno in metanolo assoluto. Avvenuto il trasferimento, la membrana è stata posta in leggera agitazione con soluzione bloccante (PBSM 5%) per 2 ore oppure O.N.

Dopo 2 lavaggi in PBST, intervallati da 1 lavaggio in PBST+NaCl, la membrana è stata incubata in MPBS 2% contenente l'anticorpo primario pAb α -E7 (diluito 1:1000), in agitazione, per 2 ore o O.N. a 15 ÷ 20°C. Ripetuti i lavaggi, si è proceduto all'incubazione della membrana in MPBS 2% contenente l'anticorpo secondario “anti-mouse” biotinilato 1021 (diluito 1:5000), in agitazione, per 1 ora a temperatura ambiente (R.T.).

Dopo 2 ulteriori lavaggi in PBST, intervallati da 1 lavaggio in PBST+NaCl, la membrana è stata incubata in presenza di streptavidina perossidasi diluita 1:2000 in MPBS 2%.

Per la rivelazione delle proteine d'interesse è stato impiegato il kit di rivelazione ECL Plus (“Enhanced Chemi-Luminescence”, Amersham), basato sull'emissione di luce a seguito dell'ossidazione del luminolo in presenza di perossido di idrogeno e di attivatori chimici, da parte della perossidasi di rafano, con conseguente emissione luminosa. La membrana è stata, pertanto, incubata con 1 ml di soluzione A + 250 μ l di soluzione B. La luce emessa per chemio-luminescenza è stata poi rivelata esponendo la membrana ad una lastra fotografica.

3.4 PREPARAZIONE DEI PLASMIDI RICOMBINANTI BASATI SU pcDNA3.1(+)

3.4.1 Sequenza E7GGG e sequenza CP

La sequenza codificante per la proteina E7GGG è stata amplificata mediante PCR dal plasmide pQE30-E7GGG con l'enzima *Pfu Turbo* DNA polimerasi. Tale enzima, oltre a garantire un'alta fedeltà di amplificazione è, inoltre, privo di attività trasferasica terminale e genera, di conseguenza, sequenze di DNA con estremità troncate utili per il clonaggio

intermedio nel vettore pBlueScriptSK(+) nel sito di restrizione *EcoRV*. Le miscele di PCR sono state così preparate:

- Tampone di reazione 1x (Stratagene)
- 250 µM di dNTP mix (Amersham) [10 mM dATP,
10 mM dCTP,
10 mM dGTP
10 mM dTTP]
- 10 pmoli di primer diretto,
- 10 pmoli di primer “reverse”,
- 100 ng di DNA templatato,
- 1 unità di *Pfu Turbo* DNA polimerasi [2.5 U/µl] (Stratagene),
- H₂O sterile a volume.

La miscela è stata incubata in termociclatore nelle seguenti condizioni:

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

Per l'amplificazione della sequenza E7GGG sono stati usati il primer diretto *E7HIII dir*, fiancheggiato dal sito di restrizione per l'endonucleasi *HindIII*, e contenente la sequenza di Kozac ANNNNg per la regolazione della traduzione (indicata in grassetto; il codone ATg di inizio della traduzione, compreso nella sequenza di Kozac, è indicato in corsivo), ed il primer inverso *E7Not rev*, fiancheggiato dal sito di restrizione *NotI* e contenente il codone di stop della traduzione (indicato in corsivo).

- *E7HIII dir*:



- *E7Not rev*:



La sequenza codificante per la CP di PVX è stata amplificata mediante PCR dal plasmide pPVX201 con l'enzima *Pfu Turbo* DNA polimerasi. Sono stati usati il primer diretto *CPHIII*

- *CP-link-E7 rev:*

5'- gCT AgC Tgg **Agg TCC ggg TCC** Tgg TTT CTg AgA ACA gAT ggg -3'

gene CP
linker
gene E7GGG

Per l'amplificazione della sequenza relativa al gene CP a partire dal template pPVX201 ai fini dell'assemblaggio con E7, è stato utilizzato il primer diretto *E7-CPdir* recante gli ultimi nucleotidi a valle del gene E7GGG ed i primi nucleotidi a monte del gene CP a partire dal quarto codone (per la realizzazione della fusione E7GGG-CP) oppure il primer diretto *E7-link-CP dir* recante gli ultimi nucleotidi a valle del gene E7GGG, la sequenza relativa al linker, ed i primi nucleotidi a monte del gene CP a partire dal quarto codone (per la fusione E7GGG-linker-CP), ed il primer inverso *CP-Not rev* (Fig. 35, Fig. 36).

- *E7-CP dir:*

5'- **ATC TgT TCT CAg AAA CCA CCA** gCT agC ACA ACA CAg CCC -3'

gene E7GGG
gene CP

- *E7-link-CP dir:*

5'- **CAg AAA CCA GGA CCC GGA CCT** CCA gCT AgC ACA ACA CAg CCC -3'

gene E7GGG
linker
gene CP

- *CP-Not rev:*

5'- TTC TCg ACT **TgC ggC CgC** TTA Tgg Tgg Tgg TAg AgT gAC -3'

NotI
STOP
gene CP

Le sequenze così generate, sono state assemblate mediante "splicing by overlap extension PCR" (SOE-PCR) (Fig. 35, Fig. 36). Tale tecnica prevede una serie di cicli di reazione catalizzati dalla *Pfu Turbo* DNA polimerasi. La miscela di reazione contenente:

- Tampone di reazione 1x (Stratagene),
 - 250 µM di dNTPs (Amersham),
- le sequenze di DNA da assemblare in rapporto molare 1:1,
- 1 unità di *Pfu Turbo* DNA polimerasi [2.5 U/µl] (Stratagene)
- H₂Odd, fino a volume

è stata incubata in termociclatore nelle seguenti condizioni:

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

I prodotti di fusione sono stati, successivamente, amplificati mediante PCR utilizzando gli inneschi oligonucleotidici specifici (*E7HIII dir* e *CPNotRev*) nelle medesime condizioni di reazione descritte in precedenza (§ 3.4.1).

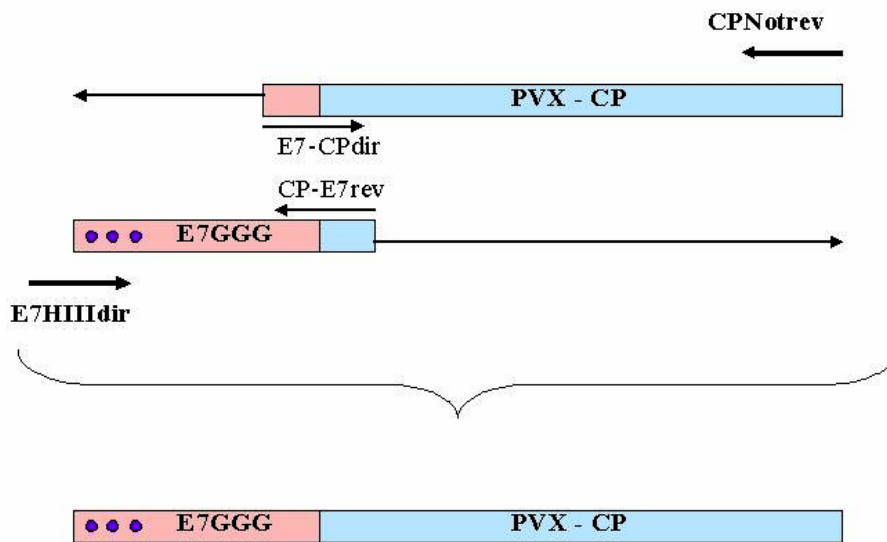


Fig. 35: Amplificazione con gli opportuni oligonucleotidi delle singole sequenze *E7GGG* e *CP* in vista dell'assemblaggio per la generazione delle sequenze *E7GGG-CP*.

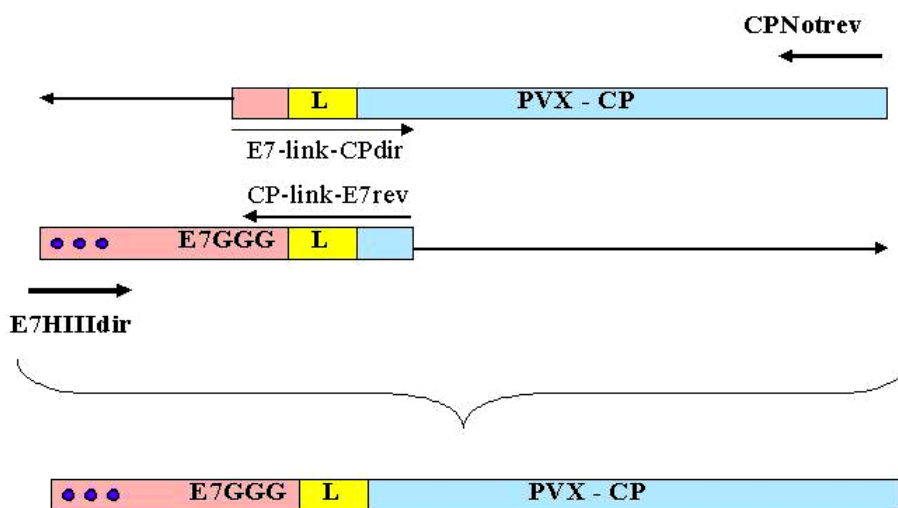


Fig. 36: Amplificazione con gli opportuni oligonucleotidi delle singole sequenze *E7GGG* e *CP* in vista dell'assemblaggio per la generazione delle sequenze *E7GGG-link-CP*.

3.4.4 Sequenze PGIPss-E7GGG-CP e PGIPss-E7GGG-L-CP

Sono state impiegate, come materiale di partenza, le fusioni PGIPss-E7GGG, E7GGG-CP ed E7GGG-L-CP, già ottenute e clonate in pcDNA3.1(+).

In particolare, la sequenza PGIPss-E7GGG è stata amplificata a monte con l'oligonucleotide *PGIPK3 back*, e a valle, alternativamente, con l'oligonucleotide *CP-E7 rev*, o con l'oligonucleotide *CP-link-E7 rev*. D'altra parte, le sequenze E7GGG-CP ed E7GGG-L-CP sono state amplificate a monte, rispettivamente, con il primer *E7-CP dir*, o con il primer *E7-link-CP dir*; a valle è stato impiegato, per entrambe le sequenze, il primer *CP-Not rev* (Fig. 37). La reazione di amplificazione, così condotta, ha permesso di ottenere sequenze geniche parzialmente sovrapponibili, che sono state poi assemblate mediante SOE-PCR. La reazione è stata catalizzata dalla *Pfu Turbo* DNA polimerasi nelle condizioni già descritte.

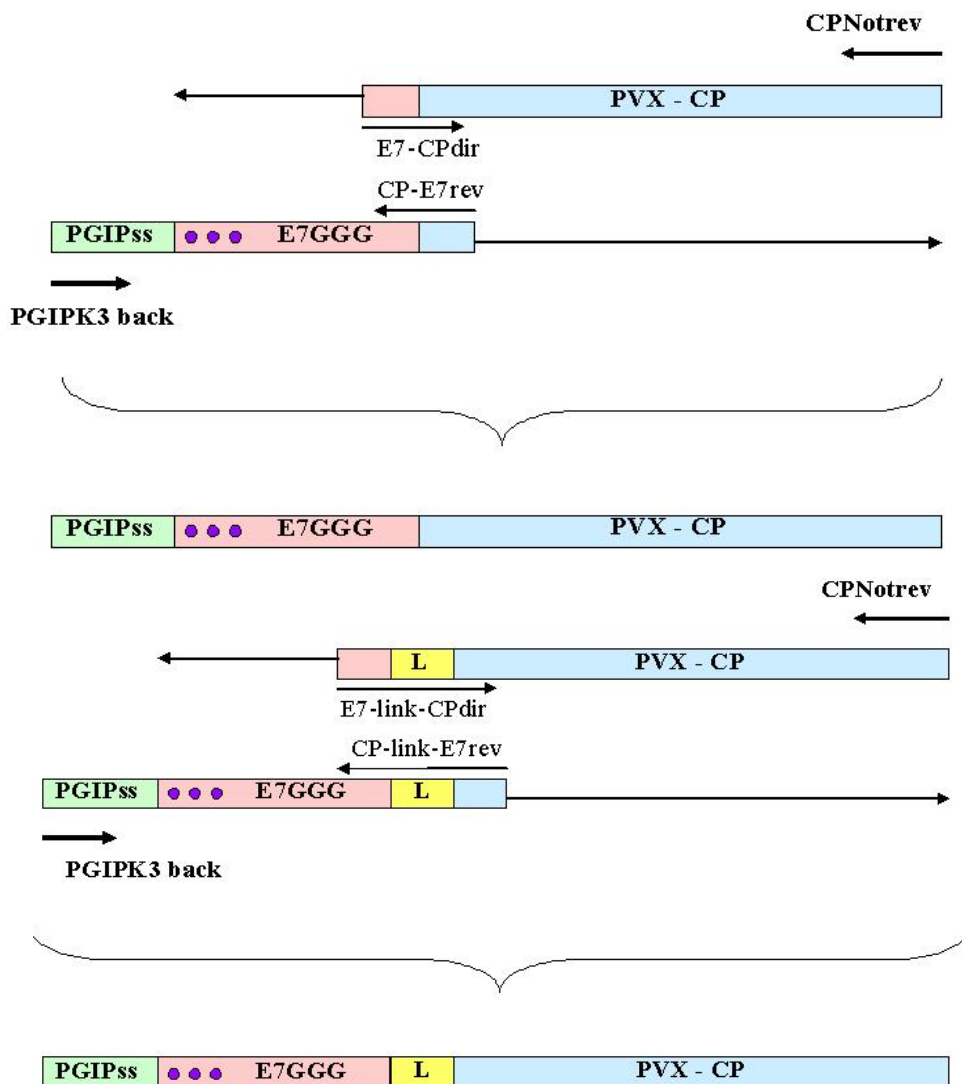


Fig. 37: Amplificazione con gli opportuni oligonucleotidi delle sequenze PGIPss-E7GGG e CP in vista dell'assemblaggio per la generazione delle sequenze PGIPss-E7GGG-CP e PGIPss-E7GGG-Link-CP.

3.4.5 Clonaggio delle sequenze nel vettore intermedio pBlueScriptSK(+)

Tutte le sequenze di DNA fin qui descritte, sono state analizzate mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% in tampone TAE 1x con aggiunta di bromuro di etidio (Sigma, concentrazione finale 0.5 µg/ml). Le bande corrispondenti ai frammenti genici di interesse sono state estratte ed il DNA è stato purificato al fine di effettuare i clonaggi, utilizzando il "GFX purification kit" (Amersham), secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. Tale metodo sfrutta l'intrappolamento del DNA in una matrice di fibre di vetro.

Tutte le sequenze sono state, quindi, inizialmente clonate nel vettore pBlueScriptSK(+) per la selezione mediante alfa-complementazione dei cloni trasformanti di *Escherichia coli* e per la verifica semplice ed attendibile della digestione dei frammenti genici clonati con endonucleasi di restrizione utili anche al subclonaggio nel vettore di espressione eucariotico finale.

Il vettore pBlueScriptSK(+) è stato digerito con l'endonucleasi di restrizione *EcoRV*, che genera estremità "piatte", per consentire l'inserimento dei frammenti genici amplificati con la *Pfu Turbo* DNA polimerasi. Le digestioni sono state effettuate attenendosi alle indicazioni fornite della casa produttrice dell'enzima (1 unità /1-2 µg di DNA, nell'appropriato buffer di reazione, per 1 ora a 37°C). Il DNA digerito è stato analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio e purificato.

3.4.5.1 Reazione di ligazione

La reazione di ligazione, catalizzata dalla DNA ligasi T4, clonata da *Escherichia coli*, è stata condotta mediante incubazione O.N. a 16 °C della miscela di reazione così composta:

- 1 µl di tampone di reazione 10 x (Roche) [660 mM Tris-HCl,
50 mM MgCl₂,
50 mM DTT,
10 mM ATP, pH 7.5]
- vettore plasmidico digerito
- inserto (in quantità conformi a un rapporto molare 1:1, o 1:2 con il vettore)
- 1 unità di DNA ligasi T4 [1 U/µl] (Roche)
- H₂O, fino al volume di 10 µl.

3.4.5.2 Trasformazione delle cellule batteriche con metodo chimico

Per la preparazione delle cellule competenti, la coltura batterica derivante da incubazione O.N. a 37 °C a 250 rpm, di 10 ml di terreno LB inoculato con una singola colonia di XL-1

blue, è stata diluita in rapporto 1:10 e reincubata nelle medesime condizioni, fino al raggiungimento della fase esponenziale di crescita ($D.O._{600\text{ nm}} = 0.4 \div 0.5$). La coltura è stata sottoposta a centrifugazione a 5000 x g per 15' alla temperatura di 4°C. Dopo rimozione del sovrantante, le cellule sono state risospese in 10 ml di tampone TSS e trasformate per via chimica.

Aliquote da 1 ml della sospensione di cellule batteriche in tampone TSS sono state mescolate con 5 µl di ciascuna miscela di ligazione ed incubate in ghiaccio per 45'.

Terminata l'incubazione, le cellule sono state sottoposte a "shock" termico (42°C per 2'), lasciare moltiplicare a 37°C in agitazione (250 rpm) per 45' e piastrate su terreno LB agarizzato, contenente 0.1 µg/ml di ampicillina. Per il clonaggio nel vettore pBlueScriptSK(+), al terreno solido sono stati aggiunti X-Gal (50 µl X-Gal 2% / piastra) ed IPTG (20 µl IPTG 10 mM / piastra), per la selezione dei cloni trasformanti mediante alfa-complementazione.

3.4.5.3 Caratterizzazione dei ricombinanti batterici mediante PCR su colonia

I cloni di *Escherichia coli*, trasformati con i plasmidi ricombinanti sono stati analizzati mediante PCR su colonia, utilizzando gli opportuni primers a monte e a valle per ciascuna sequenza. L'amplificazione del DNA è stata ottenuta nelle medesime modalità e condizioni descritte in precedenza (§ 3.4.1) impiegando l'enzima *Taq* DNA polimerasi.

3.4.5.4 Mini preparazioni di DNA plasmidico

Le colonie risultate positive in PCR per la presenza del plasmide contenente gli inserti di interesse sono state inoculate in 5 ml di terreno LB, in presenza di ampicillina (concentrazione finale = 0.1 µg/ml), poste a 37°C e in agitazione a 250 rpm durante la notte e, quindi, centrifugate a 5000 x g per 10', per estrarre il DNA plasmidico, da verificare mediante sequenziamento, con "Qiagen Plasmid Mini kit" (Qiagen), nelle modalità e condizioni indicate nel protocollo fornito dalla casa produttrice.

La qualità del DNA purificato è stata verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio, mentre la concentrazione è stata determinata spettrofotometricamente, mediante lettura dell'assorbanza a 260 nm.

I plasmidi intermedi ricombinanti sono stati sequenziati con i primers universali T3 e T7. Per il sequenziamento è stato utilizzato un sequenziatore a capillari (ABI PRISM 310) e l'analisi delle sequenze è stata eseguita con il programma Mac Vector 7.0.

3.4.6 Clonaggio delle sequenze nel vettore di espressione eucariotico pcDNA3.1(+)

Per i cloni batterici positivi in PCR e contenenti le sequenze corrette, si è proceduto a Midi preparazione di DNA plasmidico con “Genopure Plasmid Midi kit” (Roche), secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice. Utilizzando tali preparazioni, tutte le sequenze sono state excise dal vettore procariotico intermedio con le endonucleasi di restrizione *HindIII* e *NotI*, impiegate anche per la digestione del vettore pcDNA3.1(+), con l’eccezione delle sequenze recanti il segnale PGIPss che sono state excise con le endonucleasi di restrizione *KpnI* e *NotI*, impiegati anche per pcDNA3.1(+). I plasmidi ricombinanti ottenuti sono stati poi impiegati per l’espressione dei prodotti di fusione in cellule di mammifero (Fig. 38).

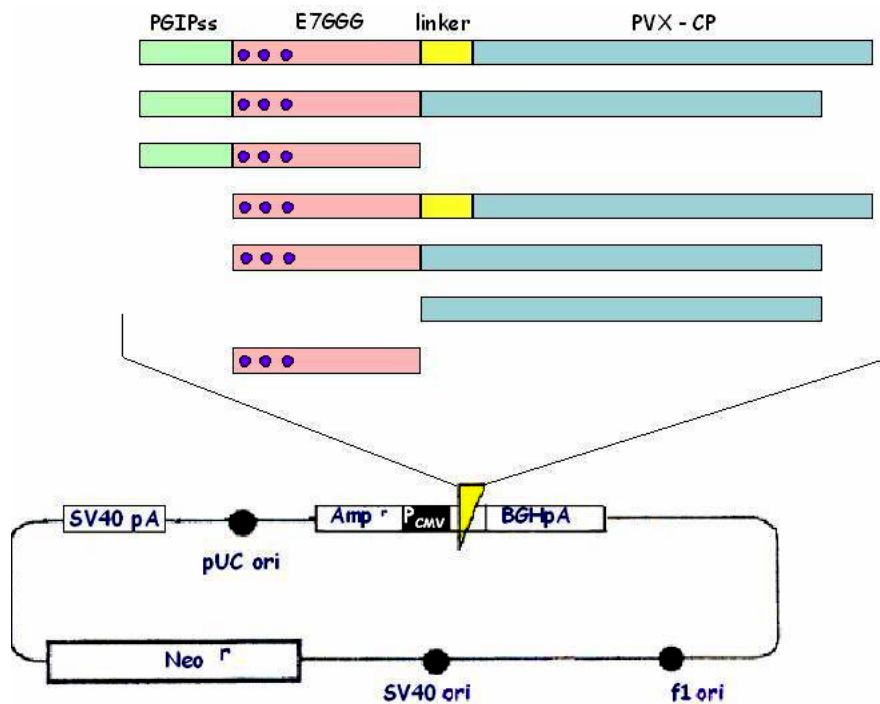


Fig. 38: Rappresentazione schematica di tutti i costrutti ottenuti in pcDNA3.1(+).

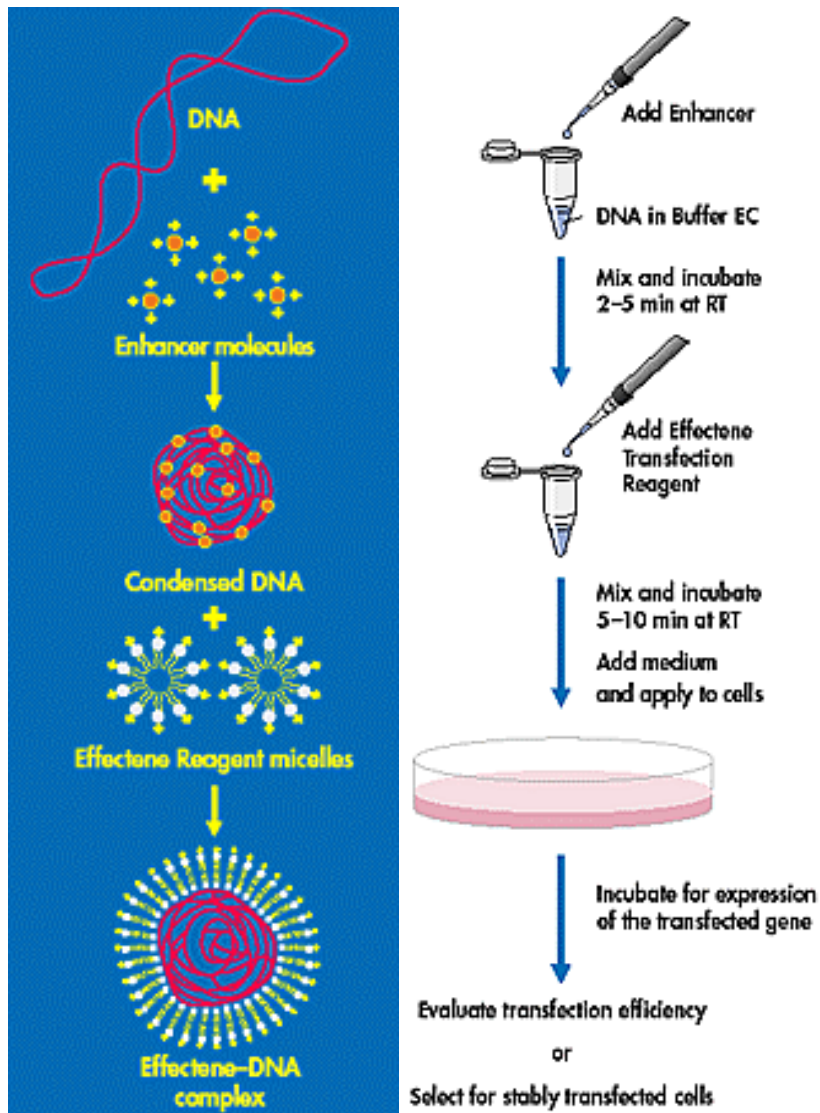
3.5 ESPRESSIONE IN CELLULE DI MAMMIFERO

3.5.1 Maxi preparazione di DNA plasmidico in assenza di endotossine

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

3.5.2 Trasfezione di cellule di mammifero

I plasmidi ricombinanti pcDNA3.1 sono stati utilizzati per la trasfezione transiente della linea cellulare di mammifero HEK 293. La trasfezione è stata eseguita mediante agenti lipidici non liposomali (“Effectene Transfection Reagent”, Qiagen).



Il metodo impiegato prevede la condensazione del DNA plasmidico, diluito in un apposito tampone, in presenza di un “enhancer”; l’*Effectene*, aggiunto successivamente. Questo circonda il materiale genetico condensato, generando strutture micellari, atte a fondersi con la membrana plasmatica cellulare (Fig. 39).

La trasfezione è stata effettuata su cellule alla confluenza del 40 ÷ 50% in piastre da 6 pozzetti, impiegando 500 ng di DNA per pozzetto.

Fig. 39: Principio d’azione dell’agente lipidico Effectene e metodica di trasfezione

Ciascun plasmide ricombinante, diluito in tampone di condensazione sino al volume di 100 μ l, è stato incubato a temperatura ambiente per 5’, in presenza di “enhancer” (3.2 μ l/pozzetto), per consentire un’ulteriore condensazione dell’acido nucleico, necessaria per il successivo

inglobamento nelle vescicole lipidiche formate dall'*Effectene*. Quest'ultimo è stato addizionato a ciascuna miscela di reazione (10 µl/pozzetto) e incubato con il DNA condensato a temperatura ambiente per 10', per la formazione dei complessi. A ciascuna miscela così ottenuta sono stati aggiunti 600 µl di DMEM completo e ogni preparazione è stata dispensata goccia a goccia nel rispettivo pozzetto già contenente 1.6 ml di terreno completo fresco (*Fig. 39*).

La trasfezione è stata effettuata sia in assenza sia in presenza degli inibitori del proteasoma Lactacistina (10 µM) ed MG-132 (25 µM) aggiunti al terreno di coltura a 24 ore dalla trasfezione, al fine di verificare la sensibilità dei prodotti di fusione codificati dai plasmidi ricombinanti al processo di degradazione proteasomale ubiquitina-mediato.

La lactacistina ("synthetic lactacystin", Calbiochem; ricostituita in H₂O prima dell'uso) è, infatti, un metabolita di *Streptomyces* che agisce come inibitore irreversibile del proteasoma inibendone l'attività chimotripsino e tripsino-simile. Ha anche attività apoptogena.

MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO, Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal, Calbiochem; dissolto in DMSO prima dell'uso) è un inibitore irreversibile del proteasoma, permeabile alle membrane con attività apoptogena.

3.5.3 **Analisi dei lisati cellulari**

3.5.3.1 SDS-PAGE ed "Immunoblotting"

Trascorse 48 ore dalla trasfezione, si è proceduto al distacco delle cellule trasfettate, precedentemente sottoposte a tre lavaggi in PBS 1x, dalla superficie dei pozzetti, per mezzo di raschietto sterile, per le successive analisi. Le cellule staccate dalla piastra, risospese in PBS 1x, con inibitori di proteasi (Roche), sono state poi bollite per 10' in tampone di caricamento per la denaturazione delle proteine, prima della separazione mediante SDS-PAGE e dell'"immunoblotting" (effettuato sviluppando i filtri sia con anticorpo pAb α-E7 1:1000, sia con anticorpo pAb α-PVX 1:1000 e con i corrispondenti anticorpi secondari biotinilati seguiti da incubazione con streptavidina perossidasiata, e sviluppati come descritto in precedenza, § 3.3.5).

3.5.3.2 Immunoprecipitazione

Alternativamente, i lisati chiarificati sono stati incubati con l'anticorpo primario α-E7 (diluito 1:1000) su ruota per due ore a 15 ÷ 25°C. Alla miscela sono stati successivamente aggiunti 100 µl di Proteina L (Pierce), coniugata ad agarosio e capace di interagire, ad alta affinità, con la regione variabile della catena leggera di tipo κ di numerose classi e sottoclassi di

immunoglobuline. In seguito ad incubazione per quattro ore su ruota a $15 \div 25^{\circ}\text{C}$, si realizza il legame della Proteina L all'anticorpo primario che determina la precipitazione dell'immunocomplesso formato dall'antigene di interesse e dall'anticorpo murino. Il pellet di resina, lavato più volte con PBS 1x, dopo l'incubazione, è stato risospeso in "gel loading buffer" per proteine, bollito per 4' e centrifugato per recuperare il sovrantante contenente gli immunocomplessi per l'analisi mediante SDS-PAGE oppure "immunoblotting" secondo le modalità già descritte.

3.5.3.3 Immunofluorescenza

Le cellule della linea HEK-293 sono state fatte crescere in "multi-chamber slides" e trasfettate come descritto. A 48 ore dalla trasfezione, le cellule adese al vetrino sono state sottoposte a 3 lavaggi in PBS 1x freddo in presenza di inibitori di proteasi, fissate in paraformaldeide al 4% in PBS per 10' e permeabilizzate con Triton X-100 0.1% in PBS 1x. I campioni sono stati sottoposti a "blocking" in MPBS al 5%. Le cellule sono state incubate con l'anticorpo pAb α -E7 1:1000, seguito dall'anticorpo anti-mouse biotinilato 1021 1:300 e da streptavidina coniugata con FITC 1:50. I nuclei sono stati contro-colorati con Dapi 1x in PBS, alla fine della procedura, prima dell'allestimento finale del vetrino per l'osservazione con microscopio a fluorescenza "Axiolab Zeiss" (Oberkochen, D) interfacciato ad una "Coolsnap CCD camera" (Roper Scient., Princeton, NJ, USA).

3.5.3.4 Estrazione dell'RNA totale dalle cellule trasfettate ed RT-PCR ("Reverse transcription"-PCR).

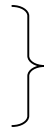
L'RNA totale è stato estratto dalle cellule a 48 ore dalla trasfezione utilizzando strumenti appositamente trattati, con il reagente "Extract All Buffer" (Eurobio) seguendo le indicazioni della casa produttrice.

L'estrazione è stata verificata separando l'RNA su gel di agarosio all'1% in TBE 0.5% in "denaturation buffer" + "loading buffer" per RNA.

1 μg di RNA estratto è stato quindi incubato con 1 unità di DNAsi "RNase-free" (Promega) in 10 μl di volume di reazione contenente tampone di reazione 1x, a temperatura ambiente per 30'. La reazione è stata bloccata con 2 μl di EDTA 10 mM.

La trascrizione inversa è stata eseguita su 1 μg di RNA trattato con DNAsi in un volume di reazione di 25 μl contenente:

- H₂O ad a volume
- 0.5 µl di oligo(dT) primer (0.5 µg/µl)



Tale miscela contenente l'RNA è stata denaturata a 70 °C per 5' e poi posta in ghiaccio e completata con:

- 1.25 mM di ciascun dNTP,
- 5 µl Reaction Buffer 10x
- 1 unità di Inibitori porcini di ribonucleasi
- 200 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Promega)



42°C per 1 ora

L'amplificazione mediante PCR è stata effettuata nelle condizioni e con i primers già descritti per le amplificazioni delle sequenze clonate in pcDNA 3.1(+), ed è stata verificata su gel di agarosio.

3.5.4 **Analisi dei mezzi condizionati per l'individuazione di prodotti di secrezione**

3.5.4.1 Ultracentrifugazione

Con riferimento al protocollo sperimentale di Savelyeva *et al.* (2001), relativo all'espressione in cellule COS-1 e alla successiva identificazione nel terreno di coltura della proteina di fusione scFv-CP, i mezzi condizionati derivanti dalle HEK trasfettate con i plasmidi ricombinanti in pcDNA3-PGIPss-E7GGG e pcDNA3-PGIPss-E7GGG-KDEL, pcDNA3-PGIPss-E7GGG-CP e pcDNA3-PGIPss-E7GGG-linker-CP, centrifugati a 1000 x g per 5', per eliminare eventuali cellule residue, sono stati sottoposti ad ultracentrifugazione a 135000 x g per 2 ore. I precipitati sono stati poi risospesi in PBS 1x con inibitori di proteasi (Roche) per l'effettuazione di un saggio ELISA o bolliti in presenza di "gel loading buffer" per proteine, per la separazione mediante SDS-PAGE e dell'analisi per "immunoblotting".

3.5.4.2 Immunoprecipitazione

Un volume di 15ml di mezzo condizionato prelevato dalle cellule trasfettate con i costrutti pcDNA3.0/PGIPss-E7GGG e pcDNA3.0/PGIPss-E7GGG-KDEL, pcDNA3.0/PGIPss-E7GGG-CP e pcDNA3.0/PGIPss-E7GGG-linker-CP, è stato immunoprecipitato nelle condizioni già descritte per i lisati (§ 3.5.3.2)

3.5.4.3 ELISA (“Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay”)

I mezzi condizionati tal quali ed i precipitati, derivanti dalla loro ultracentrifugazione e risospesi in PBS, sono stati sottoposti a saggio ELISA.

L’immobilizzazione degli antigeni di interesse sulle piastre da microtitolazione è stata ottenuta per incubazione, all’interno di ciascun pozzetto, di 100 µl di mezzo condizionato, per una notte a 4°C. Effettuati tre lavaggi in PBST e uno in PBS 1x, gli eccedenti siti di legame del pozzetto sono stati saturati mediante incubazione in MPBS 10%, mantenuto per 2 ore a 37°C. Ripetuti i lavaggi, sono stati aggiunti, in ciascun pozzetto, 100 µl di MPBS 2% contenente l’anti-corpo primario (α -E7 o α -PVX, entrambi diluiti 1:1000), mantenuto a contatto con l’antigene per 2 ore a 37°C. Dopo un’altra serie di lavaggi, si è proceduto all’incubazione con l’anticorpo secondario (“anti-mouse” o “anti-rabbit” coniugati a perossidasi, diluiti rispettivamente 1:10000 e 1: 5000 in MPBS 2%), per un’ora a 37 °C. La reazione colorimetrica è stata indotta aggiungendo, in ciascun pozzetto, 100 µl di soluzione di sviluppo contenente, in rapporto 1:1, H₂O₂ e il substrato ABTS [acido 2’,2’-azino bis-(3-etilbenzotiazolin) solfonico] della perossidasi.

3.6 VACCINAZIONI TERAPEUTICHE A DNA IN MODELLO PRE-CLINICO

3.6.1 Preparazione del DNA plasmidico per le immunizzazioni

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

I batteri trasformati sono stati coltivati in terreno liquido tipo “terrific broth”, addizionato con ampicillina 50 µg/ml , per 24 ore a 37 °C in agitazione (250 rpm). Le colture sono state centrifugate a 2500 rpm per 30’ a 4 °C ed il sedimento batterico è stato risospeso in 100 ml di tampone T.N.E. (Tris-HCl 10 mM + NaCl 100 mM + EDTA 1 mM pH 8.0) e ricentrifugato a 12000 rpm per 10 min a 4 °C. Il pellet è stato quindi risospeso in 20 ml di tampone di lisi (50 mM glucosio; 25 mM Tris-Cl pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8.0) + lisozima (10 mg/ml), sono stati poi aggiunti NaOH 0.2 N e SDS 1% e successivamente acetato di potassio e acido acetico glaciale freddi (5 M potassio acetato 60 ml, acido acetico glaciale 11.5 ml, H₂O 28.5 ml). Si è proceduto quindi, ad una nuova centrifugazione a 12000 rpm per 20’ a 4°C. Il sovrinatante è stato filtrato attraverso garze sterili, sono stati poi aggiunti 0.6 volumi di isopropanolo. Dopo un’incubazione di 15’ si è effettuata una nuova centrifugazione, analoga alla precedente. Il pellet è stato lavato con etanolo al 70% e centrifugato come sopra, quindi lasciato asciugare e risospeso in 6 ml di tampone T.E. (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH

8.0). E' stato poi aggiunto 1g/ml di CsCl + 0.5 ml di Bromuro di etidio 10 mg/ml ed è stata effettuata una centrifugazione per 5' a 8000 x g a temperatura ambiente. Il supernatante è stato trasferito in una provetta per ultracentrifuga e si è effettuata una ultracentrifugazione a 600000 rpm per 18-20 ore. E' stata poi raccolta la banda del gradiente con una siringa ed il DNA è stato lavato più volte con butanolo e quindi dializzato contro T.E. per 12 ore. Il dializzato è stato poi incubato a -20°C per 12 ore in 1/10 di volume di sodio acetato 3 M e 2,5 volumi di etanolo al 100%. E' seguita centrifugazione a 12000 rpm a 4°C. Il pellet è stato lavato con etanolo al 70%, fatto asciugare e risospeso in H₂O. La concentrazione del DNA ottenuto è stata misurata spettrofotometricamente.

3.6.2 Cellule tumorali murine TC-1

Le cellule tumorali TC-1, HPV16 positive, (donate da Robert Tindle, Sir Albert Sakzewski Virus Research Center, Royal Children's Hospital, Brisbane, Queensland, Australia) erano state ottenute mediante co-trasformazione di cellule epiteliali primarie di polmone di topi C57BL/6 con le proteine oncogene E6 e E7 dell'HPV16 e l'oncogene *ras* attivato (Lin *et al* 1996). La linea cellulare è stata coltivata in RPMI con l'aggiunta di L-glutamina 2 mM, sodio piruvato 1 mM, 10 U/ml di penicillina, 10 µg/ml di streptomina, 10% di siero bovino fetale e geneticina 400 µg/ml (GIBCO BRL).

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

3.6.3 Scheda di vaccinazione terapeutica

Sono stati utilizzati topi di ceppo C57BL/6, di sesso femminile, allevati all'interno del Centro Ricerche Sperimentali Regina Elena, di un'età compresa tra le 6 e le 8 settimane, con un peso variabile da 20 a 25 g, nutriti con mangimi controllati.

Dopo circa 8-10 giorni di permanenza nella gabbia sperimentale, i topi sono stati inoculati per via sottocutanea con una dose tumorigenica di cellule TC1 (5×10^3 in 200 µl di soluzione fisiologica) sulla coscia. Tre giorni dopo l'inoculo tumorale sono stati iniettati i vaccini a DNA, mediante iniezione intramuscolare (100 µg di DNA plasmidico/topo in un volume di 100 µl; i controlli sono stati allestiti vaccinando i topi con 100 µl di soluzione fisiologica). L'immunizzazione è stata ripetuta, con le stesse modalità, a distanza di una settimana dal primo inoculo. Gli animali sono stati esaminati due volte la settimana per l'eventuale

valutazione di neoformazioni di origine neoplastica. Dopo circa 50 giorni gli animali sono stati anestetizzati per effettuare un prelievo di sangue e quindi sacrificati mediante dislocazione cervicale per il prelievo della milza.

3.7 VALUTAZIONE DELLA SELEZIONE DI CLONI LINFOCITARI SECERNENTI IFN- γ

3.7.1 Estrazione degli splenociti

Le milze prelevate dai topi utilizzati negli esperimenti, sono state sminuzzate in RPMI mediante un setaccio e un pestello, quindi centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso in ACK lysing buffer (NH₄CL 0.15 M, KHCO₃ 1 mM, Na₂ EDTA 0.1 mM , pH 7.2), 5 ml/milza, e quindi centrifugato come sopra, le cellule sono state quindi risospese in RPMI/siero fetale bovino e contate nella camera di Thoma.

3.7.2 ELISPOT

L'induzione di linfociti T citotossici determinata dall'immunizzazione, ed in particolare il numero di linfociti splenici produttori IFN γ in risposta all'antigene specifico, è stata valutata con la tecnica dell'ELISPOT. 2×10^5 splenociti isolati da ciascun gruppo di animali vaccinati con i differenti costrutti ed interleuchina 2 (50 unità/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in 100 μ l di terreno RPMI + 10% di siero fetale bovino (FBS) (GIBCO BRL), sono stati incubati in una piastra da microtitolazione da 96 pozzetti (Millipore, Bedford, MA, USA). Tale piastra era stata precedentemente incubata per 24 ore a 4 °C con un anticorpo di ratto anti-IFN- γ di topo (clone R4-6A2, 8 μ g/ml; BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA, USA) in un volume totale di 100 μ l di D-PBS (Dulbecco-Phosphate Buffered Saline, GIBCO BRL) a pH 7.2/pozzetto. I campioni sono stati incubati a 37°C per 24-48 ore in presenza di 10 μ g/ml dell'epitopo CTL E7-specifico H-2D^b (aa 49-57, RAHYNIVTF) (Feltkamp *et al.*, 1993) contenente un epitopo di MHC di classe I per il rilevamento dei linfociti CD4⁺ e CD8⁺, per indurre il rilascio di IFN γ da parte delle cellule attivate in maniera specifica. Successivamente, le piastre sono state sottoposte a lavaggi in PBST ed incubate O.N. a 4 °C con un anticorpo biotinilato anti-IFN- γ (clone XMG1.2, 2 μ g/ml; BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA, USA) in 75 μ l di PBST contenente 0.1 mg/ml ovoalbumina.

Dopo un'altra serie di lavaggi, è stata aggiunta avidina coniugata a perossidasi di rafano (2.5 μ g/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e gli "spots" sono stati sviluppati aggiungendo 3.3'-diaminobenzidine/peroxidase substrate (Sigma Fast; Sigma-Aldrich St.

Louis, Missouri, USA). Il numero degli aloni di colorazione è stato contato mediante osservazione diretta a basso ingrandimento.

3.8 RIVELAZIONE DEGLI ANTICORPI NEI SIERI DEGLI ANIMALI IMMUNIZZATI MEDIANTE ELISA

Gli anticorpi circolanti indotti nel siero degli animali dalle vaccinazioni sono stati quantificati mediante saggio ELISA. In ogni pozzetto di una piastra a 96 pozzetti (Maxisorp Nunc-immunoplate), sono stati distribuiti 100 µl di PBS contenenti 5 µg/ml della proteina ricombinante His₆-E7 prodotta in *E. coli*, ed incubati per 24 ore a 4 °C per permettere l'adsorbimento. Dopo 3 lavaggi con PBST ed 1 con PBS, la plastica è stata saturata con 150 µl/pozzetto di MPBS 5% per 2 a 37 °C. Dopo ulteriori lavaggi, sono state aggiunte diluizioni 1:50 ed 1:100 del siero degli animali in MPBS 2%. Dopo un'incubazione di 2 ore a 37°C e una nuova serie di lavaggi, si è proceduto con la rivelazione con l'anticorpo secondario "anti-mouse" coniugato a perossidasi, come già descritto.

B) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO VEGETALE BASATO SULLA PROTEINA E7 ESPRESSA IN *Nicotiana benthamiana* MEDIANTE PVX

3.9 PREPARAZIONE DEI VETTORI PER L'ESPRESSIONE TRANSIENTE MEDIATA DA PVX DEL GENE E7 DI HPV-16 IN *Nicotiana benthamiana*

3.9.1 Costrutto secretorio pPVX-PGIPss-E7

La sequenza segnale della proteina inibente la poligalatturonasi di *Phaseolus vulgaris* (PGIPss), MTQFNIPVTMSSSLIILVILVSLRTALS (Toubart *et al.*, 1992) è stata fusa all'estremità 5' del gene E7 mediante SOE-PCR utilizzando l'enzima *Pfu* DNA polimerasi.

Il template utilizzato per l'amplificazione della sequenza PGIPss è un plasmide derivato dal vettore pPVX2C2S contenente la sequenza PGIPss fusa al 5' del gene codificante per l'anticorpo scFvB9 (*Figura 17*) (Franconi *et al.*, 1999).

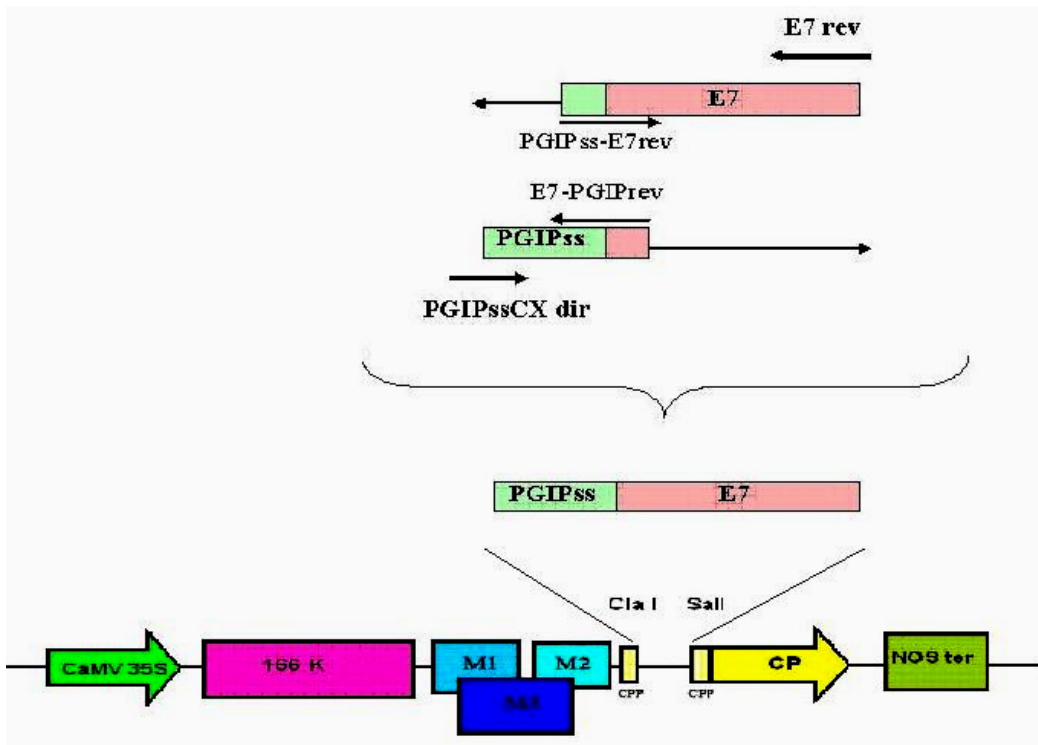


Fig. 40: Amplificazione con gli opportuni oligonucleotidi delle sequenze PGIPss ed E7 in vista dell'assemblaggio per la generazione delle sequenze PGIPss-E7.

3.9.2 Costrutto pPVX-PGIPss-E7-KDEL

La sequenza di ritenzione nel Reticolo endoplasmatico KDEL è stata fusa all'estremità 3' del gene E7 attraverso l'impiego del primer inverso per l'amplificazione *KDEL-E7 for* a partire dal template pQE30-E7:

E7-KDEL for

5'-gACTT gTC gAC gCggCCgCTTA Tag CTC ATC TTTTggTTTCTAAgAACAgATgg-3'

Sall
STOP
KDEL
gene E7GGG

Tale primer è stato già utilizzato per l'inserimento della stessa sequenza a valle del gene E7 per la realizzazione del costrutto pcDNA3-PGIPss-E7GGG esso infatti è bifunzionale, essendo stato progettato con ambo i siti di clonaggio *NotI* e *Sall*.

Con l'impiego del primer *PGIPssE7 dir* già descritto, invece, sono stati aggiunti al gene E7 i nucleotidi a valle della sequenza PGIPss necessari per l'assemblaggio con quest'ultima.

Il template ed i primer utilizzati per l'amplificazione della sequenza PGIPss ai fini dell'assemblaggio con il gene E7 provvisto di sequenza KDEL, sono gli stessi già descritti per la realizzazione del costrutto pPVX-PGIPss-E7 (Fig. 41)

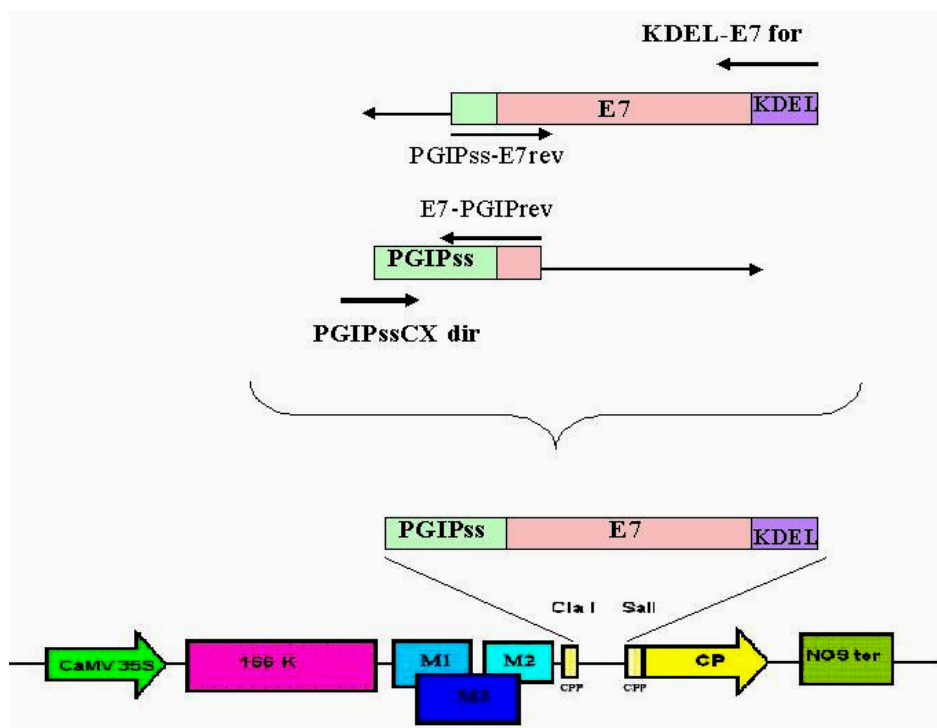


Fig. 41: Amplificazione con gli opportuni oligonucleotidi delle sequenze PGIPss ed E7 in vista dell'assemblaggio per la generazione delle sequenze PGIPss-E7-KDEL

3.9.3 Costrutti pPVX-His₆E7 e pPVX- His₆E7-KDEL

E' stato realizzato un costrutto per l'espressione in *Nicotiana benthamiana* della proteina E7 provvista di un "tag" di poli-istidine all'estremità N-terminale utile alla purificazione mediante cromatografia per affinità (costrutto pPVX-His₆E7) con o senza la sequenza KDEL all'estremità C-terminale (costrutto pPVX-His₆E7-KDEL). In ambo i casi, il gene E7 è stato amplificato a partire dal template pQE30-E7 con il primer diretto *pQE30 CH His back*:

5'-ggCC ATC gAT Aag CTT ATC ATg AgA ggA TCg CAT CAC CAT CA -3'



I primer inversi utilizzati sono stati invece, rispettivamente, *E7 rev* e *KDEL-E7 for*, già descritti.

3.9.4 Costrutto pPVX-E7GGG

E' stata prodotta anche una versione mutata del costrutto pPVX-E7, che era stato già ottenuto, amplificando il gene E7GGG dal template pQE30-E7GGG con i primer *E7CX dir* ed *E7 rev* ed effettuando il clonaggio nel vettore pPVX 201 tra i siti *ClaI* e *Sall*, per ottenere un vaccino

più accettabile riguardo alle questioni di sicurezza nell'uso di una oncoproteina non modificata.

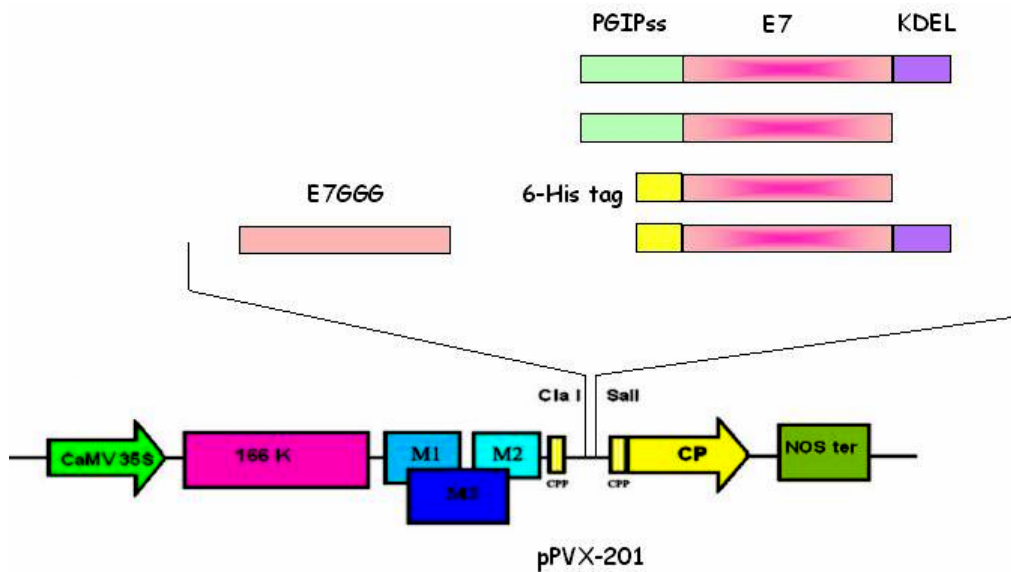


Fig. 42: Rappresentazione schematica dei costrutti ottenuti in pPVX201.

Per tutte le procedure relative all'infezione delle piante di *Nicotiana benthamiana*, alla preparazione degli estratti crudi, all'analisi di questi in SDS-PAGE, "immunoblotting" ed ELISA, si rimanda ai paragrafi successivi, in cui esse sono state descritte in maniera specifica per il costrutto secretorio pPVX-PGIP_{ss}-E7.

3.10 INFEZIONE, PREPARAZIONE ED ANALISI DEGLI ESTRATTI CRUDI DALLE PIANTE DI *Nicotiana benthamiana*

Le preparazioni di DNA plasmidico sono state realizzate utilizzando il Nucleobond PC 500 kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Due foglie di *N. benthamiana*, allo stadio di 4 foglie, cresciute in una serra a contenimento (livello di biosicurezza 2) sono state inoculate mediante abrasione meccanica con 10 µg di plasmide pPVX-PGIP_{ss}-E7 diluito in H₂O. Il plasmide pPVX-E7, contenente la versione citoplasmatica del gene E7 ottenuta in precedenza (Franconi *et al.*, 2002), ed il plasmide pPVX-wt scarico, sono stati utilizzati come controlli.

All'insorgenza dei sintomi dell'infezione, sia le foglie inoculate sia quelle sistemiche sono state collezionate e conservate a -80°C. Parte del materiale vegetale è stato liofilizzato

mediante “freeze-drying” (Freeze-dryer Modulyo, Boc Edwards SpA, Milan, Italy) ed il liofilizzato è stato conservato a temperatura ambiente o a 4 °C.

Le foglie infette congelate o liofilizzate, immerse in azoto liquido in un mortaio, sono state triturate finemente con un pestello, risospese in PBS 1x in presenza di inibitori di proteasi (Roche) in un rapporto peso/volume pari a 1/3 (1 ml/0.3 g di foglia). Gli omogenati di tessuto sono stati quindi centrifugati a 12000 x g, per 10 minuti a 4°C, trasferiti in un tubo pulito e mantenuti in ghiaccio fino all’uso.

3.10.1 Separazione delle proteine solubili totali ed “immunoblotting” degli estratti crudi di *N. benthamiana*

Il contenuto in proteine solubili totali (TSP) degli estratti crudi così ottenuti è stato determinato mediante saggio di Bradford (BioRad, Hercules, CA, USA) (2 µl di estratto sono stati aggiunti ad una miscela composta da 800 µl di H₂Odd e 200 µl di reagente) utilizzando albumina sierica bovina come standard.

20 µg di TSP sono stati separati mediante SDS-PAGE al 12% e trasferiti su membrana PVDF (Immobilon-P membrane - Millipore, Bedford, Ma, USA) e bloccate O.N. con MPBS 5%. La membrana è stata quindi incubata con anticorpo pAb α-His₆-E7 ricombinante di *E. coli* 1:1000 e si è poi proceduto, come già descritto nelle procedure di rivelazione della proteina E7 mediante “immunoblotting”.

3.10.2 Valutazione della reattività in ELISA della proteina E7 derivata da pianta

Gli estratti totali derivanti dalle foglie infettate con il plasmide pPVX-PGIPss-E7 sono stati analizzati per la presenza e la reattività della proteina E7 mediante ELISA. Piastre di polistirene sono state incubate O.N. a 4 °C con 100 µl di estratto/pozzetto, quindi con anticorpo pAb α-His₆-E7 ricombinante di *E. coli* 1:1000 e, successivamente, con l’anticorpo di capra anti IgG di topo coniugato con perossidasi, diluito 1:10000. Le piastre sono state, quindi, incubate con substrato ABTS (2,2-azino-bis-benzothiazoline-6-sulphonic acid), e l’assorbanza è stata misurata 405 nm in lettore per piastre ELISA.

Il contenuto di proteina E7 negli estratti è stato stimato mediante “triple antibody sandwich” ELISA (TAS ELISA). L’estratto è stato aggiunto a piastre da microtitolazione incubate O.N. con anticorpo policlonale di coniglio contro E7 (Di Lonardo *et al.*, 1998) e quantità note di proteina His₆-E7 ricombinante purificata da *E. coli* (0.25-50 ng), diluita in estratti di piante di *Nicotiana benthamiana* non infette, sono state usate come standard. Si è poi proceduto come già descritto per le procedure di ELISA.

3.11 ESTRAZIONE DEI FLUIDI INTERCELLULARI

I fluidi intercellulari (IF) sono stati estratti dalle foglie sistemiche di piante di *N. benthamiana* con i sintomi dell'infezione virale ed analizzati mediante immunoblotting ed ELISA. Le foglie sub apicali (circa 2 g) sono state tagliate in strisce larghe 1 cm, lavate in acqua per rimuovere contaminazioni intracellulari dovute al taglio, ed infiltrate sotto vuoto con PBS 1x freddo contenente inibitori di proteasi. Le foglie infiltrate sono state rapidamente asciugate su Kleenex, poste in una siringa e centrifugate per 10 minuti a 1000 x g per l'estrazione dei IF. Tale metodica di solito produce una frazione con una contaminazione da proteine citoplasmatiche minima come verificato con saggio di attività della glucosio-6-fosfato deidrogenasi (De Wilde *et al.*, 1996). Dieci microlitri di IF sono stati separati mediante SDS/PAGE ed analizzati mediante "immunoblotting" secondo la procedura già descritta.

3.12 IMMUNIZZAZIONE IN MODELLO PRE-CLINICO CON ESTRATTI DI PIANTA E SFIDA CON CELLULE TUMORALI

Gruppi di 8 topi femmine C57BL/6 (Charles River, Como, Italy) sono stati vaccinati per via sottocutanea (s.c.) il giorno 0, 15, 30, 45, e 60 con 500 µl /topo delle seguenti preparazioni:

- Nb-PVX-PGIPss-E7 (estratto crudo di foglie di *N. benthamiana* infettate con il plasmide pPVX-PGIPss-E7 contenenti approssimativamente 2.5 µg di proteina E7);
- Nb-PVX-E7 (estratto crudo di foglie di *N. benthamiana* infettate con il plasmide pPVX-E7 contenenti approssimativamente 0.5 µg di proteina E7);
- Nb-PVX-wt (estratto di foglie di *N. benthamiana* infettate con il plasmide pPVX-"wild type")
- His-E7+QuilA (sospensione costituita da 10 µg/topo di proteina His-E7 purificata e dall'adiuvante QuilA, una saponina purificata dalla pianta *Quillaja saponaria* in grado di indurre risposte immunitarie mediate ed umorali).

A due settimane dall'ultima vaccinazione, i vari gruppi di topi sono stati sfidati s.c. con una dose pari a 5×10^5 cellule C3 (cellule tumorali singeniche esprimenti il genoma di HPV16 - S. Hallez, Brussels, Belgium).

Un gruppo di topi non vaccinati hanno ricevuto lo stesso inoculo di cellule C3 come controllo. La crescita tumorale è stata valutata all'atto del sacrificio degli animali, misurando il peso della massa neoplastica sviluppata.

3.13 ELISPOT PER LA VALUTAZIONE DELLA SELEZIONE DI CLONI LINFOCITARI SECERNENTI IFN- γ

La presenza di precursori di cellule T HPV16 E7-specifici, è stata valutata mediante saggio ELISPOT come già descritto per le vaccinazioni a DNA. Gli splenociti sono stati isolati da ciascun gruppo di animali vaccinati con i differenti estratti vegetali al 14° giorno dall'ultima vaccinazione.

C) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO VEGETALE BASATO SULLA FUSIONE E7-LICHENASI PURIFICATA O CONTENUTA IN ESTRATTI VEGETALI DI *Nicotiana benthamiana* DOPO AGROINFEZIONE.

3.14 PREPARAZIONE DEI PLASMIDI RICOMBINANTI BASATI SU **PBID4**

3.14.1 Amplificazione delle sequenze E7 ed E7GGG

La sequenza codificante per la proteina E7 di HPV16 ed il gene mutato E7GGG sono stati fusi alla regione del “loop” (tra i siti BgIII e HindIII) del gene lichenasi clonato nel vettore pET-PRACS-Lic-KDEL e pET-PRACS-Lic-VAC.

A tale scopo essi sono stati amplificati con opportuni oligonucleotidi dai plasmidi pQE30-E7 e pQE30-E7GGG mediante PCR effettuata con Platinum PCR Supermix (Invitrogen). Le miscele di PCR sono state così preparate.

- 45 μ l Platinum PCR Supermix 1x [22 U/ml *Taq* DNA polimerasi anticorpo Platinum® *Taq*
22 mM Tris-HCl (pH 8.4)
55 mM KCl
1.65 mM MgCl₂
220 μ M dGTP
220 μ M dATP
220 μ M dTTP
220 μ M dCTP]
- 10 pmoli di primer diretto,
- 10 pmoli di primer inverso,
- 100 ng di DNA template,
- H₂O sterile a volume (50 μ l).

La miscela è stata incubata in termociclatore nelle condizioni già descritte (§ 3.4.1).

Per l'amplificazione delle sequenze sono stati usati il primer diretto *E7NotBgl dir*, fiancheggiato dal sito di restrizione per le endonucleasi *NotI* e *BglIII* ed il primer inverso *E7Hind rev*, fiancheggiato dal sito di restrizione *NotI* e contenente il codone di stop della traduzione (indicato in corsivo). Infatti, essendo disponibile per il clonaggio intermedio delle sequenze amplificate il vettore pBlueScript SK(-) (nel cui polylinker *NotI* è a monte rispetto a *HindIII*), ed essendo stato utilizzato l'enzima *Taq* DNA polimerasi per l'amplificazione, l'uso di tali siti nei corrispondenti oligonucleotidi facilita la selezione dei cloni trasformanti durante la verifica per sequenziamento. Il sito *BglIII*, mancando nel polylinker del vettore di clonaggio intermedio, è stato introdotto con il primer *E7NotBgl dir*.

E7NotBgl dir:



E7Hind rev:



3.14.2 Clonaggio delle sequenze nel vettore intermedio pBlueScriptSK(-)

Le sequenze E7 ed E7GGG, amplificate come descritto, sono state analizzate mediante elettroforesi su gel d'agarosio. Quindi il DNA è stato purificato direttamente dalla miscela di PCR mediante "Qiaquick PCR purification kit (QIAGEN)" al fine di effettuare i clonaggi.

Il DNA purificato è stato digerito con le endonucleasi *NotI* e *HindIII*, quindi purificato da gel dopo corsa elettroforetica utilizzando il "QIAGEN minelute extraction kit" (QIAGEN) secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. Le sequenze sono state inizialmente clonate nel vettore pBlueScriptSK(-) tra i siti *NotI* e *HindIII* per la selezione mediante alfa-complementazione dei cloni trasformanti di *Escherichia coli* e per la successiva verifica mediante digestione con le endonucleasi di restrizione delle sequenze clonate.

3.14.2.1 Reazione di ligazione e trasformazione delle cellule batteriche

La reazione di ligazione, catalizzata dalla DNA ligasi T4 (Invitrogen), derivante da *Escherichia coli*, è stata condotta mediante incubazione O.N. a 4°C della miscela di reazione così composta:

- 1 µl di tampone di reazione 10x [18.8 mM Tris-HCl (pH 8.3)
90.6 mM KCl
4.6 mM MgCl₂
3.8 mM DTT
0.15 mM NAD
10 mM (NH₄)₂SO₄]
- vettore plasmidico digerito
- inserto (in quantità conformi a un rapporto molare 1:1, o 1:2 con il vettore)
- 1 unità di DNA ligasi T4 [1 U/µl] (Roche)
- H₂Odd sterile, fino al volume di 10 µl.

Le cellule XL-1 blue di *E.coli* sono state trasformate con metodo chimico come già descritto e piastrate su terreno LB agarizzato, contenente 0,1 µg/ml di ampicillina, X-Gal (50 µl X-Gal 2% / piastra) ed IPTG (20 µl IPTG 10 mM/piastra).

3.14.2.2 Caratterizzazione dei ricombinanti batterici mediante digestione di miniprep

Dai cloni di *Escherichia coli*, trasformati con i plasmidi ricombinanti, si è proceduto ad estrazione del DNA plasmidico mediante minipreparazioni che sono state, poi, analizzate mediante digestione con gli enzimi *BglIII* e *HindIII* per la verifica della dimensione del frammento.

Le mini preparazioni di DNA plasmidico sono state effettuate centrifugando per 2' a 13000 rpm 2 ml di coltura O.N. cresciuta in brodo 2xYT. I pellet sono stati risospesi in 200 µl di soluzione 1 (50 mM glucosio; 25 mM Tris-Cl pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8.0), lisati in 400 µl di soluzione 2 preparata al momento (0.2 M NaOH; 1% SDS) e precipitati in 300 µl di soluzione 3 (5 M potassio acetato 60 ml, acido acetico glaciale 11.5 ml, H₂O 28.5 ml) ed incubati in ghiaccio per 15'. E' seguita una centrifugazione a 4 C per 5' a 13000 rpm . Il sovrantante e' stato trasferito in un tubo pulito e dopo incubazione a temperatura ambiente in isopropanolo, e' stato precipitato in etanolo al 70 % freddo, poi allontanato. I pellet sono stati risospesi in H₂Odd sterile ed utilizzati per le restrizioni *BglIII-HindIII* secondo le istruzioni della casa produttrice (Biolabs).

La qualità del DNA purificato è stata verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio, mentre la concentrazione è stata determinata spettrofotometricamente, mediante lettura dell'assorbanza a 260 nm.

I plasmidi intermedi ricombinanti sono stati sequenziati con i primers *E7NotBgl dir* ed *E7Hind rev*. Per l'analisi delle sequenze è stata effettuata con il programma Chromas 2.

3.14.3 Clonaggio delle sequenze E7 ed E7GGG nei vettori pET-PRACS-lic-KDEL e pET-PRACS-lic-VAC

Per i cloni batterici positivi alla digestione e contenenti le sequenze corrette, si è proceduto a Midi preparazione di DNA plasmidico con “Genopure Plasmid Midi kit” (Roche), secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice. Utilizzando tali preparazioni, le sequenze sono state excise dal vettore pBluescriptSK(-) intermedio con le endonucleasi di restrizione *BglII* e *HindIII*, e sottoposte a ligazione, nelle condizioni già descritte, nei vettori pET-PRACS-lic-KDEL e pET-PRACS-lic-VAC digeriti con gli stessi enzimi. Si è proceduto quindi alla trasformazione dei batteri XL-1 che sono stati piastrati su LB/Amp. I plasmidi ricombinanti ottenuti dai trasformanti (pET-PRACS-lic-E7-KDEL e pET-PRACS-lic-E7VAC, pET-PRACS-lic-E7GGG-KDEL e pET-PRACS-lic-E7GGG-VAC) verificati mediante digestione *BglII-HindIII*, sono stati poi impiegati per il clonaggio delle sequenze PRACS-lich-E7-KDEL e PRACS-lich-E7VAC, PRACS-lich-E7GGG-KDEL e PRACS-lich-E7GGG-VAC nel vettore pBID4 per la successiva agroinfezione (Fig. 43).

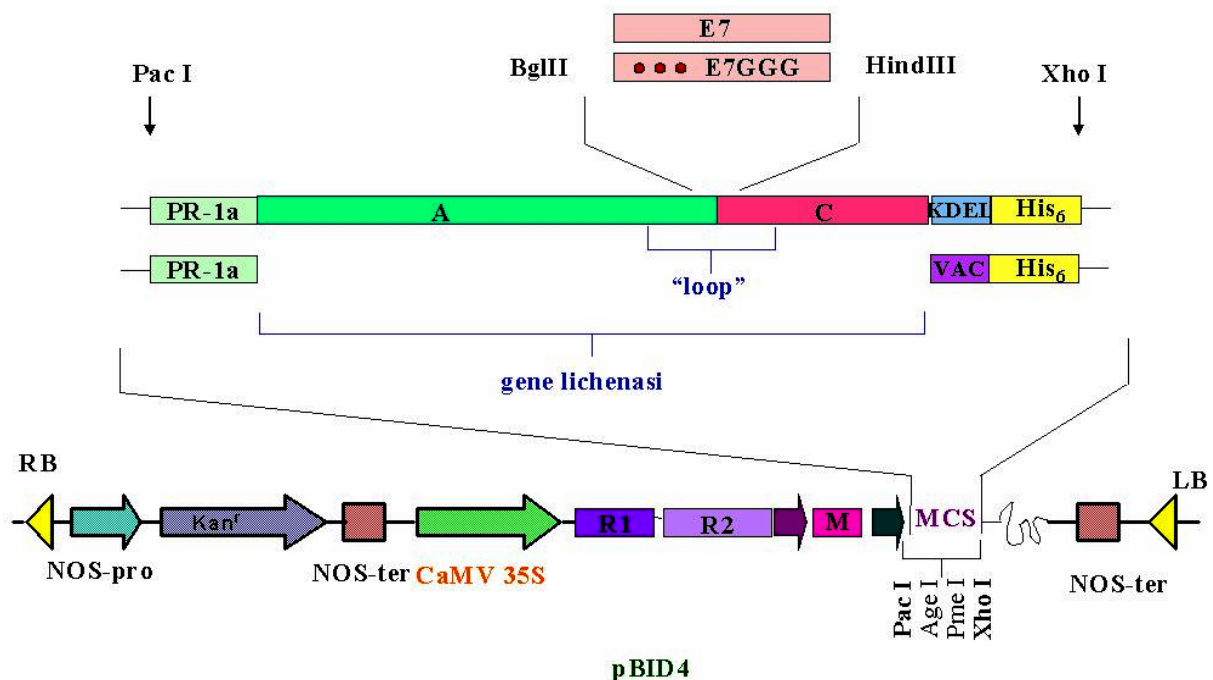


Fig. 43: Fusione dei geni E7 ed E7GGG nella sequenza codificante per il gene lichenasi tra i siti *BglII* ed *HindIII* e successivo clonaggio nel vettore pBID4 tra i siti *PacI* ed *XhoI*

3.14.4 Clonaggio delle sequenze PRACS-lic-E7-KDEL e PRACS-lic-E7-VAC, PRACS-lic-E7GGG-KDEL e PRACS-lic-E7GGG-VAC nel vettore pBID4

Le sequenze sono state excise dai vettori ricombinanti con le endonucleasi di restrizione *PacI* e *XhoI* (i cui siti si trovano rispettivamente a monte ed a valle del gene lichenasi) per il

recupero della intera sequenza di fusione per il successivo clonaggio nel vettore pBID4 digerito nelle stesse condizioni, mediante reazione di legazione per ottenere i plasmidi pBID4-Lic-E7-KDEL, pBID4-Lic-E7GGG-KDEL, pBID4-Lic-E7-VAC e pBID4-Lic-E7GGG-VAC (Figura 21). Si è proceduto quindi alla trasformazione dei batteri XL-1 che sono stati piastrati su LB/Kan e verificati mediante digestione.

3.15 ESPRESSIONE TRANSIENTE MEDIATA DA *Agrobacterium tumefaciens* ED *Agrobacterium rhizogenes* IN PIANTE DI *Nicotiana benthamiana*.

3.15.1 Preparazione delle cellule batteriche elettrocompetenti di *Agrobacterium tumefaciens* (ceppo GV3101) ed *Agrobacterium rhizogenes* (ceppo A4).

Sono stati inoculati 5 ml di coltura O.N. in brodo LB (*Agrobacterium rhizogenes*) o in brodo YEB (*Agrobacterium tumefaciens*) da una singola colonia fresca.

La coltura è stata diluita 1/500 e 1/1000 in LB ovvero YEB e lasciata crescere in agitazione a 28 °C (250 rpm) O.N., fino al raggiungimento della fase di crescita esponenziale.

Il giorno dopo le beute contenenti i batteri sono state poste in ghiaccio per 15' e le colture sono state centrifugate at 4000 g per 5' in tubi da 250 ml sterili.

Il sovrnatante è stato decantato, i pellet sono stati risospesi in 50 ml di H₂Odd sterile e centrifugati come sopra.

Di nuovo, il sovrnatante è stato decantato, i pellet sono stati risospesi in 10 ml di H₂Odd sterile e trasferiti in tubi da 50 ml e centrifugati come sopra.

Tale passaggio è stato ripetuto 6 volte utilizzando glicerolo freddo al 10% per i lavaggi.

I pellet sono stati quindi risospesi in 1 ml di glicerolo al 10%, e suddivisi in aliquote da 50 µl, che sono state immerse in azoto liquido e rapidamente conservate a -80°C.

3.15.2 Trasformazione di *Agrobacterium tumefaciens* ed *Agrobacterium rhizogenes* con i plasmidi pBID4-Lic-E7-KDEL, pBID4-Lic-E7GGG-KDEL, pBID4-Lic-E7-VAC o pBID4-Lic-E7GGG-VAC

Al fine di verificare l'espressione delle proteine di fusione nell'ambito dei costrutti realizzati sia per l'agroinfezione di piante di *Nicotiana benthamiana*, sia per la trasformazione stabile di tessuti da cui ottenere la generazione di radici, i costrutti ottenuti sono stati utilizzati per la trasformazione sia del ceppo GV 1031 di *Agrobacterium tumefaciens* sia del ceppo A4 di *Agrobacterium rhizogenes*.

Sono state scongelate su ghiaccio un numero di aliquote corrispondenti alle trasformazioni con i costrutti in pBID4 da effettuare. 1-2 μ l di DNA (1-100 ng) sono stati aggiunti a ciascuna aliquota di cellule, mescolati delicatamente alla sospensione cellulare ed aggiunti in cuvette da elettroporazione pre-raffreddate in ghiaccio in modo da coprire tutta la superficie del fondo ed evitando la formazione di bolle. Dopo aver rimosso l'umidità dalle pareti esterne delle cuvette, esse sono state poste nell'elettroporatore e trasformate per shock elettrico.

E' stato quindi immediatamente aggiunto 1ml di brodo LB o YEB, ed il campione è stato risospeso e recuperato dalla cuvetta in un tubo pulito.

I batteri sono stati posti a crescere in incubatore a 28°C in agitazione per circa 2-3 ore, e poi piastrati (100 μ l) su LB o YEB agar contenenti kanamicina 100 μ g/ml.

3.15.2.1 Minipreparazioni di DNA dai ceppi di *Agrobacterium* trasformati

Per ciascuna trasformazione in *Agrobacterium* sono state scelte tre colonie, che sono state inoculate in 2 ml di brodo LB o YEB contenente kanamicina 100 μ g/ml. Per l'estrazione del DNA plasmidico, i pellet sono stati risospesi in soluzione 1 + liozima ed incubati a temperatura ambiente per 15'. Le sospensioni cellulari sono state poi incubate in Proteinasi K per 15' a temperatura ambiente e si è proceduto come descritto per *E. coli* (§ 3.14.2.4). Le preparazioni di DNA sono state quindi utilizzate per trasformare nuovamente *E. coli* al fine di valutare l'effettiva stabilità del costrutto in pBID4.

3.15.3 **Agroinfiltrazione di piante di *Nicotiana benthamiana* con i ceppi di *Agrobacterium* trasformati** (Protocollo modificato da Kapila *et al.*, 1997)

Una singola colonia fresca è stata inoculata O.N. a 28°C in brodo LB (*Agrobacterium rhizogenes*) o in brodo YEB (*Agrobacterium tumefaciens*) contenenti kanamicina 100 μ g/ml (il volume di coltura "starter" dipende dal volume finale di coltura richiesta per l'infiltrazione).

La coltura O.N. è stata quindi diluita 1:100 in LB ovvero YEB (in beute di volume appropriato a garantire le migliori condizioni di crescita) a cui sono stati aggiunti:

Kanamicina 50mg/ml)

1M MES (pH 5.6) 1:100

1M MgSO₄ 1:500

20 μ M Acetosiringone (in 50%Dimetilformamide/50%dH₂O)

Le colture sono state poste a crescere a 28°C O.N. in agitazione (150-200 rpm) fino a OD₆₀₀ ~ 1.7 e quindi centrifugate a 3000 x g per 15' a 4°C. I pellet sono stati risospesi in MMA fino al

raggiungimento di una OD₆₀₀ pari a 2.4. Quindi la sospensione batterica è stata incubata a temperatura ambiente in acetosiringone 200 µM per 1-3 ore prima dell'infiltrazione manuale o sottovuoto di foglie intatte in *Nicotiana benthamiana*.

3.15.3.1 Infiltrazione sotto vuoto di piante di *Nicotiana benthamiana* con *Agrobacterium*

Piante di *Nicotiana benthamiana* sono state capovolte ed immerse in un "beaker" contenente la sospensione di *Agrobacterium* posto all'interno di un essiccatore.

E' stata quindi applicata una pressione negativa pari a 0.2 mbar per circa un minuto (in funzione delle dimensioni delle piante) per 3 volte.

3.15.3.2 Infiltrazione manuale di piante di *Nicotiana benthamiana* con *Agrobacterium*

Alternativamente, la pagina inferiore delle foglie (3 foglie/pianta all'atto delle analisi preliminari, possibilmente tutte le foglie all'atto dell'infiltrazione effettuata al fine della purificazione delle proteine di fusione) è stata infiltrata manualmente mediante l'uso di una siringa con circa 1 ml di sospensione batterica procurando di infiltrare l'intera superficie fogliare.

3.16 ANALISI DEGLI ESTRATTI DI FOGLIE INFILTRATE DI *Nicotiana benthamiana*

3.16.1 **Preparazione degli estratti di foglia ed analisi mediante SDS-PAGE ed "immunoblotting"**

Alla comparsa dei sintomi dell'infezione (dopo circa 4 giorni) e sino a 7 giorni dall'infiltrazione, 3 campioni casuali di foglie infiltrate da ciascuna pianta sono stati collezionati ed analizzati subito dopo il campionamento per la valutazione dell'espressione.

Il materiale è stato anche collezionato e conservato a -80 °C per la successiva preparazione di estratti per le immunizzazioni in modello pre-clinico.

I campioni freschi provenienti dalle foglie infiltrate sono stati risospesi in PBS 1x in presenza di inibitori di proteasi (Roche) in un rapporto peso/volume pari a 1/3 (1 ml/0.3 g di foglia) e tritati finemente con l'aiuto di un pestello in plastica. Gli omogenati di tessuto sono stati quindi bolliti per 5' in "gel loading buffer" per proteine e quindi centrifugati a 12000 rpm per 5 minuti a 4°C, ed i sovranatanti trasferiti in un tubo pulito, pronti ad essere separati mediante SDS-PAGE al 12% e trasferiti su membrana PVDF (Immobilon-P membrane - Millipore, Bedford, Ma, USA). Le membrane sono state sottoposte a "blocking" O.N. a 4°C (oppure per

1 ora a temperatura ambiente) con “blocking solution” (I-block reagent, Tropix – Bedford, MA) 0.5% w/v in PBS 1x + Tween 20 0.1% v/v. Le membrane sono state quindi incubate con anticorpo policlonale di topo contro la proteina His₆-E7 ricombinante (1:1000), oppure con anticorpo policlonale di coniglio contro la proteina lichenasi ricombinante (1:5000) diluiti in “blocking solution”. Dopo 3 lavaggi in PBST, le membrane sono state incubate con anticorpo secondario policlonale, “anti-rabbit” (ovvero “anti-mouse”) perossidasi (1:10000) in “blocking solution”.

Si è poi proceduto, alla rivelazione della chemiluminescenza mediante Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (circa 5 ml/membrana) acquisendo l'immagine mediante “software” (Gene Snap, Syngene).

3.16.2 Rivelazione dell'attività lichenasica nelle fusioni mediante Zimogramma

Lo zimogramma è un metodo elettroforetico per la valutazione di attività proteolitiche. Tale metodica utilizza gel di separazione di poliacrilammide in presenza di SDS impregnati con il substrato di degradazione della proteasi di interesse che viene risolta durante la corsa elettroforetica. La successiva colorazione del gel con pigmenti ad affinità per le proteine rivela i siti di proteolisi sul gel in forma di bande chiare su fondo colorato. In un certo intervallo di valori, l'intensità delle bande può essere posta in relazione lineare con la quantità di proteasi caricata su gel. La denaturazione dei campioni relativi agli estratti delle piante infiltrate mediante bollitura in “gel loading buffer” e la corsa denaturante nel gel non inficiano il metodo. Le proteasi, infatti, hanno la proprietà di rinaturare e di esercitare la loro attività proteolitica dopo rimozione dell' SDS ed anche nella matrice del gel di poliacrilammide. Inoltre durante l'elettroforesi, gli inibitori di proteasi utilizzati per la preparazione del campione per evitare la degradazione della fusione in studio, si dissociano dalla proteasi stessa e non interferiscono con l'analisi dell'attività enzimatica. Tale metodo è estremamente sensibile (consentendo la rilevazione anche di 10 pg di proteasi).

Di conseguenza, parallelamente all' ”immunoblotting”, i campioni relativi agli estratti di pianta infiltrati sono stati analizzati per la rivelazione dell'espressione delle proteine di fusione attraverso il metodo dello zimogramma, mediante separazione su gel di poliacrilammide al 12% preparato sostituendo, nel gel di separazione, 1 ml di H₂O_{dd} del protocollo canonico con 1 ml di substrato per la lichenasi (lichenano 0.5% in H₂O_d) secondo la ricetta in *Tab. 6*.

Tab. 6

Gel di separazione		“Stacking” Gel	
<u>2 Gel</u>	(12%)	<u>2 Gel</u>	
3 ml	Acrilammide/bis-acrilammide 29:1 40%	0.5 ml	Acrilammide/bis-acrilammide 29:1 40%
2.5 ml	Resolving Buffer (Gibco)	4.5 ml	Stacking Buffer (Gibco)
3.4 ml	ddH ₂ O	50 µl	ammonio persolfato
1.0 ml	Lichenano in ddH ₂ O		
0.1 ml	ammonio persolfato		

Dopo la corsa elettroforetica, il gel è stato sottoposto a due lavaggi da 5' in ddH₂O, a due lavaggi da 5' in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 0.1% Triton X-100 ed è stato, quindi, posto in incubazione a 65°C per 1 ora con tampone di lavaggio fresco.

Successivamente, il gel è stato colorato con rosso Congo (0.5%) per 5' a temperatura ambiente ed in agitazione ed è stato poi sottoposto a tre lavaggi in ddH₂O. La colorazione è stata sviluppata a temperatura ambiente mediante aggiunta di 1M NaCl. Il contrasto della colorazione a livello delle bande di reazione è stato incrementato con 1M Tris-base.

3.17 PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE DI FUSIONE LIC-E7-KDEL E LIC-E7GGG-KDEL CON HIS₆-TAG TRAMITE CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ CON IONI METALLICI IMMOBILIZZATI

Le foglie infiltrate con *Agrobacterium tumefaciens* trasformato con i costrutti pBID4-Lic-E7-KDEL e pBID4-Lic-E7GGG-KDEL, appena campionate, sono state triturate finemente in omogenizzatore in presenza di 3 volumi (w/v) di tampone di estrazione con inibitori di proteasi “EDTA-free” (Roche). Dopo l’omogenizzazione, il campione è stato incubato in Triton X-100 1% su ruota per 30' a 4°C e poi centrifugato a 9000 x g per 10' a 4°C. Il sovrnatante è stato raccolto e posto in ghiaccio sino a completamento di una seconda estrazione effettuata sul pellet (ottenuto dopo la centrifugazione di cui sopra), che è stato risospeso in 1.5 volumi di tampone di estrazione con inibitori di proteasi in presenza di Triton X-100 1%, incubato e centrifugato come sopra. Il sovrnatante ottenuto è stato combinato al precedente ed è stato filtrato attraverso garza Miracloth in tubi oakridge per essere centrifugato a 20000 x g per 30' a 4°C. Il sovrnatante è stato quindi filtrato (0.45µm) e caricato su colonna di sefariosio-Ni-NTA (“Chelating Sepharose Fast Flow Column”, Amersham) in cui la resina sedimentata nella colonna era stata precedentemente attivata con

10 volumi di solfato di Nichel 0.1 M, sottoposta a lavaggio con H₂Odd degasata e poi equilibrata con 10 volumi di tampone di estrazione. Dopo incubazione con il l'estratto, la resina è stata sottoposta ad un lavaggio con 10 volumi di tampone di estrazione + 1% Triton X-100, con 10 volumi di tampone di estrazione tal quale, e con 10 volumi tampone di lavaggio. Sono quindi state effettuate eluizioni ripetute con 1 volume di tampone di eluizione. Si è proceduto alla raccolta delle frazioni fino a chè è stato possibile rilevare la presenza di proteine nell'eluato mediante saggio di Bradford (OD₅₉₅. = 0.2-0.6).

Le frazioni sono state riunite e dializzate dopo aggiunta di EDTA 20 mM, contro PBS 1x, O.N. a 4°C per eliminare l'imidazolo e gli altri sali, e da qui sono stati preparati i campioni per la verifica tramite SDS-PAGE ed "immunoblotting" e le aliquote da conservare a -80°C.

Tampone di estrazione Ni-NTA:	NaH ₂ PO ₄ 50 mM pH:7.5; NaCl 500 mM; Imidazolo 20 mM, pH: 7.5	} Degasate sotto vuoto per 10'
Tampone di lavaggio Ni-NTA:	NaH ₂ PO ₄ 50 mM pH:7.5; NaCl 500 mM; Imidazolo 40 mM, pH: 7.5	
Tampone di eluizione Ni-NTA:	NaH ₂ PO ₄ 50 mM pH:7.5; NaCl 500 mM; Imidazolo 500 mM, pH: 7.5	

3.18 PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE DI FUSIONE LIC-E7-KDEL E LIC-E7GGG-KDEL TRAMITE CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

Per purificare ulteriormente la preparazione relativa alle proteine E7-lich-KDEL ed E7GGG-lich-KDEL purificate su resina Ni-NTA, in vista della realizzazione di una formulazione vaccinale il più pura possibile, le frazioni raccolte dalla purificazione mediante cromatografia per affinità, sono state dializzate contro NaH₂PO₄ 10 mM, O.N., a 4°C. Il dializzato è stato quindi sottoposto a un ulteriore passaggio di purificazione mediante cromatografia a scambio ionico utilizzando la resina "Q Sepharose Fast Flow column" (Amersham) che è un forte scambiatore anionico il cui gruppo di scambio è costituito da un gruppo di ammine

quaternarie (-O-CH₂CHOHCH₂OCH₂CHOHCH₂N⁺(CH₃)₃). Le proteine con una prevalenza di cariche positive ai valori di pH utilizzati, saranno legate dalle cariche negative della resina. Per l'eluizione delle proteine dalla resina, viene utilizzato il principio del "salting out", per cui, la soluzione salina utilizzata compete con la proteina per il legame alle cariche negative della resina, cosicché è possibile eluire la proteina di interesse utilizzando un gradiente salino. La resina sedimentata nella colonna è stata sottoposta ad un lavaggio con 10 volumi di H₂Odd degasata, quindi con 10 volumi di NaH₂PO₄ 500 mM, e poi con 10 volumi NaH₂PO₄ 10 mM.. Successivamente è stato caricato il dializzato e si è poi proceduto ad un lavaggio con 10 volumi NaH₂PO₄ 10 mM. Sono quindi state effettuate eluizioni ripetute con 2 volumi di NaCl 100 mM, 2 volumi di NaCl 250 mM, 2 volumi di NaCl 500 mM e 2 volumi di NaCl 1 M in NaH₂PO₄ 10 mM. Le frazioni sono state poi analizzate separatamente in SDS-PAGE e colorazione con Blue di Coomassie.

3.18.1 **Analisi mediante SDS-PAGE ed "Immunoblotting" delle proteine di fusione purificate**

La verifica e la quantificazione della purificazione (sia mediante cromatografia per affinità che per cromatografia a scambio ionico) delle proteine di fusione Lic-E7-KDEL-His₆ e Lic-E7GGG-KDEL-His₆ è stata effettuata sottoponendo campioni relativi alle fasi di purificazione a corsa elettroforetica su SDS-PAGE e a colorazione del gel con Blu di Coomassie. Il gel è stato quindi decolorato e la quantificazione relativa alle frazioni purificate è stata effettuata densitometricamente mediante "software" Kodak 1D.

Le proteine purificate separate su SDS-PAGE sono, inoltre, state sottoposte a trasferimento elettrico su membrana PVDF e rivelate nelle modalità descritte in precedenza, sia con anticorpo primario policlonale anti-lichenasi, sia con anticorpo monoclonale di topo anti-His₆ (SIGMA). La quantificazione relativa alle frazioni purificate è stata effettuata densitometricamente mediante "software" (GeneTools, Syngene).

3.19 **IMMUNIZZAZIONE CON LE PROTEINE DI FUSIONE LIC-E7-KDEL E LIC-E7GGG-KDEL PURIFICATE DA *Nicotiana benthamiana* IN UN MODELLO PRE-CLINICO**

Fa seguito in *Tab. 7* lo schema di vaccinazione pre-clinica delle proteine di fusione Lic-E7-KDEL e Lic-E7GGG-KDEL purificate da *Nicotiana benthamiana*.

Group	Construct	Adjuvant	mice/group	DOSE	N. of immunizations
G1	E7 <i>E. coli</i>	NO	9	10 µg/200µl	4
G1A	E7 <i>E. coli</i>	YES	9	10 µg/200µl	4
G2	Plant purified Lich-E7-KDEL	NO	9	10 µg/200µl	4
G2A	Plant purified Lich-E7-KDEL	YES	9	10 µg/200µl	4
G3	Plant purified Lichenase	YES	8	10 µg/200µl	4
G4	E7GGG <i>E. coli</i>	NO	9	10 µg/200µl	4
G4A	E7GGG <i>E. coli</i>	YES	9	10 µg/200µl	4
G5	Plant purified Lich-E7GGG- KDEL	NO	9	10 µg/200µl	4
G5A	Plant purified Lich-E7GGG- KDEL	YES	9	10 µg/200µl	4

Tabella 7: *Protocollo di Immunizzazione con Antigeni Purificati da Pianta (iniziato il 23 gennaio 2006). QuilA (Adiuvante) (10 µg/Mice); Immunizzazione s.c. Topi C57BLACK/6 (Totale 80)*

D) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO VEGETALE BASATO SULLA FUSIONE E7-LICHENASI ESPRESSA IN RADICI DI *Nicotiana benthamiana* E *Petunia hybrida* MEDIANTE TRASFORMAZIONE STABILE

Per la realizzazione dei costrutti pBID4-Lic-E7-KDEL, pBID4-Lic-E7GGG-KDEL, pBID4-Lic-E7-VAC pBID4-Lic-E7GGG-VAC e la trasformazione del ceppo A4 di *Agrobacterium rhizogenes* si rimanda ai paragrafi 3.15 e 3.14.

3.19 TRASFORMAZIONE DI ESPIANTI FOGLIARI MEDIATA DA *Agrobacterium rhizogenes*

Espianti di *Petunia hybrida* e di *Nicotiana benthamiana* di circa 1 cm x 1 cm sono stati ottenuti, a partire da foglie sterilizzate in Ammonio cloruro 0.1% e sottoposte a sei lavaggi in H₂O sterile. Tali espianti sono stati trasformati con *Agrobacterium rhizogenes*, ceppo A4, contenente i costrutti pBID4-Lic-E7-KDEL e pBID4-Lic-E7GGG-KDEL. Gli espianti sono stati leggermente danneggiati effettuando delle incisioni sul lato abassiale della foglia, sono stati asciugati su carta da filtro sterile e posti in piastre MS agar/agarosio 0.35% in presenza di Acidonaftil acetico 1 mg/l e Benziladenina 0.2 mg/l (NNA, BA) per 4 giorni in camera di crescita (24 C, 16 ore di luce, 8 ore di buio). *Petunia*, infatti, necessita di un periodo di adattamento in piastra in presenza di ormoni prima della trasformazione con *Agrobacterium*.

Gli espianti di *Nicotiana benthamiana* sono stati ottenuti secondo le stesse modalità e sono stati direttamente utilizzati per la trasformazione con *Agrobacterium rhizogenes* così come gli espianti già coltivati di *Petunia* al termine del periodo di adattamento.

Gli espianti di ambo le specie sono stati trasferiti in piastre *petri* ed incubati per circa 2 minuti con una coltura O.N. di *Agrobacterium* con O.D._{600nm}=0.8-1, centrifugata a 3000 rpm per 10' a 4°C e poi risospesa in MMA sino ad una O.D._{600nm}=0.1 per *Petunia*, e ad una D.O._{600nm}=0.5 per *Nicotiana benthamiana* in presenza di acetosiringone 20 mM. Al termine dell'incubazione, gli espianti di *Nicotiana benthamiana* sono stati asciugati su carta da filtro sterile e trasferiti ad uno ad uno su piastre di co-coltura (MS, glucosio 1%, 0.8% agar, acetosiringone 20 mM). Le piastre sono quindi state sigillate con parafilm e tenute a temperatura ambiente per 2 giorni.

Gli espianti di *Petunia hybrida*, invece, dopo la trasformazione, sono stati ulteriormente danneggiati effettuando nuove incisioni sulla superficie fogliare, e sono stati co-coltivati su piastre MS, glucosio 0.1%, 0.7% agar/agarosio in presenza di NAA 1 mg/l e BA 0.2 mg/l per 2 giorni.

Al termine della co-coltura, gli espianti di ambo le specie, sono stati trasferiti su terreno solido MS senza ormoni in presenza di 500 mg/l di Cefotaxim (Cif) e 100 mg/l Timentin (Tim) e 25 mg/l kanamicina.

Tale passaggio è stato preceduto, per gli espianti di *Petunia hybrida*, da un lavaggio di 30' in agitazione con terreno liquido MS con 0.1% glucosio in presenza di 500 mg/l di Cef e 100 mg/l Tim.

Le piastre sono state sigillate con parafilm e poste in camera di crescita (24°C, 16 ore di luce, 8 ore di buio). La generazione delle radici aeree dagli espianti si realizza dopo circa 5-6 settimane.

4 RISULTATI

A) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO A DNA BASATO SU UNA VERSIONE NON ONCOGENA DEL GENE E7 DI HPV16 FUSA ALLA SEQUENZA CODIFICANTE PER LA CP DI PVX E/O ALLA SEQUENZA SEGNALE DELLA PGIP DI *Phaseolus vulgaris*

4.1 MUTAGENESI DEL GENE E7 NEL SITO DI LEGAME A pRb

Il gene E7 di HPV16, clonato nel vettore d'espressione procariotico pQE30 (pQE30-E7) è stato mutato nel sito di legame al pRb utilizzando il "Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene) ed opportuni oligonucleotidi recanti le mutazioni desiderate, come descritto nei Materiali e Metodi (§ 3.2).

Le reazioni di mutagenesi (amplificazioni su template pQE30-E7 utilizzando gli oligonucleotidi *E7GGG dir* ed *E7GGG rev*) sono state verificate su gel di agarosio (Fig. 44).

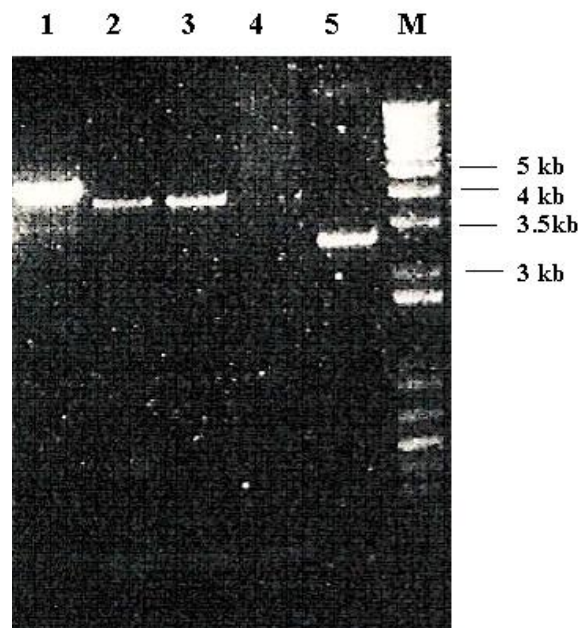


Fig.44: Verifica delle reazioni di mutagenesi

- 1) Reazione di mutagenesi su *pWhitescript 4.5kb (CTRL+)*
- 2) Reazione di Mutagenesi su *pQE30 (50 ng)*
- 3) Reazione di Mutagenesi su *pQE30 (100 ng)*
- 4) Reazione di mutagenesi senza template (*CTRL -*)
- 5) Plasmide *pQE30 (200 ng)*
- 6) Marcatore di peso molecolare

Il DNA ottenuto dopo l'amplificazione è stato digerito con l'endonucleasi di restrizione *DpnI* e con esso sono state trasformate cellule XL-1 blue supercompetenti. L'efficienza di mutagenesi calcolata secondo la formula:

$$\frac{\text{numero di colonie fenotipo blu}}{\text{numero totale di colonie}} \times 100\%$$

è stata pari a ~ 85% con un numero di colonie con fenotipo blu (trasformanti con plasmide pWhitescript mutagenizzato) pari a ~ 700.

L'efficienza di trasformazione effettuata con 10 pg di pUC calcolata:

$$\frac{\text{numero di colonie}}{10 \text{ pg pUC usato per la trasformazione}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{1 \text{ } \mu\text{g}} \times \frac{300 \text{ } \mu\text{l di cellule trasformate}}{\mu\text{l di cellule piastrate}}$$

è stata: pari a ~ 1.2 10¹⁰ (atteso: > 10⁸).

Con la reazione sono state introdotte tre mutazioni puntiformi (Asp₂₁>Gly, Cys₂₄>Gly, Glu₂₆>Gly) ottenendo il gene denominato 'E7GGG' la cui autenticità è stata confermata mediante sequenziamento (Fig. 45).

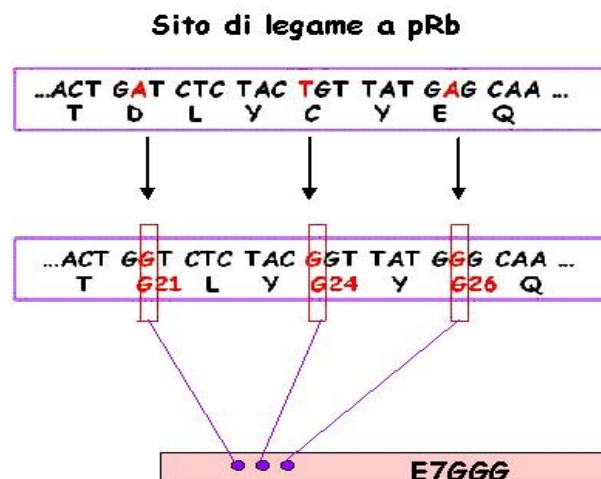


Fig. 45: Mutazioni introdotte nel gene E7 di HPV16.

4.2 ESPRESSIONE DELLA PROTEINA E7GGG IN *E. coli*.

4.2.1 Purificazione della proteina His₆-E7GGG in condizioni native tramite cromatografia per affinità con ioni metallici immobilizzati ed analisi mediante SDS-PAGE ed “immunoblotting”.

Utilizzando un protocollo già disponibile nel nostro laboratorio per la purificazione della proteina His₆-E7 di HPV16 mediante cromatografia per affinità in condizioni native, la proteina His₆-E7GGG è stata espressa in *E. coli* mediante il vettore pQE30, purificata ed analizzata in SDS-PAGE (Fig. 46). Dopo eluizione, le frazioni sono state riunite e dializzate, e si è proceduto alla quantificazione (Fig. 47).

Sia in SDS-PAGE che in “immunoblotting” la proteina His₆-E7GGG ha mostrato proprietà di migrazione leggermente differenti (maggiore mobilità elettroforetica, pM apparente ~17 kDa)

rispetto alla proteina E7 “wild type” (pM apparente ~21 kDa). Il cambiamento delle proprietà elettroforetiche della proteina è probabilmente dovuto alle tre sostituzioni amminoacidiche introdotte con la mutagenesi sito-specifica (Fig. 48) che hanno alterato le proprietà chimico-fisiche della proteina. Ricordiamo, infatti, che nonostante che il pM teorico di E7 sia di circa 11 kDa, essa migra come una proteina di 21 kDa, probabilmente a causa della sua carica negativa, concentrata prevalentemente a livello della regione N-terminale, ricca di aminoacidi acidi.

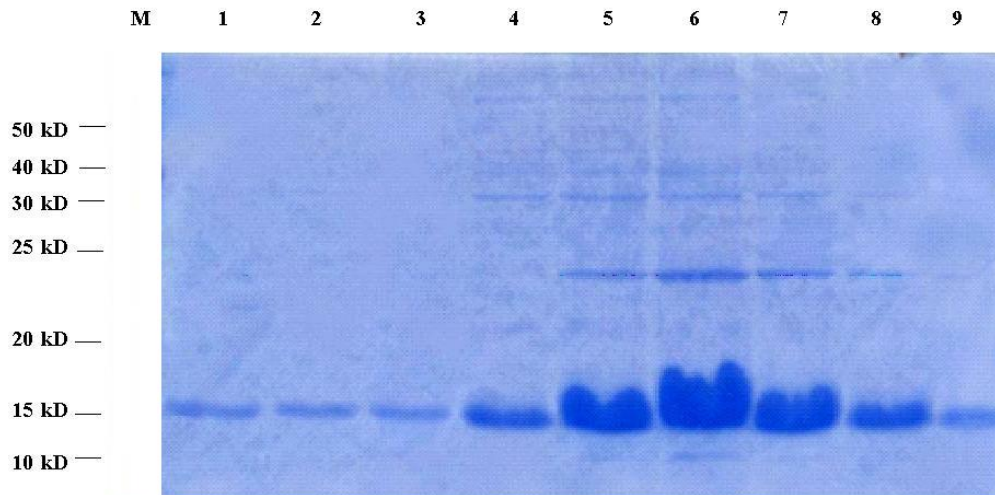


Fig. 46: SDS-PAGE delle frazioni di eluizione ottenute dalla purificazione della proteina His₆-E7GGG mediante cromatografia per affinità:

M) Marcatore di peso molecolare

1)- 9) frazioni di eluizione della proteina His₆-E7GGG

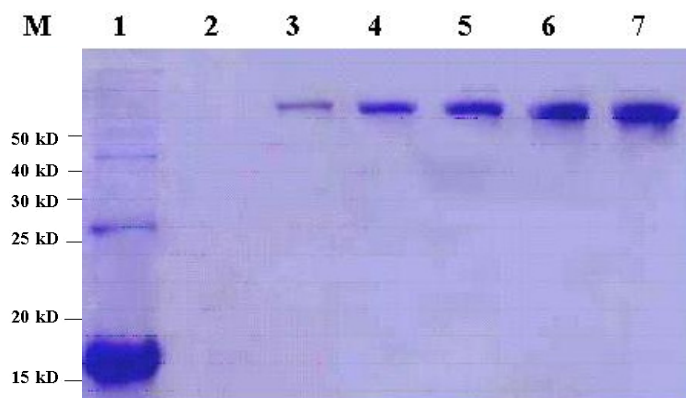


Fig. 47: SDS-PAGE per la quantificazione della proteina His₆-E7GGG dopo dialisi:

M) Marcatore di peso molecolare

1) proteina His₆-E7GGG (10 μl)

2) /

3) BSA 500ng

4) BSA 1 μg

5) BSA 2 μg

6) BSA 5 μg

7) BSA 10 μg

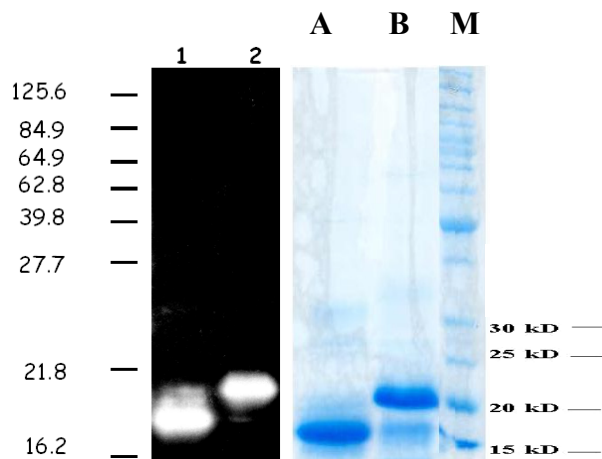


Fig. 48: Immunoblotting (anticorpo pAb α -E7) ed SDS-PAGE di confronto tra le proteine purificate His₆-E7 ed His₆-E7GGG:

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1) proteina His ₆ -E7GGG | A) proteina His ₆ -E7GGG |
| 2) proteina His ₆ -E7 | B) proteina His ₆ -E7 |
| | M) Marcatore di peso molecolare |

4.3 PREPARAZIONE DEI PLASMIDI RICOMBINANTI BASATI SU pcDNA3.1(+)

4.3.1 Realizzazione dei costrutti pcDNA3/E7GGG, pcDNA3/E7GGG-CP e pcDNA3/E7GGG-L-CP

4.3.1.1 Amplificazione della sequenza E7GGG per la realizzazione dei costrutti pcDNA3/E7GGG, pcDNA3/E7GGG-CP e pcDNA3/E7GGG-L-CP

Ai fini della realizzazione del costrutto pcDNA3/E7GGG, la sequenza codificante per la proteina E7GGG è stata amplificata mediante PCR dal plasmide pQE30-E7GGG utilizzando il primer diretto *E7HIII dir* ed il primer inverso *E7Not rev* secondo le modalità descritte. Dall'amplificazione è stato ottenuto il frammento atteso di 368 pb (Fig. 49).

Per ottenere, invece, la fusione alla sequenza codificante per la CP di PVX per la realizzazione dei costrutti pcDNA3-E7GGG-CP e pcDNA3-E7GGG-link-CP, il gene E7GGG è stato amplificato, rispettivamente, con i primer *E7 HIII dir* ed il primer inverso *CP-E7 rev* oppure con il primer inverso *CP-link-E7 rev*, generando la regione di omologia necessaria per l'assemblaggio con CP delle due sequenze di 368 e 371pb, rispettivamente (Fig. 49).

4.3.1.2 Amplificazione della sequenza CP per la realizzazione dei costrutti pcDNA3/E7GGG-CP e pcDNA3/E7GGG-L-CP

Secondo lo stesso principio, per l'amplificazione della sequenza relativa al gene CP a partire dal template pVX201 ai fini dell'assemblaggio con E7, è stato utilizzato il primer diretto *E7-CPdir* oppure *E7-link-CPdir*, ottenendo le sequenze di 601 e 598 pb, rispettivamente. La CP è stata anche amplificata per il clonaggio di per sé in pcDNA3.1(+) come controllo utilizzando i primer *CPHIII*dir e *CPNotrev* (Fig. 49).

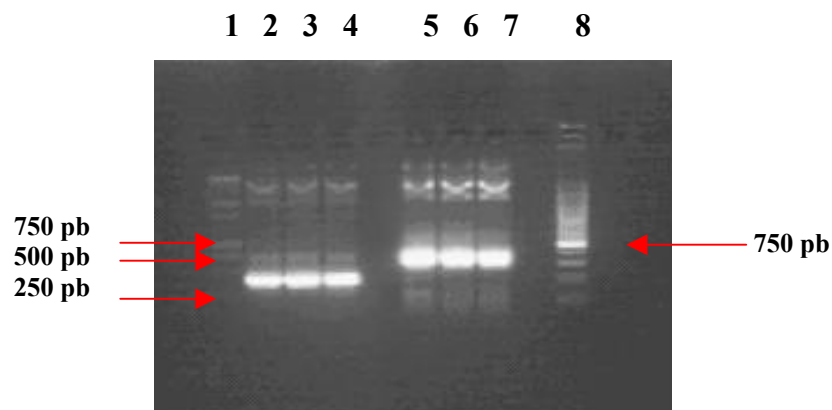


Fig. 49: PCR di amplificazione dei geni E7GGG e CP in vista delle fusioni

1, 8	<i>Marcatore di peso molecolare</i>	
2	<i>E7GGG (E7HIII dir/ E7Not rev)</i>	368 pb
3	<i>E7GGG (E7HIII dir/ CPE7/rev)</i>	371 pb
4	<i>E7GGG (E7HIII dir/ CP-link-E7/rev)</i>	371 bp
5	<i>CP (E7-CPdir/CPNotrev)</i>	675 bp
6	<i>CP (E7-link-CPdir/CPNotrev)</i>	678 bp
7	<i>CP (CPHIII</i> dir/CPNotrev)	676 bp

4.3.1.3 Assemblaggio per la realizzazione delle sequenze E7GGG-CP e E7GGG-link-CP.

Le bande corrispondenti ai prodotti di amplificazione attesi sono state recuperate e da esse il DNA è stato estratto e quantificato al fine di poter combinare, in rapporti molarli stabiliti, i prodotti da assemblare mediante SOE-PCR. Successivamente è stato possibile visualizzare su gel di agarosio le bande corrispondenti alle sequenze di fusione attese (rispettivamente di 969 pb e 981 pb) (Fig. 50).

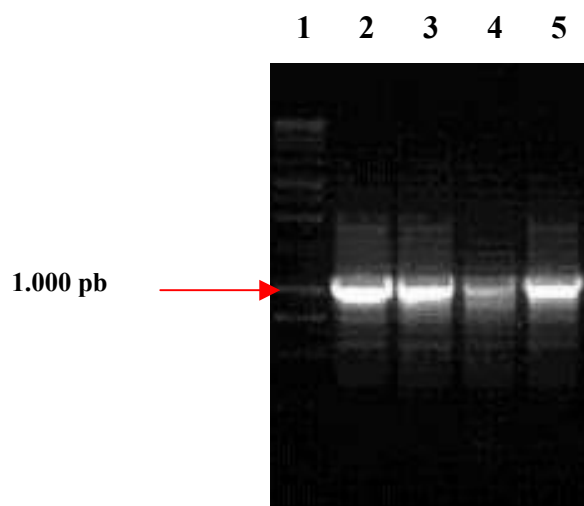


Fig. 50: PCR di assemblaggio per l'ottenimento delle fusioni E7GGG-CP ed E7GGG-L-CP

1	Marcatore di peso molecolare	
2, 3	E7GGG-CP	969 pb
4, 5	E7GGG-L-CP	981 pb

4.3.1.4 Clonaggio delle sequenze E7GGG, CP, E7GGG-CP e E7GGG-link-CP di fusione nel vettore di espressione eucariotico pcDNA3.1(+)

Dopo recupero delle bande, le sequenze di fusione amplificate sono state purificate e quantificate, al fine di impiegare ciascuna di esse, per la successiva reazione di ligazione nel vettore pBlueScriptSK(+)previamente digerito con la endonucleasi di restrizione *EcoRV*.

Dopo ligazione e trasformazione (mediante metodo chimico) delle cellule competenti del ceppo XL-1 blue di *Escherichia coli* con i plasmidi pBS/E7GGG, pBS/E7GGG-CP e pBS/E7GGG-L-CP, è stata effettuata una PCR di controllo su alcune colonie trasformate con ciascuno dei quattro costrutti.

Da 3 cloni positivi per ciascun costrutto sono state effettuate minipreparazioni di DNA plasmidico per verificare la correttezza degli inserti clonati mediante sequenziamento.

I plasmidi ricombinanti, estratti dai cloni selezionati, sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *HindIII* e *NotI*. Il vettore pcDNA3.1(+) è stato linearizzato, mediante digestione con gli stessi enzimi.

Dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio le bande sono state recuperate e da esse il DNA è stato estratto e quantificato, al fine di combinare, nella successiva reazione di ligazione, il vettore ed il relativo inserto nel prestabilito rapporto molare.

Dopo ligazione e trasformazione delle cellule competenti con i nuovi plasmidi ricombinanti pcDNA3.1/E7GGG, pcDNA3.1/E7GGG-CP e pcDNA3.1/E7GGG-L-CP, è stata effettuata una PCR sulle colonie ottenute in seguito alla trasformazione. Dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%, sono state visualizzate le bande corrispondenti alle sequenze di fusione, per le colonie trasformate con ciascun plasmide (Fig. 51a, Fig. 51b).

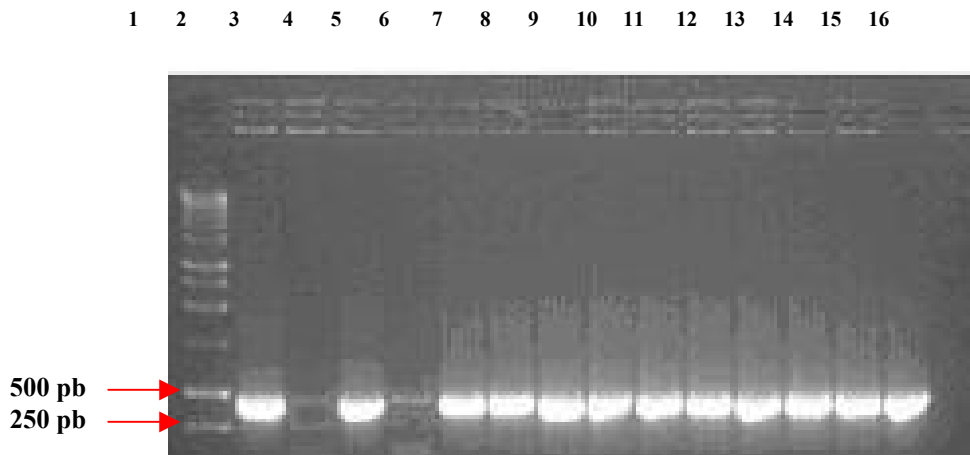


Fig. 51a: Amplificazione mediante PCR delle colonie dopo trasformazione

1	Marcatore di peso molecolare
2 ÷ 15	cloni 1 ÷ 15 (<i>pcDNA3/E7GGG</i>)
16	CTRL (-)

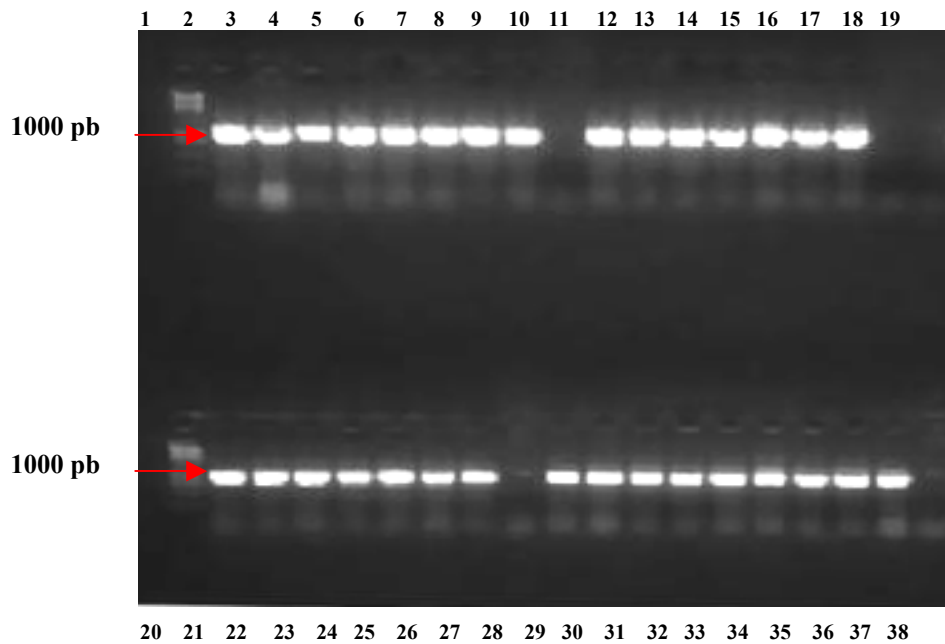


Fig. 51b: Amplificazione mediante PCR delle colonie dopo trasformazione

1, 20	Marcatore di peso molecolare
2 ÷ 18	cloni 1 ÷ 17 (<i>pcDNA/E7GGG-CP</i>)
21 ÷ 37	cloni 1 ÷ 17 (<i>pcDNA/E7GGG-L-CP</i>)
19, 38	CTRL (-)

4.3.2 Realizzazione dei costrutti pcDNA3/PGIPss-E7GGG e pcDNA3/PGIPss-E7GGG-KDEL

4.3.2.1 Amplificazione delle sequenze PGIPss-E7GGG e PGIPss-E7GGG-KDEL

L'inserimento di PGIPss a monte del gene E7GGG è stato ottenuto amplificando tale sequenza dal template pPVX-PGIPss-E7 (descritto in una sezione successiva) con il primer *PGIP-K3 back* ed il primer inverso *E7PGIP-rev*, ottenendo la sequenza del peso molecolare atteso di 161 pb.

Il gene E7GGG è stato amplificato dal plasmide pQE30-E7GGG usando il primer diretto *PGIPssE7-dir* ed il primer inverso *E7Not rev* già descritto oppure *E7-KDEL for*, ottenendo le sequenze di 375 e 390 pb, rispettivamente.

Le sequenze ottenute sono poi state assemblate mediante SOE-PCR ottenendo le fusioni di 497 e 512 pb.

4.3.2.2 Clonaggio delle sequenze di fusione nel vettore di espressione eucariotico pcDNA3.1(+)

Le sequenze di fusione PGIPss-E7GGG e PGIPss-E7GGG-KDEL amplificate sono state purificate e quantificate per la successiva reazione di ligazione nel vettore pBlueScriptSK(+). Effettuata la ligazione e trasformatele cellule competenti XL-1 blue con i plasmidi pBS/PGIPss-E7GGG e pBS/PGIPss-E7GGG-KDEL, è stata effettuata una PCR su alcune colonie trasformate con il primo e con il secondo costrutto.

Da 3 cloni positivi per ciascun costrutto sono state effettuate minipreparazioni di DNA plasmidico per verificare la correttezza degli inserti clonati mediante sequenziamento.

I plasmidi ricombinanti, estratti dai cloni selezionati, sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *HindIII* e *NotI*. Il vettore pcDNA3.1(+) è stato linearizzato, mediante digestione con gli stessi enzimi.

Il DNA è stato recuperato, estratto e quantificato al fine di combinare, nella successiva reazione di ligazione, il vettore ed il relativo inserto nel prestabilito rapporto molare.

Effettuata la ligazione e trasformatele cellule competenti con i nuovi plasmidi ricombinanti pcDNA3.1/PGIPss-E7GGG e pcDNA3.1/PGIPss-E7GGG-KDEL, è stata effettuata una PCR sulle colonie ottenute in seguito alla trasformazione e sono stati scelti i cloni definitivi per le maxi preparazioni da utilizzare per le trasfezioni e per le immunizzazioni.

4.3.3 Amplificazione delle sequenze PGIPss-E7GGG-CP e PGIPss-E7GGG-L-CP

Essendo già disponibili i plasmidi ricombinanti pcDNA3/PGIPss-E7GGG, pcDNA3/E7GGG-CP e pcDNA3/E7GGG-L-CP e gli oligonucleotidi impiegati per l'assemblaggio delle sequenze di fusione in essi clonate, si è pensato di utilizzare tali materiali di partenza per la realizzazione delle fusioni PGIPss-E7GGG-CP e PGIPss-E7GGG-L-CP.

Dai suddetti plasmidi, sottoposti a PCR in presenza dei primers *PGIPssK3back/CP-E7rev*, *PGIPssK3back/CP-L-E7rev*, *E7-CPdir/CPNotrev*, *E7-link-CPdir/CPNotrev* come precedentemente descritto, sono stati ottenuti i prodotti di amplificazione *HindIII*-PGIPss-E7GGG[CP], *HindIII*-PGIPss-E7GGG[LCP], [E7GGG]CP-*NotI* e [E7GGG-L]CP-*NotI* (rispettivamente di 371 e 374, 675 e 678pb) con le regioni di complementarità per il successivo assemblaggio (Fig. 52).

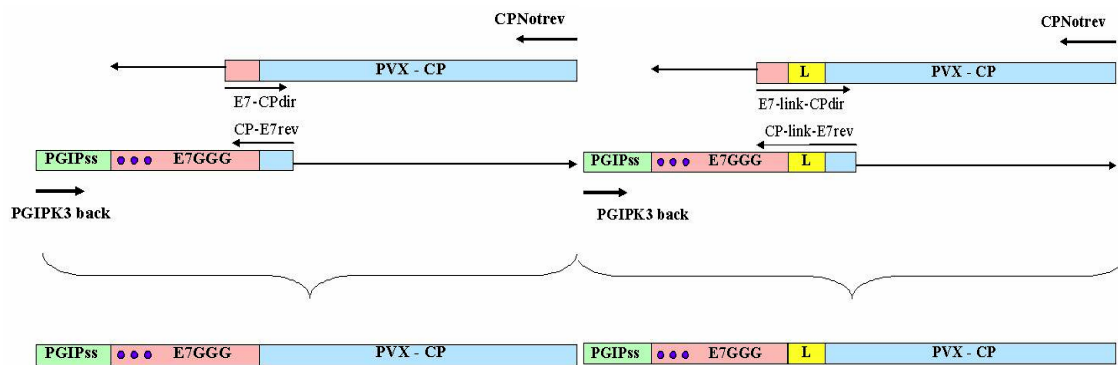


Fig. 52: Ottenimento delle fusioni geniche PGIPss-E7GGG-CP e PGIPss-E7GGG-L-CP

4.3.4 Clonaggio delle sequenze di fusione nel vettore di espressione eucariotico pcDNA3.1(+)

Dopo recupero delle bande, le sequenze di fusione amplificate sono state purificate e quantificate per la successiva reazione di ligazione nel vettore pBlueScriptSK(+).

Trasformate le cellule competenti con i plasmidi pBS/PGIPss-E7GGG-CP e pBS/PGIPss-E7GGG-L-CP, è stata effettuata una PCR su alcune colonie trasformate con il primo e con il secondo costrutto.

Da 3 cloni positivi per ciascun costrutto sono state effettuate minipreparazioni di DNA plasmidico per verificare la correttezza degli inserti clonati mediante sequenziamento.

I plasmidi ricombinanti, estratti dai cloni selezionati, sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *KpnI* e *NotI*. Il vettore pcDNA3.1(+) è stato linearizzato, mediante digestione con gli stessi enzimi, a partire dal plasmide ricombinante pcDNA3.1/PGIPss-E7GGG, già realizzato. L'excisione dell'inserto ha permesso di verificare l'esito positivo della digestione.

Su gel di agarosio sono risultate visibili le bande corrispondenti alle sequenze di fusione, aventi mobilità leggermente superiore a quella dello standard di 1.000 coppie di basi, e quelle relative al vettore pcDNA3.1(+) digerito (Fig. 53). Tali bande sono state recuperate e da esse il DNA è stato estratto e quantificato, al fine di combinare, nella successiva reazione di ligazione, il vettore ed il relativo inserto nel prestabilito rapporto molare.

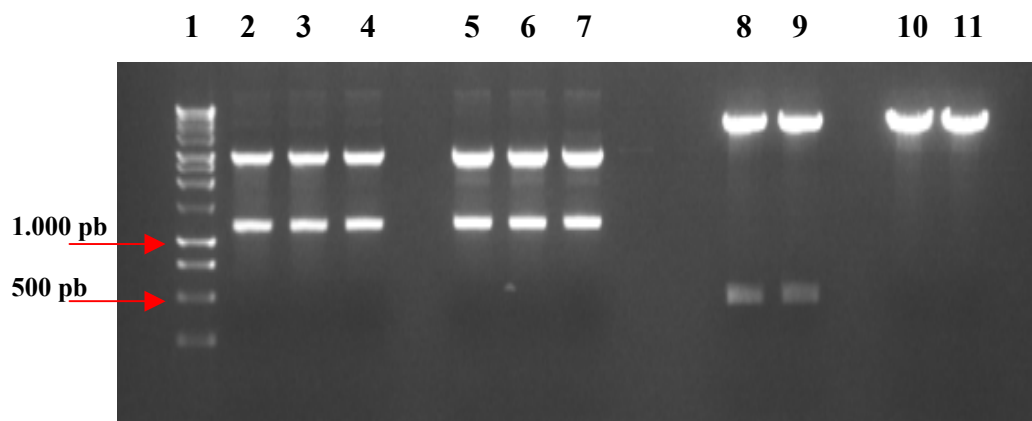


Fig. 53: Verifica mediante digestione degli inserti

1	<i>Marcatore di peso molecolare</i>
2, 3, 4	<i>pBS – PGIPss-E7GGG-CP/KpnI - NotI</i>
5, 6, 7	<i>pBS – PGIPss-E7GGG-L-CP/KpnI - NotI</i>
8, 9	<i>pcDNA3.1(+) – PGIPss-E7GGG/KpnI – NotI</i>
10	<i>pcDNA3.0 – PGIPss-E7GGG/KpnI (ctrl +)</i>
11	<i>pcDNA3.0 – PGIPss-E7GGG/NotI (ctrl +)</i>

Effettuata la ligazione e trasformate le cellule competenti con i nuovi plasmidi ricombinanti pcDNA3.1/ PGIPss-E7GGG-CP e pcDNA3.1/PGIPss-E7GGG-L-CP, è stata effettuata una PCR sulle colonie ottenute utilizzando i primers universali T7 e Sp6, complementari alle regioni promotrici omonime di pcDNA3.1(+) fiancheggianti il “polylinker”. Ciò ha permesso di verificare il loro corretto inserimento in pcDNA3.0(+). Dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio all’1%, sono state visualizzate le bande corrispondenti alle sequenze di fusione, per le colonie trasformate con pcDNA3.1/ PGIPss-E7GGG-CP e con pcDNA3.1/ PGIPss-E7GGG-L-CP.

L’esito positivo del subclonaggio è stato confermato dalla verifica mediante sequenziamento.

4.4 ESPRESSIONE DELLE PROTEINE IN CELLULE DI MAMMIFERO

4.4.1 Trasfezione di cellule di mammifero

4.4.1.2 Analisi dei lisati cellulari in “immunoblotting”

I plasmidi utilizzati per le trasfezioni cellulari sono stati purificati in assenza di endotossine mediante “Plasmid Maxi Kit LPS-free” (QIAGEN).

Sono stati ottimizzati i protocolli di trasfezione attraverso l’uso di differenti sistemi ed agenti trasfettanti: trasfezione mediante precipitazione con CaCl₂, mediante agenti lipidici (Reagent V, SIGMA) e mediante agenti lipidici non liposomali (Effectene Reagent, QIAGEN). Quest’ultimo si è rivelato il sistema più adatto alla linea HEK-293 scelta.

Le trasfezioni sono state condotte in assenza od in presenza degli agenti Inibitori del Proteasoma (Calbiochem) MG-132 e Lactacistina.

Le proteine derivanti dalla lisi di circa 1x10⁶ cellule trasfettate, separate attraverso SDS-PAGE al 12%, sono state trasferite su membrana PVDF ed analizzate mediante “immunoblotting” impiegando per la loro rivelazione l’anticorpo policlonale α -E7 o l’anticorpo α -CP e, conseguentemente, anticorpi secondari biotinilati di appropriata specificità e, quindi, streptavidina perossidasiata.

Sono state effettuate anche immunoprecipitazioni degli antigeni codificati dal DNA plasmidico utilizzato per ciascuna trasfezione.

Il costrutto pcDNA3/E7GGG esprime il gene E7GGG. Infatti è stata rivelata una banda specifica del peso molecolare atteso, simile a quello della proteina di riferimento His₆-E7GGG ricombinante di *E. coli* (circa 17 kDa); è possibile, in queste condizioni, individuare la presenza del dimero (*Fig. 54a, Fig. 55*).

In assenza di inibitori del proteasoma, l’immunoprecipitazione ha consentito di visualizzare il prodotto espresso (*Fig. 54b*).

Il trattamento delle cellule trasfettate con gli agenti inibitori del proteasoma Lactacistina e MG-132 ha determinato un drammatico incremento dell’espressione dell’antigene codificato dal DNA plasmidico, dimostrando che anche la forma mutagenizzata della proteina E7 è degradata secondo la via dell’ubiquitina come la proteina “wild type”.

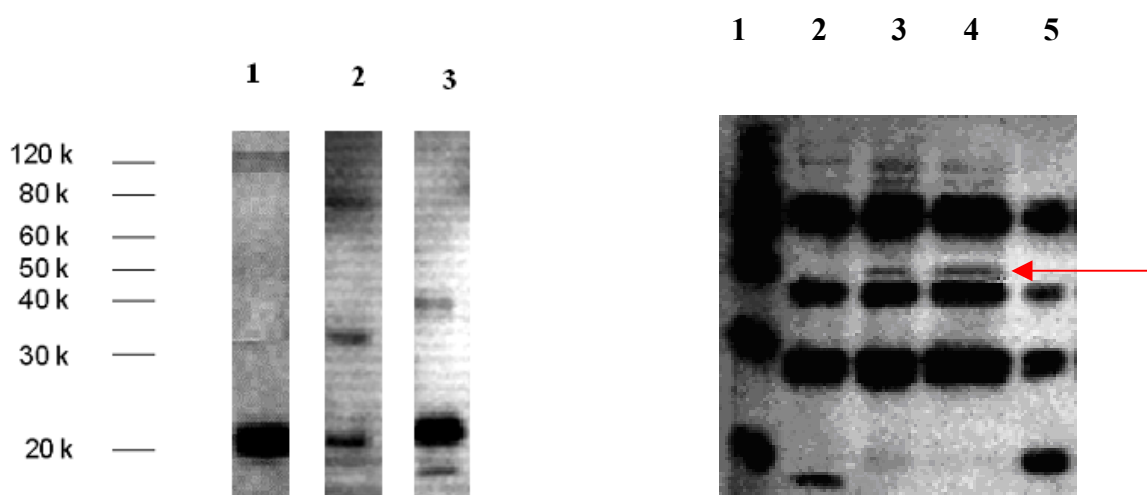
A tal proposito è stato anche effettuato uno studio per determinare quale inibitore del proteasoma ed a quale concentrazione si adattasse meglio al sistema utilizzato.

L’inibitore Lactacistina si è rivelato il reagente a più basso effetto cito-tossico per concentrazioni comprese tra 10 e 100 μ M con un maggior recupero di antigene alla concentrazione più bassa utilizzata pari a 10 μ M. L’inibitore MG132 ha, invece, mostrato i migliori risultati in rapporto al bilancio cito-tossicità/recupero di antigene nel “range” di concentrazione 25-50 μ M con un maggior recupero di antigene espresso quando utilizzato ad una concentrazione pari a 25 μ M (*Fig. 55*).

Il costrutto pcDNA3/E7GGG-CP esprime un prodotto relativo all'intera fusione E7GGG-CP. In assenza di inibitori del proteasoma, la trasfezione, produce una banda del peso molecolare di circa 17 kDa (corrispondente al peso della proteina E7GGG) insieme ad un'altra a più alto peso molecolare di circa 35 kDa (probabilmente l'intero prodotto di fusione E7GGG-CP) (Figura 54a).

In assenza di inibitori del proteasoma, esperimenti di immunoprecipitazione (I.P., effettuati precipitando l'antigene con pAb α -E7 e sviluppando il filtro nuovamente con pAb α -E7 oppure con pAb α -PVX come anticorpi primari, rispettivamente (Fig. 54b, Fig.54c), hanno consentito di visualizzare il prodotto di fusione interamente espresso anche se a bassi livelli (frece rosse).

Il costrutto pcDNA3/E7GGG-L-CP esprime un prodotto proteico relativo alle due sequenze fuse tramite il "linker", reso visibile solo dopo immunoprecipitazione (Fig. 54b).



a) b)
 Figura 54a "Immunoblotting" dei lisati in assenza di inibitori del proteasoma

- 1) *His₆E7GGG* da *E. coli*
- 2) *HEK/E7GGG*
- 3) *HEK/E7GGG-CP*

Fig. 54b: "Immunoblotting" dei lisati immunoprecipitati (pAb α -His₆E7)

- 1) Marcatore di peso molecolare
- 2) I.P. *HEK/E7GGG*
- 3) I.P. *HEK/E7GGG-CP*
- 4) I.P. *HEK/E7GGG-L-CP*
- 5) I.P. *His₆E7GGG* da *E. coli* (CTRL +)

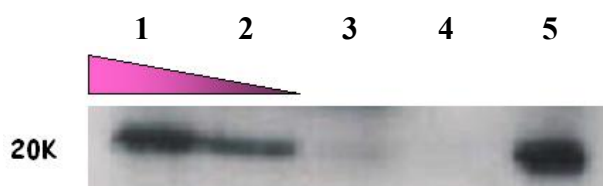
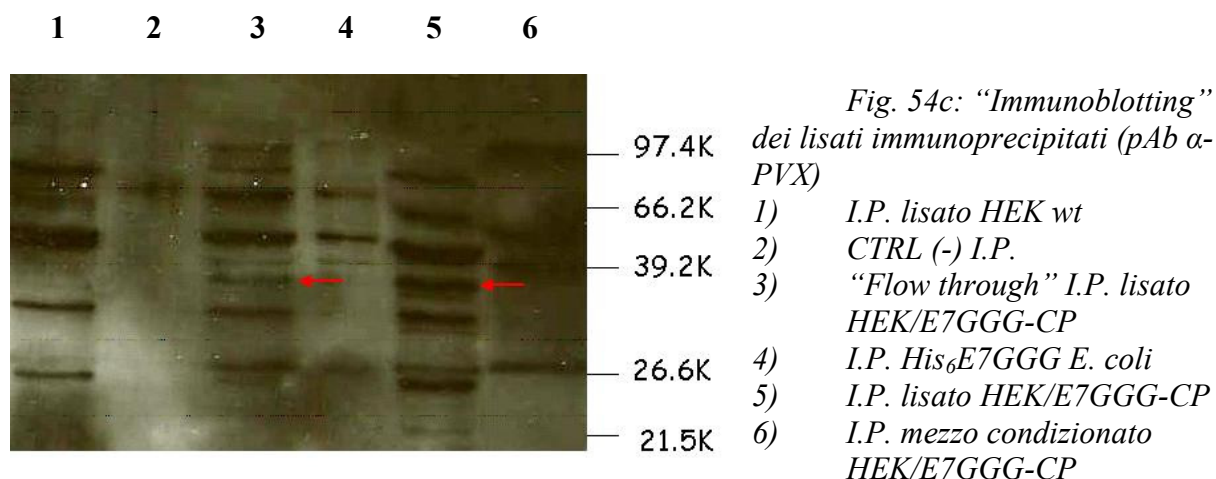


Fig. 55: Immunoblotting relativo alle trasfezioni con il plasmide pcDNA3.1/E7GGG in presenza di inibitori del proteasoma.

- 1) HEK/E7GGG + MG-132 25 μ M
- 2) HEK/E7GGG + MG-132 50 μ M
- 3) HEK/E7GGG (senza inibitori del proteasoma)
- 4) Marcatore di peso molecolare
- 5) HEK/E7GGG + Lactacistina 10 μ M

Per verificare che i prodotti di fusione interi fossero effettivamente trascritti, è stata condotta una *Reverse Transcription PCR* sull'RNA totale estratto dalle cellule trasfettate che ha dimostrato come i prodotti di fusione E7GGG-CP ed E7GGG-L-CP fossero effettivamente trascritti per intero e che, dunque, la insoddisfacente rilevazione dei prodotti d'espressione corrispondenti in "immunoblotting" era dovuta all'incapacità di recuperarli dal campione a causa, presumibilmente, della loro rapida degradazione nel sistema proteasoma-ubiquitina. (Fig. 56).

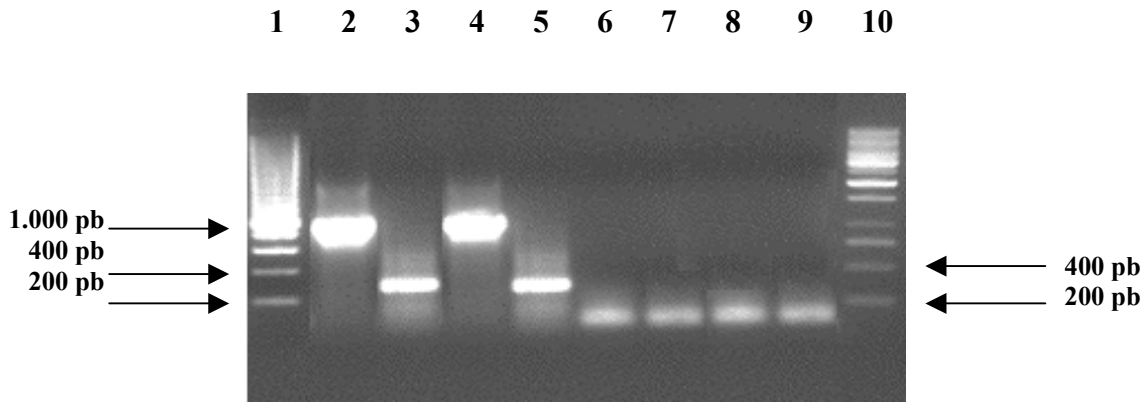


Fig. 56: RT-PCR condotte su RNA totale estratto dalle cellule trasfettate

- 1) Marcatore di peso molecolare
- 2) RT-PCR su RNA tot da HEK/E7GGG-CP (E7HIII_{dir}/CPNotrev)
- 3) RT-PCR su RNA tot da HEK/E7GGG-CP (E7HIII_{dir}/CPE7rev)
- 4) RT-PCR su RNA tot da HEK/E7GGG-L-CP (E7HIII_{dir}/CPNotrev)
- 5) RT-PCR su RNA tot da HEK/E7GGG-L-CP (E7HIII_{dir}/CPE7rev)
- 6) RT-PCR su RNA tot da HEK wt (E7HIII_{dir}/CPNotrev) CTRL (-)
- 7) RT-PCR su RNA tot da HEK wt (E7HIII_{dir}/CPE7rev) CTRL (-)
- 8) RT-PCR senza templatato (E7HIII_{dir}/CPNotrev)
- 9) RT-PCR senza templatato (E7HIII_{dir}/CPE7rev)
- 10) Marcatore di peso molecolare

Il trattamento delle cellule trasfettate con agenti inibitori del proteasoma ha determinato, infatti, anche in questo caso un drammatico incremento dell'espressione della sequenza di fusione codificata dal DNA plasmidico. Pertanto la proteina di fusione prodotta dalle cellule trasfettate sembrerebbe essere particolarmente sensibile al processo endocellulare di ubiquitinazione che ne determina la proteolisi attraverso la via del proteasoma, come la proteina E7 di per sé.

Infatti, sia l'anticorpo anti-E7 sia l'anticorpo anti-PVX hanno rivelato esclusivamente la stessa, unica banda che esibisce una mobilità elettroforetica vicina ai 40 kDa. I prodotti proteici corrispondenti a tali segnali possono essere identificati con le proteine di fusione E7GGG-CP ed E7GGG-L-CP, per le quali si assume un pM pari a circa 37 kDa. Tale valore è giustificabile, considerando che la proteina E7GGG esibisca, in questo caso, una mobilità elettroforetica corrispondente al proprio pM teorico di 11 kDa (anziché a quello di 21 kDa) (Fig. 57, Fig. 58). La fusione, probabilmente, impedisce che i residui aminoacidici acidi, situati all'estremità N-terminale di E7, alterino il comportamento della proteina in presenza di un campo elettrico.

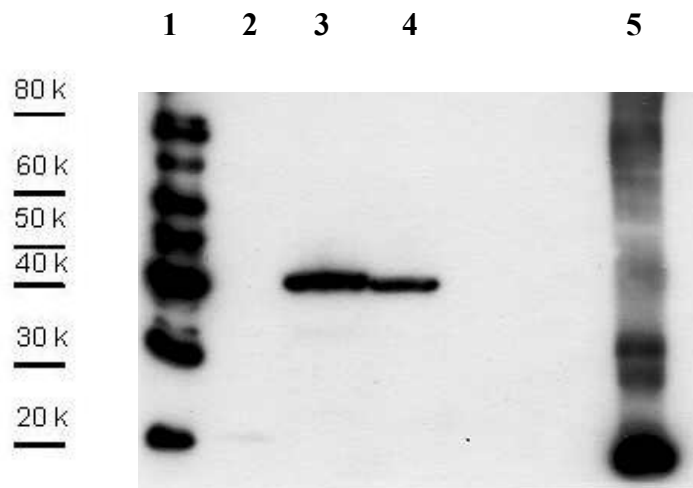


Fig. 57: "Immunoblotting" dei lisati di cellule trasfettate con i plasmidi pcDNA3/ E7GGG-CP e pcDNA3/ E7GGG-L-CP in presenza di inibitori del proteasoma

- 1) Marcatore di peso molecolare
- 2) HEK/E7GGG
- 3) HEK/E7GGG-CP+MG-132 25µM
- 4) HEK/E7GGG-L-CP+MG-132 25µM
- 5) E7 (estratto *N. benthamiana*)

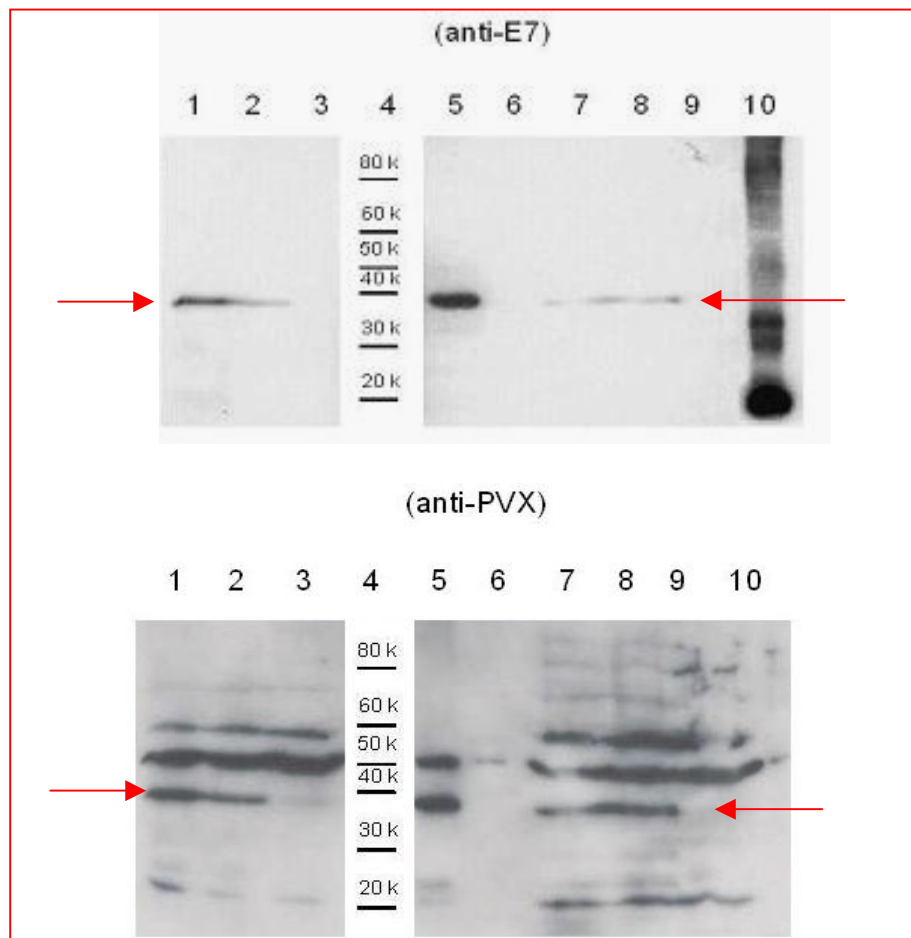


Fig 58: "Immunoblotting" dei lisati di cellule trasfettate con i plasmidi pcDNA3/ E7GGG-CP e pcDNA3/ E7GGG-L-CP in presenza di inibitori del proteasoma (pAb α -His₆E7 pAb α -PVX)

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1) HEK/E7GGG-CP+ MG-132 25µM | 6)/ |
| 2)HEK/E7GGG-CP + MG-132 50µM | 7)HEK/E7GGG-L-CP+ MG-132 50µM |
| 3)HEK/E7GGG-CP | 8) HEK/E7GGG-L-CP+ MG-132 25µM |
| 4)Marcatore di peso molecolare | 9)HEK wt |
| 5)HEK/E7GGG-CP+Lactacistina 10µM | 10)E7 (estratto <i>N. benthamiana</i>) |

La figura 58 mostra lo stesso filtro sviluppato con anticorpo pAb α -His₆-E7, sottoposto a “stripping” e poi sviluppato con anticorpo pAb α -PVX. Le bande del peso di circa 40 kDa ed imputate ai prodotti di fusione compaiono in ambo i casi e sono indicati con la freccia rossa. L’anticorpo pAb α -PVX produce bande di “cross-reattività”, tuttavia le bande imputabili ai prodotti di fusione non si ritrovano, ad esempio, nel campione HEK “wild type”, né fra i campioni trasfettati separati nello stesso filtro sviluppato con l’anticorpo pAb α -His₆-E7.

Sulla base di tali premesse, la trasfezione di cellule di mammifero con i costrutti pcDNA3.1/PGIPss-E7GGG, pcDNA3.1/PGIPss-E7GGG-KDEL, pcDNA3.1/PGIPss-E7GGG-CP e pcDNA3.1/PGIPss-E7GGG-L-CP è stata effettuata sia in presenza, sia in assenza di agenti inibitori del proteasoma, introdotti nel mezzo di coltura, alla concentrazione di 25 μ M, circa 24 ore dopo l’aggiunta dei complessi DNA-Effectene.

L’auspicabile ingresso dei prodotti di fusione codificati nel “pathway” secretorio dovrebbe, tuttavia, comunque, renderli insensibili alla degradazione proteasomale ubiquitina-mediata, cui sono destinate esclusivamente le proteine intracellulari.

Il plasmide pPGIPss-E7GGG esprime un prodotto relativo ad E7GGG, tuttavia ha mostrato un certo effetto cito-tossico. Le cellule trasfettate con tale plasmide esprimono livelli esigui, anche in presenza di inibitori del proteasoma, di un prodotto specifico di peso molecolare pari a quello di E7GGG visibile in forma di doppia banda in “immunoblotting” (Fig. 59).

Ciò che è più interessante è che, dopo ultracentrifugazione del mezzo condizionato delle cellule trasfettate, l’anticorpo anti-E7 rileva una banda specifica di peso molecolare pari al peso della proteina E7. Dunque, la sequenza segnale della PGIP di *Phaseolus vulgaris* sembrerebbe determinare la secrezione della proteina E7GGG in un sistema di espressione di mammifero (Fig. 60).

Il costrutto pPGIPss-E7GGG-KDEL ha mostrato un effetto citotossico ed apoptogeno molto spiccati. Non è stato mai possibile ottenere un campione adeguato per la visualizzazione dell’espressione in “immunoblotting” (Fig.59).

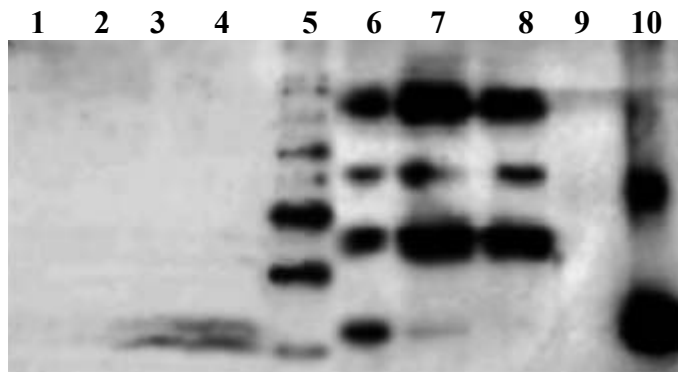


Fig. 59 : "Immunoblotting" dei lisati di cellule trasfettate con i plasmidi pcDNA3/ PGIPss-E7GGG e pcDNA3/ PGIPss-E7GGG-KDEL

- 1) HEK/PGIPss-E7GGG (senza inibitori proteasoma)
- 2) HEK/PGIPss-E7GGG-KDEL (senza inibitori proteasoma)
- 3) HEK/PGIPss-E7GGG+ MG-132 25 μ M
- 4) HEK/PGIPss-E7GGG-KDEL + MG-132 25 μ M
- 5) Marcatore di peso molecolare
- 6) Immunoprecipitazione His₆E7GGG da *E. coli* (CTRL +)
- 7) Immunoprecipitazione HEK/PGIPss-E7GGG (senza inibitori proteasoma)
- 8) Immunoprecipitazione HEK/PGIPss-E7GGG-KDEL (senza inibitori proteasoma)
- 9) /
- 10) E7 (estratto *N. benthamiana*)

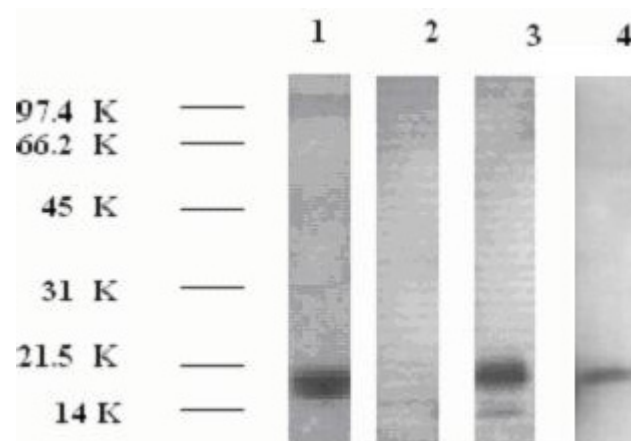


Fig. 60 : "Immunoblotting" del mezzo condizionato di cellule trasfettate con il plasmide pcDNA3/ PGIPss-E7GGG.

- 1) His₆E7GGG da *E. coli* (CTRL +)
- 2) C.M. ultracentrifugato HEK non trasfettate
- 3) Lisato HEK/E7GGG+ MG-132 25 μ M
- 4) C.M. ultracentrifugato da HEK trasfettate con PGIPss-E7GGG+ MG-132 25 μ M

I prodotti di fusione, presenti nei lisati delle cellule trasfettate con i plasmidi ricombinanti pcDNA3.1/PGIPss-E7GGG-CP e pcDNA3.1/PGIPss-E7GG-L-CP, sono stati separati

mediante SDS-PAGE ed analizzati mediante “immunoblotting” impiegando per la rivelazione l’anticorpo policlonale α -E7.

I costrutti pcDNA3.1/PGIPss-E7GGG-CP e pcDNA3.1/PGIPss-E7GGG-L-CP esprimono livelli elevati delle relative fusioni dopo trattamento con inibitori del proteasoma. Infatti, su lastra fotografica, è stato possibile visualizzare i segnali corrispondenti ad entrambi i prodotti di fusione attesi, espressi in cellule trasfettate in presenza di agenti inibitori del proteasoma.

I segnali risultano, tuttavia, sdoppiati in due bande distinte, separate da una distanza di migrazione che potrebbe corrispondere al peso teorico delle fusioni + o – la sequenza segnale (Fig. 61).

La banda a più alto pM, per ciascuno dei due campioni, ha una mobilità elettroforetica paragonabile a quella della proteina di riferimento di 40 kDa, presente nel marcatore.

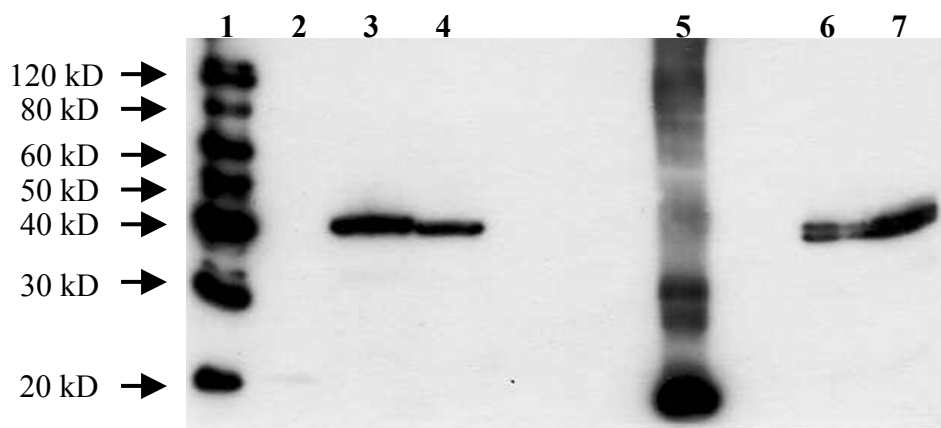


Fig. 61: “Immunoblotting” dei lisati di cellule trasfettate con i plasmidi pcDNA3/ PGIPss-E7GGG-CP e pcDNA3/ PGIPss-E7GGG-L-CP (parte della figura era stata già riportata in Fig. 57)

- 1 Marcatore di peso molecolare
- 2 HEK/E7GGG
- 3 HEK/E7GGG-CP + MG-132 25 μ M (ctrl +)
- 4 HEK/E7GGG-L-CP + MG-132 25 μ M (ctrl +)
- 5 E7 (estratto *N. benthamiana*)
- 6 HEK/PGIPss-E7GGG-CP + MG-132 25 μ M

Il valore di 40 kDa corrisponde effettivamente al pM atteso per i prodotti di fusione completi PGIPss-E7GGG-CP e PGIPss-E7GGG-L-CP, considerando che la proteina E7GGG esibisca una mobilità elettroforetica corrispondente al proprio pM teorico di 11 kDa (anziché a quello di circa 17 kDa). Per entrambi i campioni, la banda con il pM più basso risulta attribuibile ad un prodotto di fusione troncato, probabilmente mancante della porzione N-terminale corrispondente alla PGIPss.

Sia nel caso dei prodotti proteici completi che di quelli troncati (e ciò vale anche per le fusioni E7GGG-CP ed E7GGG-L-CP), gli esperimenti condotti non hanno consentito di verificare

l'eventuale formazione di strutture multimeriche auto-aggregantesi, indotte dalla CP. Va comunque considerato che il trattamento di bollitura, cui sono sottoposti i campioni preliminarmente al caricamento su gel di poliacrilammide e la successiva corsa elettroforetica, in presenza di un agente denaturante come l' SDS, determinano necessariamente il disassemblamento di qualsiasi possibile aggregato multimerico, consentendo la visualizzazione di singole molecole proteiche. Nessuno dei prodotti di fusione attesi è stato espresso in cellule trasfettate in assenza di agenti inibitori del proteasoma.

4.4.1.3 Analisi dei lisati cellulari in immunofluorescenza

Cellule seminate su vetrino e trasfettate con i costrutti a base di pcDNA3.1(+) ottenuti, sono state fissate ed incubate con l' anticorpo anti-E7 seguito da un anticorpo secondario biotinilato e da Streptavidina-FITC per l'osservazione in microscopia a fluorescenza.

E' stata confermata l'espressione di tutte le sequenze progettate con il gene E7GGG nelle cellule trasfettate.

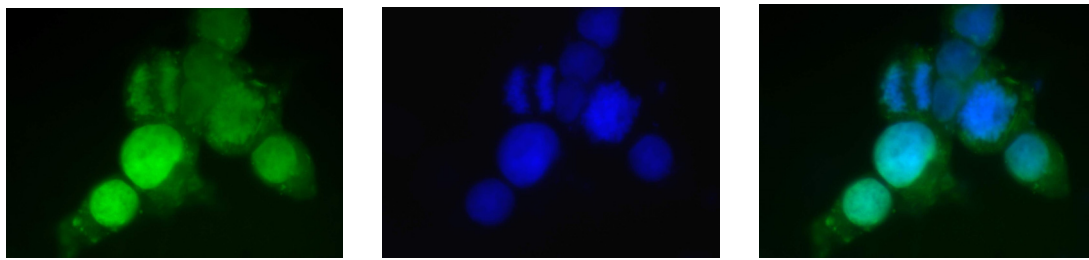
Le cellule trasfettate con pcDNA3/E7GGG presentano una fluorescenza specifica localizzata nel nucleo (che si sovrappone alla contro-colorazione aspecifica della cromatina) (*Fig. 62 a, a', a''*) ed in vescicole citoplasmatiche (*Fig. 62 b*).

Le cellule trasfettate con pcDNA3/E7GGG-CP (*Fig. 62 d*) e pcDNA3/E7GGG-L-CP (*Fig. 62 e*) presentano una fluorescenza specifica esclusivamente citoplasmatica che si ritrova in vescicole più numerose e cospicue rispetto al solo antigene E7GGG, nei prolungamenti citoplasmatici di cellule contigue ed a ridosso della membrana plasmatica .

Le cellule trasfettate con pcDNA3/PGIPss-E7GGG (*Fig. 62 f, g*) presentano una fluorescenza specifica localizzata nel nucleo come nel caso di E7GGG, (*Fig. 62 f*). Sia le cellule trasfettate con pcDNA3/PGIPss-E7GGG (*Fig. 62 g*), sia quelle trasfettate con pcDNA3/PGIPss-E7GGG-KDEL (*Fig. h, i*) producono una fluorescenza specifica nel citoplasma in strutture "reticolari" che si estendono in tutto il citoplasma e potrebbero rappresentare il reticolo endoplasmatico (studi di microscopia confocale potrebbero confermare l'ipotesi).

Le cellule trasfettate con pcDNA3/PGIPss-E7GGG-CP (*Fig. 62 l*) e pcDNA3/PGIPss-E7GGG-L-CP (*Fig. 62 m*) presentano una fluorescenza specifica citoplasmatica perinucleare ed in vescicole od in strutture "reticolari" che potrebbero rappresentare il reticolo endoplasmatico (studi di microscopia confocale potrebbero confermare l'ipotesi) distribuite in tutto il citoplasma ed a ridosso della membrana plasmatica.

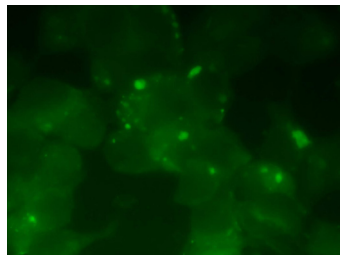
Fig. 62: Fotografie in immunofluorescenza condotte sulle cellule trasfettate con i costrutti in pc DNA 3.I(+)



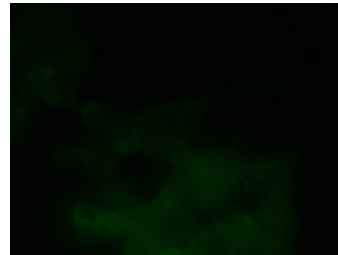
a)

a')

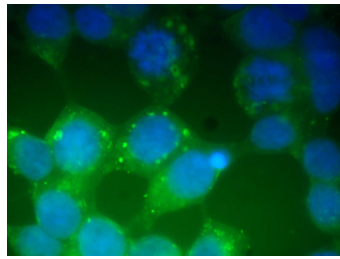
a'')



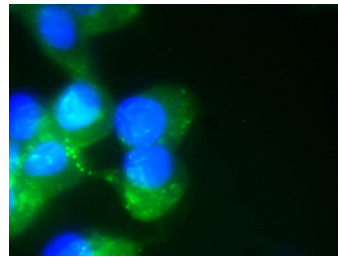
b)



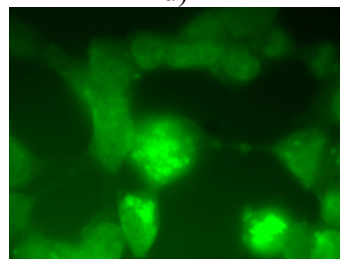
c) CTRL (-)



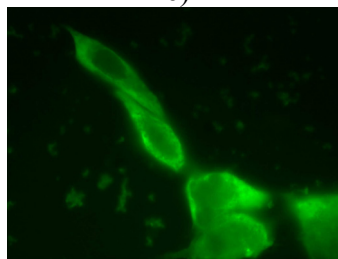
d)



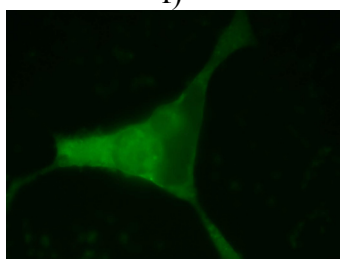
e)



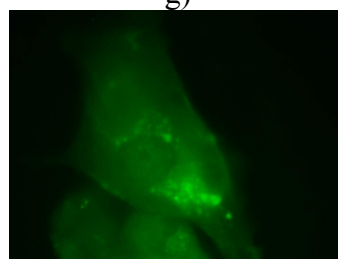
f)



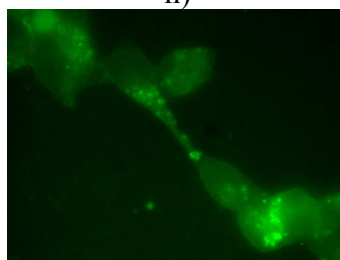
g)



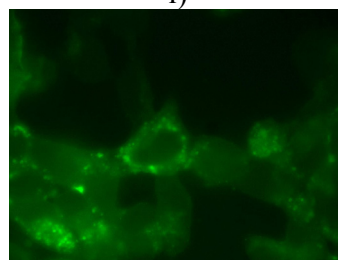
h)



i)



l)



m)

4.4.1.4 Analisi dei mezzi condizionati per l'individuazione di prodotti di secrezione

La capacità della sequenza PGIP di fungere da segnale di secrezione in un sistema cellulare di mammifero è già stata dimostrata dall'individuazione della proteina E7GGG nel mezzo condizionato (C.M.) di cellule trasfettate con il plasmide ricombinante pcDNA3.1/PGIPss-E7GGG.

Al fine di individuare, nell'ambiente extracellulare, i prodotti di fusione codificati dai plasmidi ricombinanti pcDNA3.0/PGIPss-E7GGG-CP e pcDNA3.0/ PGIPss-E7-L-CP, i mezzi condizionati di cellule trasfettate in presenza di inibitori del proteasoma sono stati sottoposti ad ultracentrifugazione (135000 x g per 2 ore). E', infatti, auspicabile che, qualora i prodotti di fusione vengano secreti e vadano incontro ad auto-assemblamento, gli aggregati multimerici risultanti raggiungano un peso molecolare sufficientemente alto da consentirne la precipitazione mediante ultracentrifugazione.

I "pellets" derivanti dall'ultracentrifugazione sono stati analizzati mediante "immunoblotting" utilizzando, per la rivelazione di ambo i prodotti di fusione, l'anticorpo policlonale α -E7. Per nessuno dei due campioni, tuttavia, è stato visualizzato alcun segnale corrispondente ai prodotti attesi (dati non mostrati).

Neanche gli esperimenti di immunoprecipitazione, condotti sul mezzo condizionato mediante l'anticorpo policlonale α -E7 e la proteina L coniugata ad agarosio, hanno permesso di individuare le proteine E7GGG-CP ed E7GGG-L-CP.

I saggi ELISA, effettuati sia sui mezzi condizionati tal quali, sia sui precipitati derivanti dalla loro ultracentrifugazione, impiegando l'anticorpo policlonale α -E7, hanno confermato l'assenza dei prodotti di fusione nell'ambiente extracellulare.

Tale risultato, inatteso e soprattutto contrastante con le prove sperimentali precedentemente effettuate, apre il campo a numerose interpretazioni relativamente al destino intracellulare di prodotti proteici comunque correttamente sintetizzati.

4.5 VACCINAZIONI TERAPEUTICHE A DNA IN MODELLO PRE-CLINICO

4.5.1 Scheda di vaccinazione terapeutica

Per gli esperimenti sono stati utilizzati topi di ceppo C57BL/6 di sesso femminile, allevati all'interno del Centro Ricerche Sperimentali dell'Istituto Regina Elena. Dopo circa 8-10 giorni di permanenza nella gabbia sperimentale, dove sono nutriti con mangimi controllati i topi vengono inoculati con una dose tumorigenica di cellule TC1 (5×10^3 in 200 μ l di

soluzione fisiologica) mediante iniezione sottocutanea sul quadricipite femorale e quindi suddivisi in gabbie distinte per ogni vaccino. Tre giorni dopo l'incolo tumorale vengono iniettati vaccini a DNA mediante iniezione intramuscolare (100 µg di DNA plasmidico/topo) o mediante iniezione ad elevata pressione tramite "gene gun" (1 µg di DNA plasmidico/topo). Il trattamento viene ripetuto, con le stesse modalità, a distanza di una settimana dal primo inoculo.

Gli animali sono esaminati due o tre volte alla settimana per l'eventuale comparsa e misurazione del tumore. Dopo circa cinquanta giorni o comunque prima che i topi mostrino segni di sofferenza, vengono anestetizzati per il prelievo del siero e quindi sacrificati mediante CO₂ o dislocazione cervicale per il prelievo della milza.

4.5.2 Protezione dal tumore

4.5.2.1 Protezione conferita dai plasmidi pcDNA3/E7GGG, pcDNA3/E7GGG-CP e pcDNA3/E7GGG-linker-CP

Le medie calcolate per ciascun esperimento ripetuto 3 volte su un numero pari a 6 topi per plasmide, indicano che, a 30 giorni dal *challenge*, pE7GGG-CP conferisce protezione nel 60% dei topi, mentre pE7GGG conferisce una protezione pari al 40% (Fig. 63). Un sensibile ritardo nello sviluppo del tumore ed una notevole riduzione della taglia di questo è stata riscontrata negli animali immunizzati con il plasmide pE7GGG-CP rispetto a quelli vaccinati con pE7GGG (dati non mostrati).

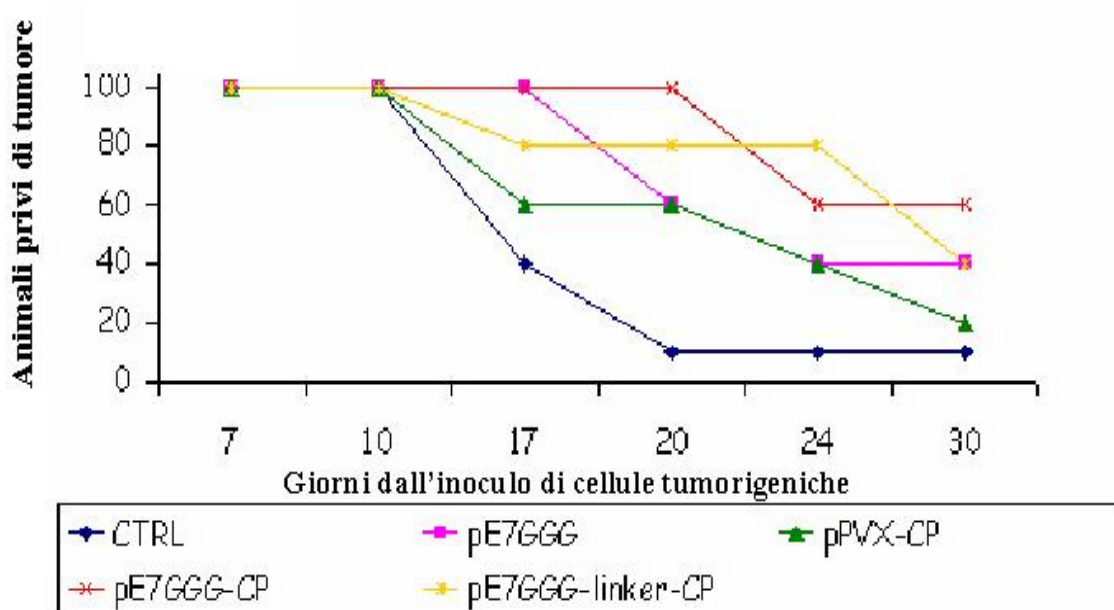


Fig. 63: Protezione da sfida con cellule tumorali esperimenti E7 conferita dalla vaccinazione con i plasmidi pcDNA3/E7GGG, pcDNA3/E7GGG-CP e pcDNA3/E7GGG-linker-CP.

4.5.2.2 Protezione conferita dai plasmidi pcDNA3/PGIPss-E7GGG e pcDNA3/PGIPss-E7GGG-KDEL

I topi immunizzati per via intramuscolare con i plasmidi pPGIPss-E7GGG e pPGIPss-E7GGG-KDEL hanno mostrato segni di sofferenza e dimagrimento, fenomeni non riscontrati in corrispondenza delle altre vaccinazioni. Nonostante ciò, a 3 settimane dalla sfida con cellule tumorali esprimenti E7, nessuno dei topi vaccinati con i plasmidi pPGIPss-E7GGG o pPGIPss-E7GGG-KDEL ha sviluppato il tumore. A 45 giorni, l'immunizzazione con il plasmide pPGIPss-E7GGG protegge ancora il 33% dei topi ed un 17% di protezione si riscontra anche negli animali immunizzati con il plasmide pPGIPss-E7GGG-KDEL (Fig. 64).

4.5.2.3 Protezione conferita dai plasmidi pcDNA3/PGIPss-E7GGG-CP e pcDNA3/PGIPss-E7GGG-linker-CP

A 30 giorni dalla sfida con cellule tumorali esprimenti E7, l'immunizzazione con il plasmide pPGIPss-E7GGG-CP conferisce il 17% di protezione, mentre il plasmide pPGIPss-E7GGG-linker-CP conferisce il 50% di protezione (Fig. 64).

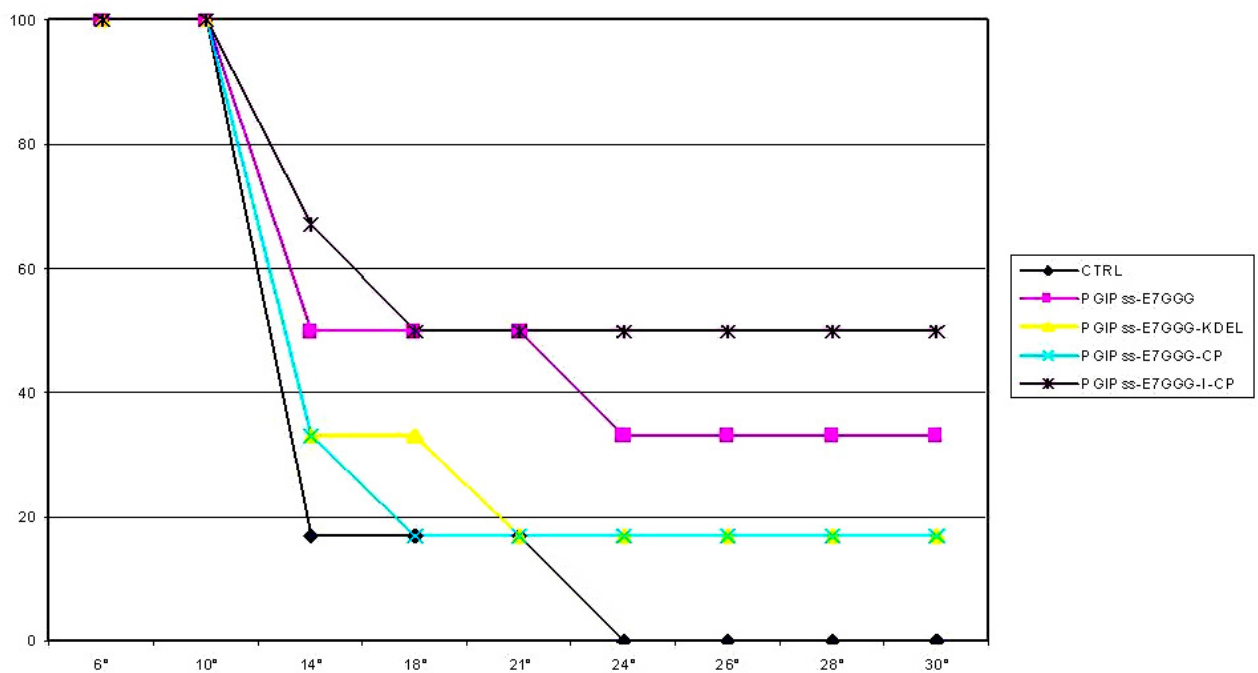


Fig. 64: Protezione da sfida con cellule tumorali esprimenti E7 conferita dalla vaccinazione intra-muscolare con i plasmidi pcDNA3/PGIPss-E7GGG, pcDNA3/PGIPss-E7GGG-KDEL, pcDNA3/PGIPss-E7GGG-CP e pcDNA3/PGIPss-E7GGG-linker-CP

4.5.3 Analisi delle IgG totali anti-E7 nei sieri degli animali immunizzati

4.5.3.1 IgG circolanti indotte dalla vaccinazione con i plasmidi pE7GGG, pE7GGG-CP e pE7GGG-linker-CP

I sieri dei topi immunizzati con il plasmide pE7GGG hanno mostrato bassi titoli di IgG sieriche. I sieri dei topi immunizzati con il plasmide pE7GGG-CP hanno mostrato i più alti titoli di IgG totali contro E7 anche rispetto alla versione con il “linker”. L’immunizzazione con pE7GGG-L-CP ha determinato una risposta anticorpale soddisfacente solo in alcuni topi (*Fig. 65*).

4.5.3.2 IgG circolanti indotte dalla vaccinazione con i plasmidi pPGIPss-E7GGG e pPGIPss-E7GGG-KDEL

I sieri dei topi immunizzati con il plasmide pPGIPss-E7GGG hanno mostrato titoli molto elevati di IgG totali contro E7; anche i sieri derivanti dagli animali immunizzati con pPGIPss-E7GGG-KDEL hanno mostrato una buona risposta anticorpale (*Fig. 65*).

4.5.3.3 IgG circolanti indotte dalla vaccinazione con i plasmidi pPGIPss-E7GGG-CP, e pPGIPss-E7GGG-linker-CP

I sieri dei topi immunizzati con il plasmide pPGIPss-E7GGG-CP hanno mostrato titoli molto elevati di IgG totali contro E7; contrariamente ai dati di protezione, quelli relativi alle risposte anticorpali per gli animali immunizzati con pPGIPss-E7GGG-L-CP hanno mostrato una risposta anticorpale soddisfacente solo in alcuni topi (*Fig. 65*).

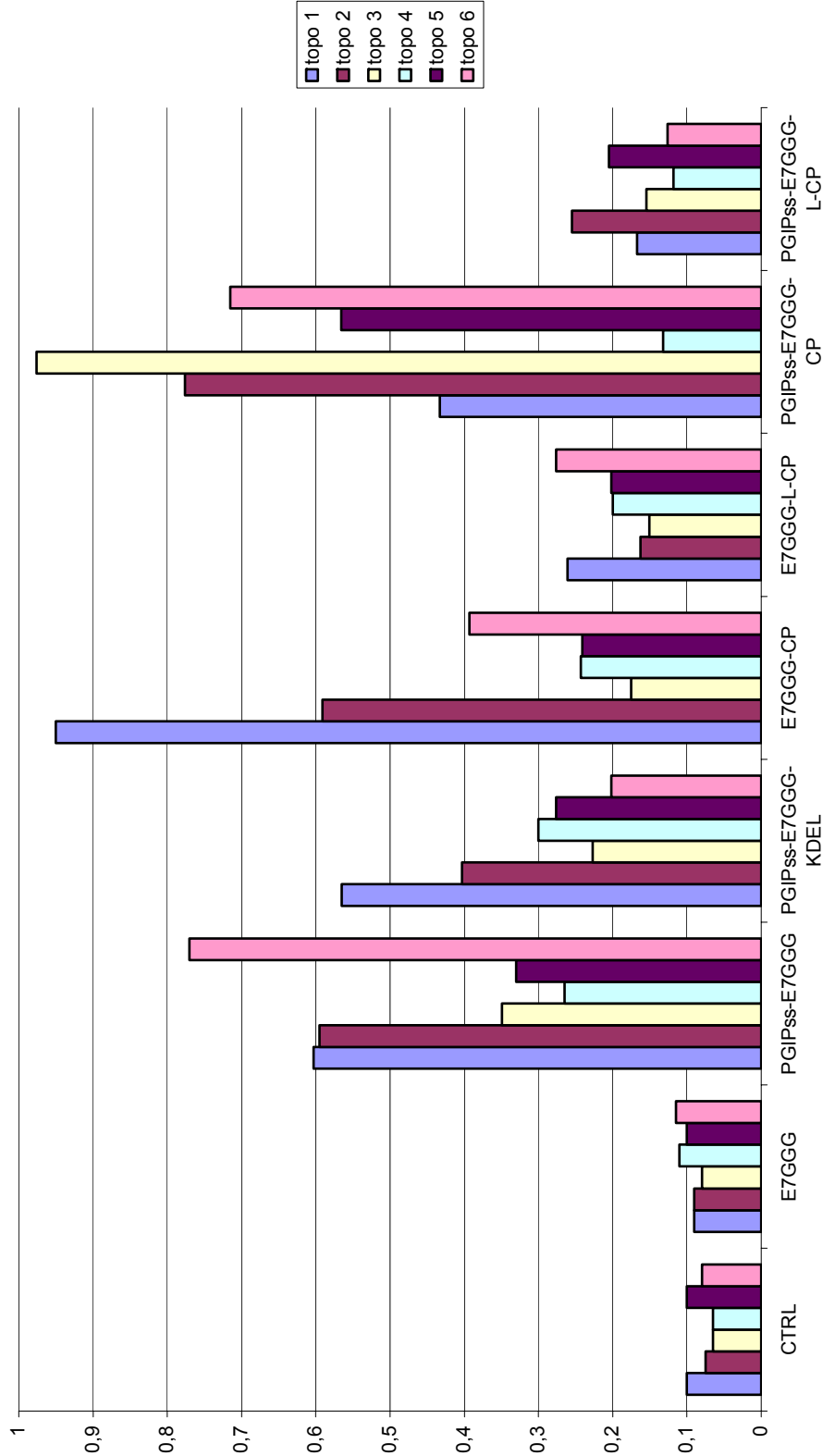


Fig. 65: Valori di densità ottica rilevati in ELISA riguardanti la determinazione delle IgG totali circolanti nei sieri dei topi immunizzati con tutti i plasmidi in un esperimento indicativo dei tre ripetuti.

4.5.4 Analisi delle risposte cellulo-mediate E7-specifiche nei topi immunizzati

E' stata valutata l'induzione di cloni linfocitari E7-specifici in seguito alla vaccinazione con le preparazioni descritte. In particolare, è stato valutato il numero di linfociti splenici produttori $IFN\gamma$ in risposta all'Aptene specifico. Ci si è serviti, in proposito, della descritta tecnica dell'ELISPOT.

4.5.4.1 Induzione di cloni linfocitari E7-specifici in seguito ad immunizzazione con i plasmidi pcDNA3/E7GGG, pcDNA3/E7GGG-CP e pcDNA3/E7GGG-linker-CP

L'immunizzazione con pE7GGG è in grado di indurre linfociti T di tipo $CD4^+$ e $CD8^+$ E7-specifici.

La fusione di E7 con CP determina un incremento della popolazione linfocitaria T E7-specifica stimolata dall'immunizzazione a DNA rispetto al plasmide pE7GGG in seguito al "challenge" con cellule tumorali, sebbene i topi vaccinati con il plasmide pcDNA3/E7GGG-CP mostrino di riuscire ad elicitare una risposta più consistente rispetto a quella dei topi vaccinati con E7GGG-Linker-CP (Fig. 66).

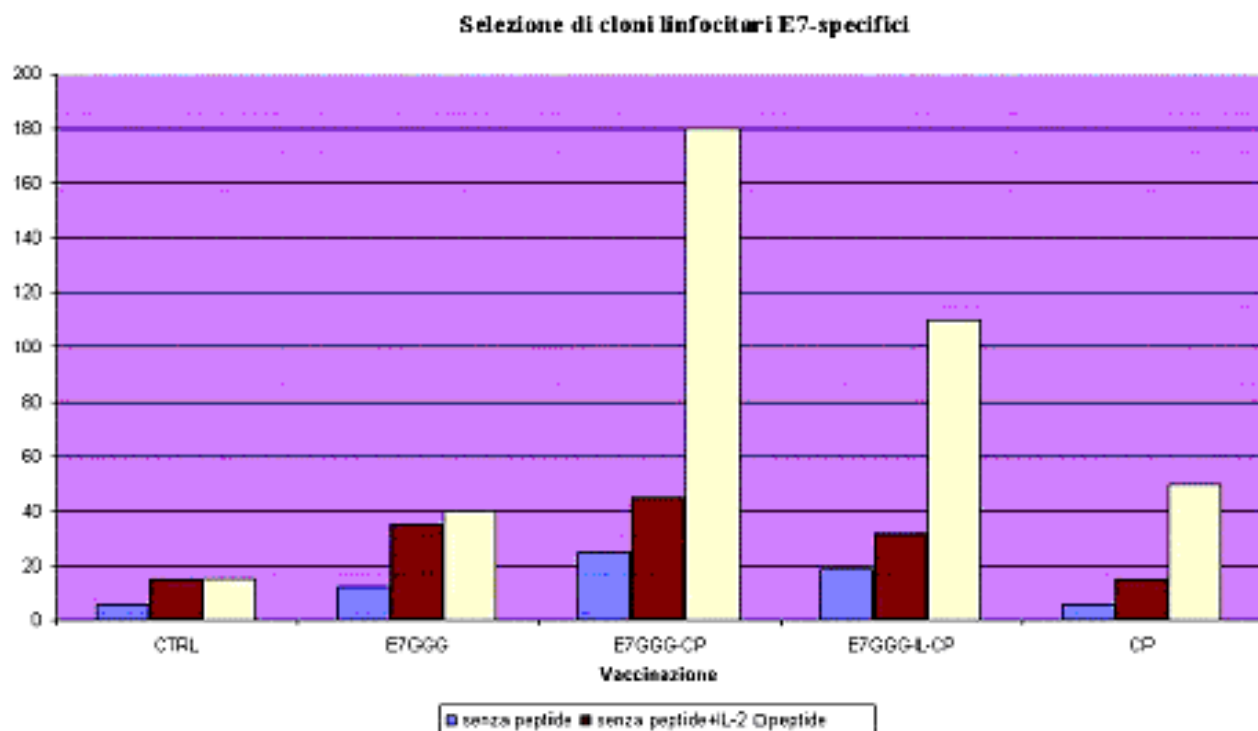


Fig. 66: ELISPOT relativo agli splenociti isolati dai topi immunizzati con i plasmidi pcDNA3/E7GGG, pcDNA3/E7GGG-CP, pcDNA3/E7GGG-L-CP e pcDNA3/CP stimolati o meno dal peptide E7-specifico (aminoacidi 49-57). In ordinata è espresso il numero degli spot/ $1 \cdot 10^6$ splenociti.

4.5.4.2 Induzione di cloni CTL E7-specifici in seguito ad immunizzazione con i plasmidi pPGIPss-E7GGG e pPGIPss-E7GGG-KDEL.

Il plasmide pPGIPss-E7GGG è in grado di determinare una maggior stimolazione di popolazioni linfocitarie T E7-specifiche rispetto a pE7GGG ma meno della fusione di E7 con CP. Il plasmide pPGIPss-E7GGG-KDEL determina sostanzialmente lo stesso tipo e livello di stimolazione linfocitaria del plasmide pE7GGG (Fig. 67).

Selezione di cloni linfocitari E7-specifici

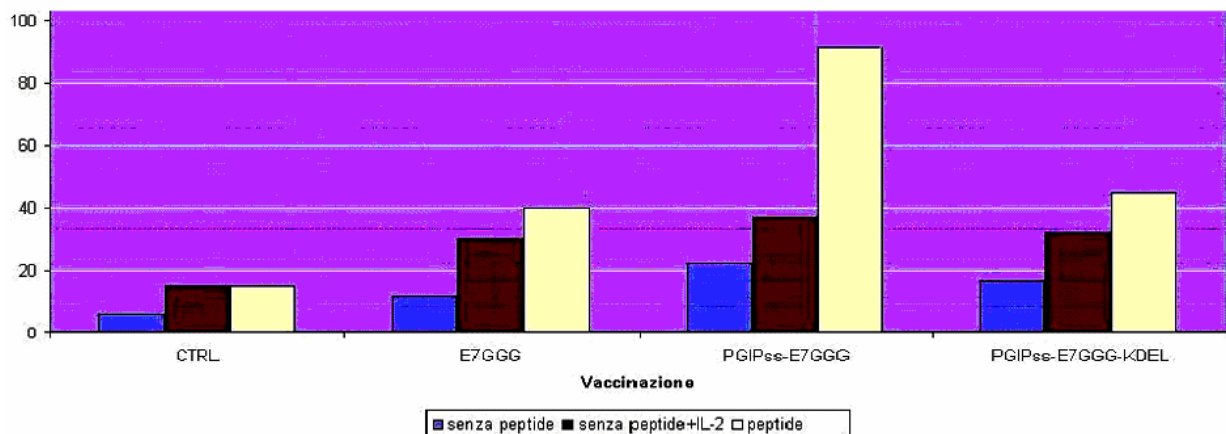


Fig. 67: ELISPOT relativo agli splenociti isolati dai topi immunizzati con i plasmidi *pcDNA3/E7GGG*, *pcDNA3/PGIPss-E7GGG*, *pcDNA3/PGIPss-E7GGG-KDEL* stimolati o meno dal peptide E7-specifico (aminoacidi 49-57). In ordinata è espresso il numero degli spot/ $1 \cdot 10^6$ splenociti.

4.5.4.3 Induzione di cloni CTL E7-specifici in seguito ad immunizzazione con i plasmidi pPGIPss-E7GGG-CP, e pPGIPss-E7GGG-linker-CP.

I plasmidi pPGIPss-E7GGG-CP, e pPGIPss-E7GGG-linker-CP sono in grado di indurre linfociti T E7-specifici sia di tipo CD4+ che CD8+ (pPGIPss-E7GGG-CP più di pPGIPss-E7GGG-linker-CP) con un incremento rispetto a pE7GGG e pPGIPss-E7GGG-KDEL ma meno della fusione di E7 con CP e di pPGIPss-E7GGG (Fig. 68).

Selezione di cloni linfocitari E7-specifici

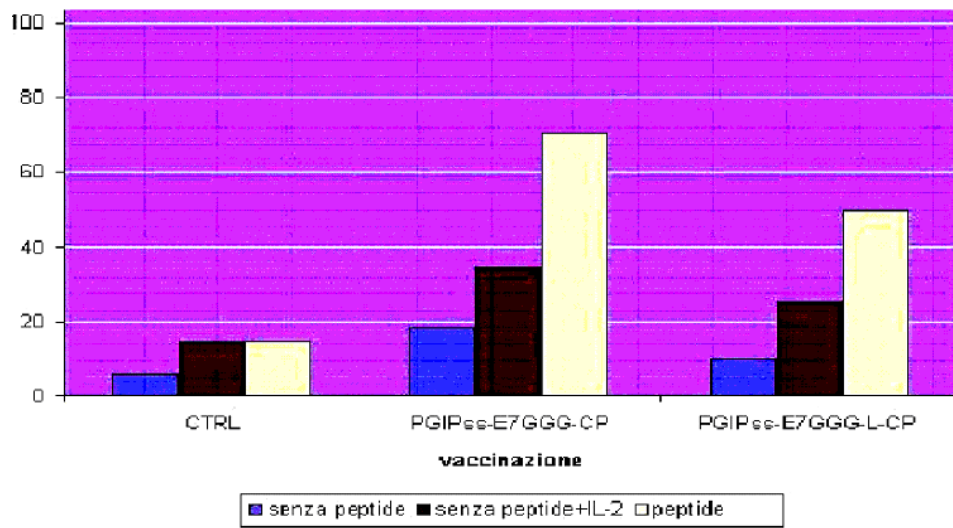


Fig. 68: ELISPOT relativo agli splenociti isolati dai topi immunizzati con i plasmidi, *pcDNA3/PGIP_{ss}-E7GGG-CP*, *pcDNA3/PGIP_{ss}-E7GGG-L-CP* stimolati o meno dal peptide E7-specifico (aminoacidi 49-57). In ordinata è espresso il numero degli spot/ $1 \cdot 10^6$ splenociti.

B) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO VEGETALE BASATO SULLA PROTEINA E7 DI HPV16 ESPRESSA IN *Nicotiana benthamiana* MEDIANTE PVX

Come già discusso, l'espressione transiente di proteine eterologhe in pianta rappresenta un sistema molto efficace per la produzione e per la somministrazione di proteine a valore farmaceutico.

Abbiamo già espresso la proteina E7 di HPV16 in *Nicotiana benthamiana* utilizzando un vettore per l'espressione transiente basato su PVX e dimostrato il conferimento di protezione contro lo sviluppo del tumore attraverso una risposta immunitaria sia anticorpale che cellulomediata in un modello preclinico con la somministrazione per via sottocutanea della proteina E7 come estratto crudo di pianta (Franconi *et al.*, 2002). In questo modo è stata convalidata l'ipotesi dell'espressione in pianta della proteina E7 come sistema strategico potenzialmente applicabile in campo industriale per la produzione a basso costo di un vaccino alternativo a meno di ulteriori miglioramenti.

Allo scopo di aumentare la resa di produzione in pianta della proteina E7 di HPV16 rispetto alle nostre precedenti esperienze, e quindi per ridurre il numero di immunizzazioni ed aumentare il contenuto di proteina E7/dose di vaccino, si è proceduto al "targeting" di tale proteina nella via secretoria di *Nicotiana benthamiana* mediante la realizzazione di una fusione del gene E7 con il segnale di secrezione PGIPss ed alla realizzazione di un costrutto di ritenzione nel reticolo endoplasmico mediante l'aggiunta della sequenza KDEL all'estremità C-terminale dello stesso gene.

4.6 PRODUZIONE DELLA PROTEINA E7 DI HPV16 ATTRAVERSO LA VIA SECRETORIA DI *Nicotiana benthamiana*

4.6.1 Preparazione del costrutto secretorio pPVX-PGIPss-E7

Un costrutto secretorio del gene E7 di HPV16 è stato ottenuto attraverso la fusione della sequenza segnale PGIPss di *Phaseolus vulgaris* a monte di tale gene. Il gene di fusione PGIPss-E7 è stato clonato nel vettore pPVX201 a valle del promotore duplicato della CP di PVX (CPP) che permette l'espressione di proteine in forma solubile (*Fig. 69*).

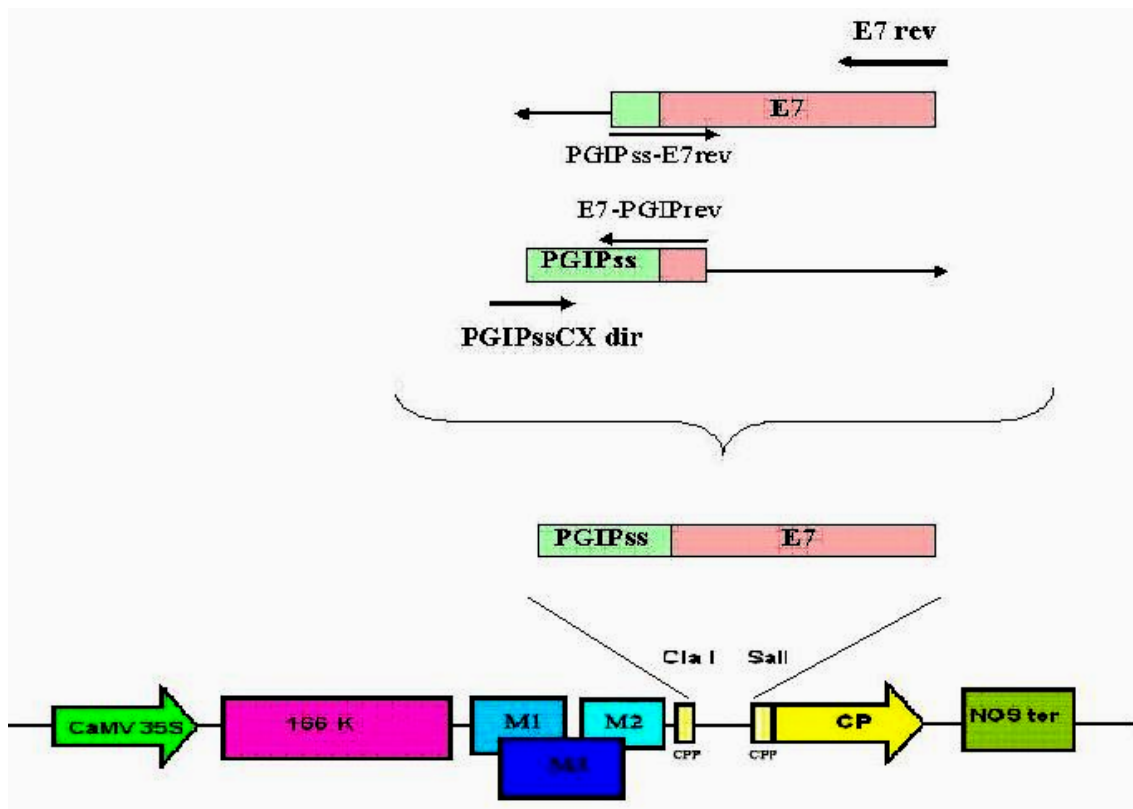


Fig. 69: Amplificazione con gli opportuni oligonucleotidi delle sequenze PGIPss ed E7 in vista dell'assemblaggio per la generazione delle sequenze PGIPss-E7, e clonaggio del gene di fusione ottenuto nel vettore pPVX201 sotto il controllo del promotore duplicato della CP virale (CPP).

Il vettore ricombinante così ottenuto è stato utilizzato direttamente per l'infezione meccanica di foglie di piante di *Nicotiana benthamiana* sfruttando il promotore 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV 35S) che permette la trascrizione del genoma virale infettivo ad RNA.

Sintomi locali e sistemici sono stati osservati, rispettivamente, a 5 ed a 10 giorni dall'infezione con il vettore ricombinante.

4.6.2 Separazione delle proteine solubili totali ed "immunoblotting" degli estratti crudi di *N. benthamiana* e dei fluidi intercellulari

L'espressione della proteina è stata verificata nelle foglie sistemiche mediante "immunoblotting" che ha dimostrato come l'espressione della proteina E7 sia associata ai sintomi dell'infezione da PVX (Fig. 70).

Gli estratti *Nb-PVX-PGIPss-E7* ed *Nb-PVX-E7* ottenuti da piante di *Nicotiana benthamiana* infettate con il plasmide pPVX-PGIPss-E7, mostrano una banda corrispondente alla proteina E7 così come un caratteristico "pattern" di bande ad alto peso molecolare. Tale "pattern" è

resistente al trattamento con SDS ed alla bollitura cui sono sottoposti i campioni prima di essere separati su SDS-PAGE così come già riportato per l'espressione citoplasmatica della proteina E7 di HPV16 mediante PVX (Franconi *et al.*, 2002).

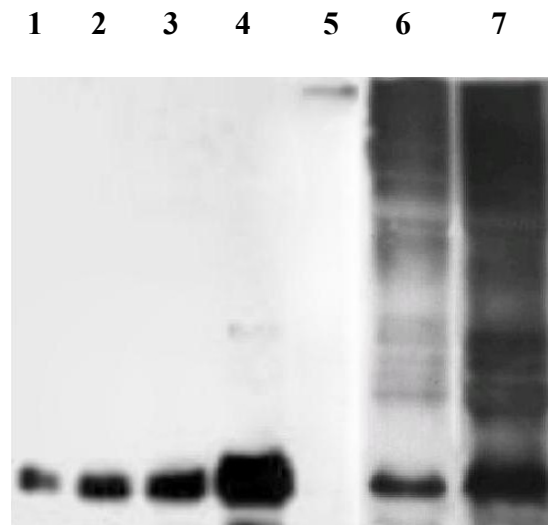


Fig. 70: "Immunoblotting" relativo agli estratti di piante *N. benthamiana* infettate con i costrutti *Nb-PVXwt*, *Nb-PVXE7*, *Nb-PVXPGIPss-E7*

- 1 - 4) 15, 30, 45, 65 ng His₆E7 *E. coli*
- 5) 20 µg TSP *Nb-PVXwt*
- 6) 20 µg TSP *Nb-PVXE7*
- 7) 20 µg TSP *Nb-PVXPGIPss-E7*

L'intensità del segnale relativo agli estratti *Nb-PVX-PGIPss-E7* è maggiore di quella relativa agli estratti *Nb-PVX-E7* (a parità di TSP caricate) a testimonianza di un incremento dei livelli di espressione della proteina pari a circa cinque volte, come quantificato mediante ELISA quantitativo (dati non mostrati).

Dalle quantificazioni effettuate, è risultata una concentrazione di proteina E7 espressa tramite il costrutto secretorio pPVX-PGIPss-E7 pari a circa 15 µg/g di tessuto infetto.

Anche l'analisi dei fluidi intercellulari estratti dalle foglie di *Nicotiana benthamiana* infettate con il costrutto secretorio pPVX-PGIPss-E7 ha mostrato una banda corrispondente alla proteina E7 ed un "pattern" di bande a più alto peso molecolare (Fig. 71).

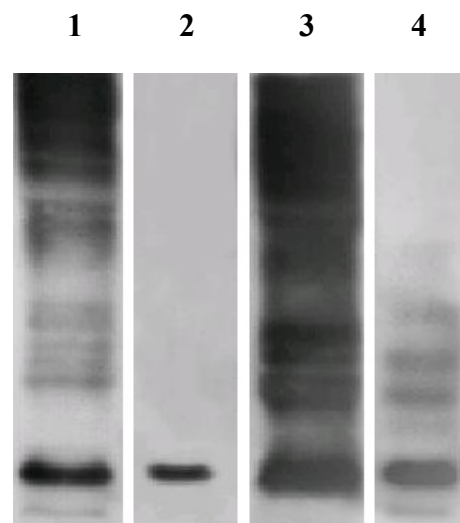


Fig. 71: "Immunoblotting" relativo all'estrazione dei fluidi intercellulari da piante di *N. benthamiana* infettate con il *Nb-PVXPGIPss-E7*

- 1) 10 µl TSP *Nb-PVXE7*
- 2) 30 ng His₆E7 *E. coli*
- 3) 10 µl TSP *Nb-PVXPGIPss-E7*
- 4) 10 µl fluidi intercellulari estratti da foglie sistemiche infettate con pPVX-PGIPss-E7

In generale, si assume che le proteine espresse in varietà da foglia tendano ad essere instabili. A tale scopo abbiamo verificato la stabilità della proteina E7 prodotta con questo sistema

dopo conservazione a lungo termine mediante “immunoblotting”. La proteina E7 si è dimostrata molto stabile in foglie infettate liofilizzate sia a 4°C sia a R.T. per almeno un anno (dati non mostrati).

4.6.3 Immunizzazione in modello pre-clinico con estratti di pianta e sfida con cellule tumorali

4.6.3.1 Il vaccino derivato da pianta contenente E7 induce una risposta immune cellulo mediata e protegge i topi da sfida con cellule tumorali esprimenti la proteina E7 di HPV16

Gruppi di 8 topi sono stati immunizzati con le differenti preparazioni vaccinali derivate da pianta oppure con la proteina His₆-E7 purificata (10 µg) in combinazione con l'adiuvante Quil-A, oppure con soluzione salina (gruppo di controllo).

Gli animali vaccinati hanno ricevuto 5 inoculi sub-cutanei dei differenti vaccini al giorno 0, 15, 30, 45 e 60. Dieci giorni dopo l'ultimo inoculo, i topi sono stati sfidati con una dose tumorigenica di cellule C3 esprimenti la proteina E7. Lo sviluppo tumorale al sito dell'inoculo è stato monitorato mediante palpazione. Dopo 50 giorni di osservazione, i topi di controllo avevano sviluppato tumori di grosse dimensioni che impedivano la deambulazione e per questo motivo l'osservazione è stata interrotta e tutti gli animali sono stati sacrificati.

I topi vaccinati con soluzione salina o con gli estratti di foglie infettate con il vettore PVX ‘wild type’, hanno sviluppato il tumore entro i primi 14 giorni dalla sfida con le cellule C3. Al contrario, tutti i topi vaccinati con le preparazioni contenenti E7 hanno mostrato un marcato ritardo nella comparsa della formazione neoplastica (*Fig. 72*).

Al termine dell'esperimento, l'80% dei topi vaccinati con gli estratti *Nb-PVX-PGIP_{ss}-E7* ed il 40% degli animali vaccinati con gli estratti *Nb-PVX-E7* non avevano sviluppato tumore (*Fig. 72*). Quest'ultimo dato conferma quanto precedentemente riportato (Franconi *et al.*, 2002)

La protezione dal tumore ottenuta immunizzando gli animali con la proteina His₆E7 ricombinante somministrata in combinazione con l'adiuvante QuilA è stata del 100%.

Bisogna, d'altra parte, ricordare che la quantità di proteina contenuta in quest'ultimo tipo di preparazione (10 µg) è circa quattro volte maggiore di quella contenuta nell'estratto *Nb-PVX-PGIP_{ss}-E7*. Infatti, essendo stati immunizzati i topi con un volume pari a 500 µl di estratto *Nb-PVX-PGIP_{ss}-E7* (corrispondente a circa 0.15 g di tessuto esprime E7 alla concentrazione di 15 µg/g), la quantità di proteina contenuta nella dose di vaccino inoculata è stata pari a circa 2.5 µg.

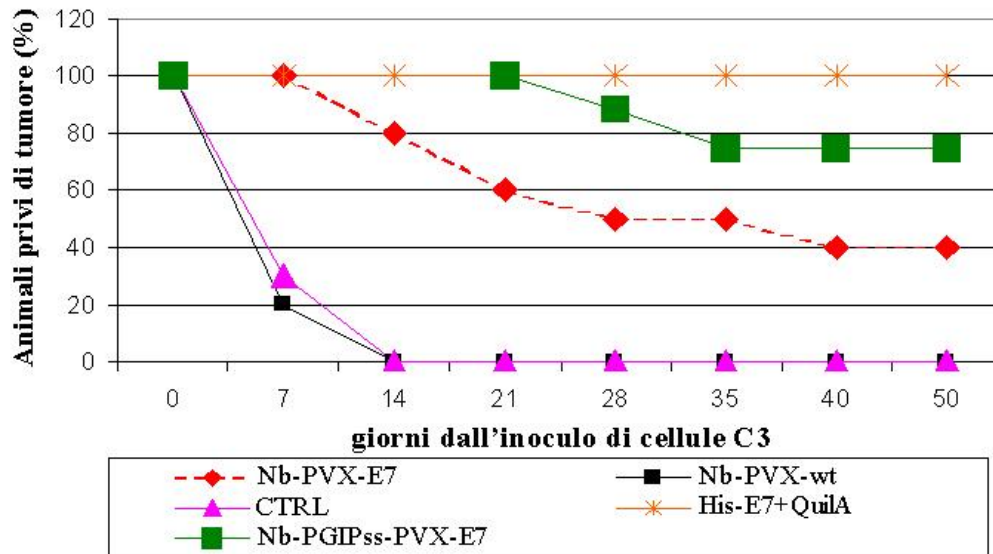


Fig. 72: Protezione dai tumori indotti dalle cellule C3 negli animali immunizzati

I tumori sviluppati dai topi nonostante la vaccinazione con l'estratto *Nb-PVX-PGIPss-E7* si sono rivelati di taglia notevolmente inferiore rispetto a quelli rinvenuti nei topi vaccinati con l'estratto the *Nb-PVX-wt* (meno di 1/3 del peso) (Fig. 73).

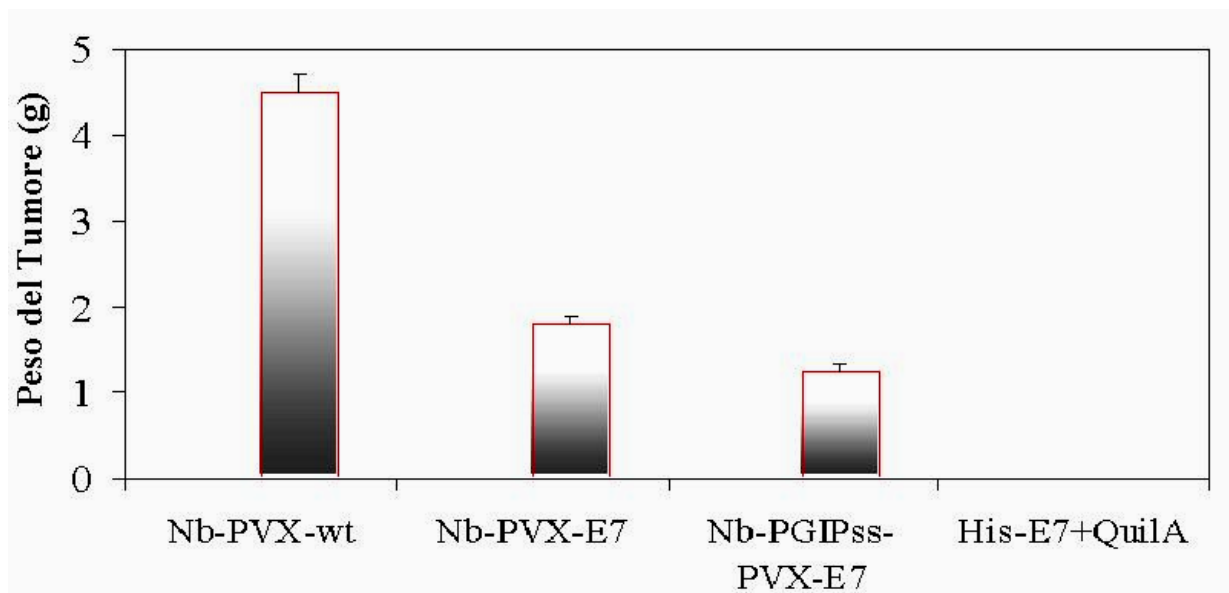


Fig. 73: Peso dei tumori sviluppati animali immunizzati

In particolare, per quanto riguarda il controllo della crescita tumorale (quando questa si realizza) la vaccinazione con l'estratto *Nb-PVX-PGIPss-E7* sembra essere più efficace di quella basata sull'estratto *Nb-PVX-E7*.

Risultati simili sono stati ottenuti da due esperimenti indipendenti condotti con lo stesso numero di animali per gruppo.

4.6.3.2 ELISPOT per la valutazione della selezione di cloni linfocitari secernenti IFN- γ : sviluppo di risposte antigene-specifiche nei topi immunizzati

E' ormai generalmente accettata l'importanza del ruolo della risposta immune cellulo-mediata nel controllo della tumorigenesi. Per questo motivo, l'induzione di questo tipo di risposta a seguito dell'immunizzazione con gli estratti di *Nicotiana benthamiana* è stata ricercata nei topi immunizzati mediante la tecnica dell'ELISPOT.

Gli splenociti sono stati isolati sia dai controlli sia dai topi immunizzati che avevano sviluppato i tumori oppure no, al termine del periodo di osservazione. Dopo stimolazione con l'epitopo CTL E7-specifico, le cellule secernenti IFN- γ sono state visualizzate come spot in microscopia ottica per mezzo di un anticorpo monoclonale anti- IFN- γ (Fig. 74).

Livelli molto alti di cellule secernenti IFN- γ sono stati individuati nei topi che non avevano sviluppato tumori dopo la vaccinazione con gli estratti di pianta contenenti E7, mentre nei topi vaccinati che avevano comunque sviluppato un tumore, i livelli erano di poco superiori ai controlli. In particolare, i topi che non avevano sviluppato tumore dopo immunizzazione con gli estratti *Nb-PVX-PGIPss-E7* hanno mostrato livelli di risposta più importanti degli animali vaccinati con gli estratti *Nb-PVX-E7*.

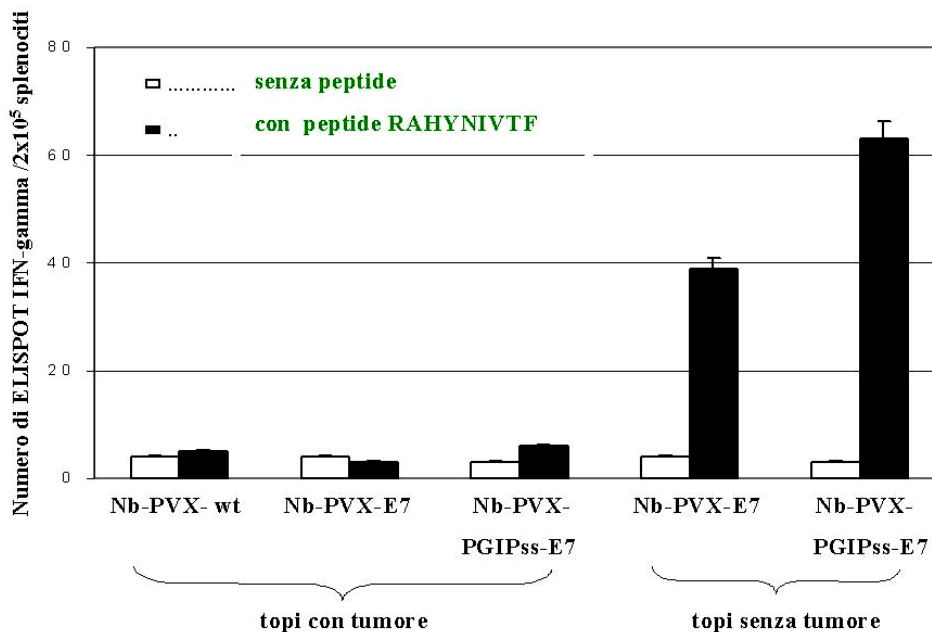


Fig. 74: Analisi ELISPOT effettuata sugli splenociti isolati dagli animali vaccinati stimolati o meno dall'epitopo E7-specifico (aa 49-57)

Questa correlazione tra l'impedimento allo sviluppo del tumore e la risposta di tipo Th1 indotta dalla vaccinazione, ha confermato l'importanza della risposta immune cellulo-mediata nel contrastare lo sviluppo tumorale.

4.7 COSTRUTTI pPVX-PGIPss-E7-KDEL, pPVX-His₆E7, pPVX-His₆E7-KDEL E pPVX-E7GGG

4.7.1 Preparazione dei costrutti

La sequenza di ritenzione nel reticolo endoplasmatico KDEL è stata fusa all'estremità 3' del gene E7 attraverso l'impiego del primer inverso per l'amplificazione *KDEL-E7 for* a partire dal template pQE30-E7:

Con l'impiego del primer *PGIPssE7-dir*, invece, sono stati aggiunti al gene E7 i nucleotidi a valle della sequenza PGIPss necessari per l'assemblaggio con quest'ultima.

Il template ed i primer utilizzati per l'amplificazione della sequenza PGIPss ai fini dell'assemblaggio con il gene E7 provvisto di sequenza KDEL, sono gli stessi già descritti per la realizzazione del costrutto pPVX-PGIPss-E7

Inoltre, per semplificare le procedure di purificazione (qualora questa si rendesse necessaria per lo sviluppo del vaccino in alternativa alla somministrazione dell'estratto crudo di foglia), è stata prodotta una proteina E7 provvista di un "tag" di poli-istidine all'estremità N-terminale utile alla purificazione mediante cromatografia per affinità dell'onco-proteina (costrutto pPVX-His₆E7) con o senza la sequenza KDEL al C-terminale (costrutto pPVX-His₆E7-KDEL).

In ambo i casi, il gene E7 è stato amplificato a partire dal template pQE30-E7 con il primer diretto *pQE30 CH His back*. I primer inversi utilizzati sono stati invece, rispettivamente, *E7 rev* e *KDEL-E7 for*, già descritti.

E' stata prodotta anche una versione mutata del costrutto pPVX-E7, che era stato già ottenuto, amplificando il gene E7GGG dal template pQE30-E7GGG con i primer *E7CX dir* ed *E7 rev* ed effettuando il clonaggio nel vettore pPVX 201 tra i siti *Clal* e *Sall*, per ottenere un vaccino più accettabile riguardo alle questioni di sicurezza nell'uso di una oncoproteina non modificata, e auspicabilmente dotato delle stesse o di migliori proprietà immunologiche rispetto al vaccino basato sulla versione 'wild type' già sperimentato (Franconi *et al.*, 2002) (*Fig. 75*).

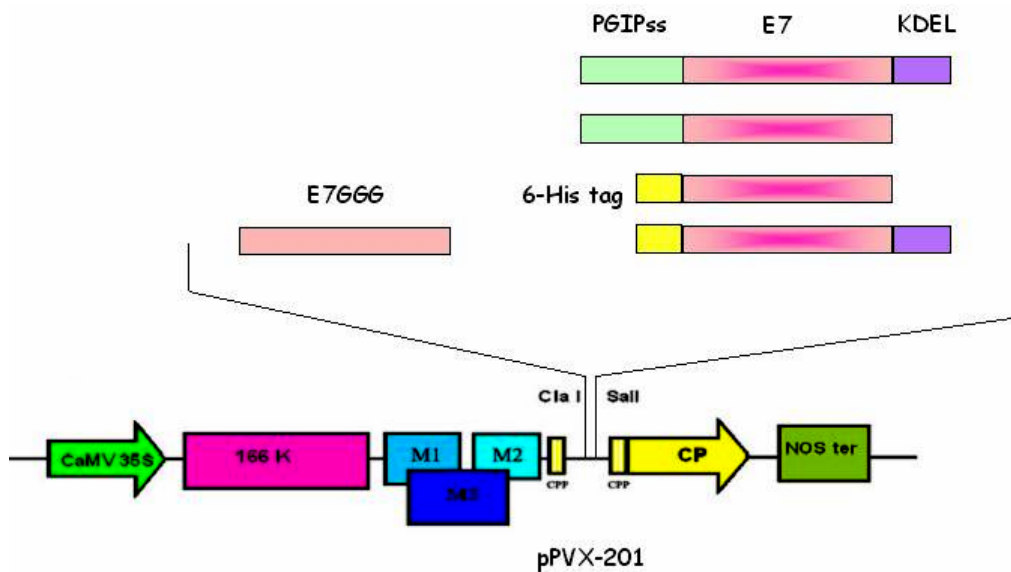


Fig. 75: Rappresentazione schematica dei costrutti ottenuti in pPVX201.

4.7.2 Infezione, preparazione ed analisi degli estratti crudi da piante di *Nicotiana benthamiana*

4.7.2.1 pPVX-E7GGG

Per valutare se la proteina E7GGG fosse stata prodotta ed accumulata nelle piante infettate, sono stati preparati estratti crudi di pianta polverizzando il tessuto fogliare in azoto liquido. Gli estratti sono stati analizzati mediante “immunoblotting” ed ELISA usando un anticorpo contro la proteina His₆-E7 prodotta in *E. coli*.

La proteina E7GGG è stata prodotta dalle piante con l’infezione; infatti gli estratti sono positivi in ELISA ed è stato individuato un prodotto del peso molecolare atteso in immunoblotting. Oltre al segnale corrispondente alla proteina E7GGG, è stata rivelata una serie di bande ulteriori a più alto peso molecolare, così come già osservato nel caso della produzione ectopica della E7 ‘wild type’ (Fig. 76).

4.7.2.2 pPVX-His₆E7

Le piante producono la proteina E7 a seguito dell’infezione: infatti gli estratti sono positivi in ELISA ed è stato individuato un prodotto del peso molecolare atteso. Oltre al segnale corrispondente alla proteina E7, è stata rivelata una serie di bande ulteriori a più alto peso molecolare, così come già osservato nel caso dell’espressione transiente della proteina E7 priva del tag di istidine (Figura 76). A parità di TSP separate, tuttavia, gli estratti ottenuti da

piante infettate con il costrutto pPVX-His₆E7 sembrano contenere meno proteina degli estratti di piante infettate con pPVX-E7GGG.

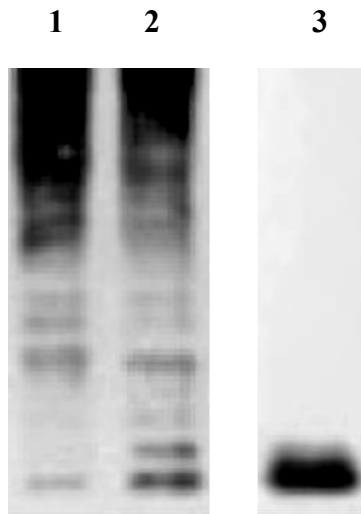


Fig. 76: "Immunoblotting" relativo agli estratti di piante di N. benthamiana infettate con i costrutti pPVXHis₆-E7 e pPVXE7GGG

- 1) 20 µg TSP N. benthamiana pPVXHis₆-E7*
- 2) 20 µg TSP N. benthamiana pPVXE7GGG*
- 3) 40 ng His₆E7 E. coli*

4.7.2.3 pPVX-His₆E7-KDEL E pPVX-PGIPss-E7-KDEL

Le foglie delle piante infettate con il plasmide pPVX-His₆E7-KDEL e con il plasmide pPVX-PGIPss-E7-KDEL hanno sviluppato sintomi leggeri ed atipici di infezione ad una settimana dall'inoculo. Le foglie sistemiche e le foglie inoculate sono state comunque raccolte ed analizzate in ELISA ed immunoblotting senza esito (dati non mostrati).

C) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO VEGETALE BASATO SULLA FUSIONE E7-LICHENASI ESPRESSA IN PIANTE DI *Nicotiana benthamiana* DOPO AGROINFEZIONE (effettuato presso il “Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology”, Newark-DE)

4.8 PREPARAZIONE DEI PLASMIDI RICOMBINANTI BASATI SU PBID4

4.8.1 Amplificazione delle sequenze E7 ed E7GGG per il clonaggio nel vettore intermedio pBlueScriptSK(-) ai fini della fusione nella regione del “loop” del gene della lichenasi B di *Clostridium thermocellum*

La sequenza codificante per la proteina E7 di HPV16 ed il gene mutato E7GGG sono stati fusi alla regione del “loop” (tra i siti *Bgl II* e *Hind III*) del gene lichenasi clonato nel vettore pET-PRACS-Lic-KDEL e pET-PRACS-Lic-VAC (tali vettori erano stati già ottenuti presso il “Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology”).

Per l’amplificazione delle sequenze attese di 371pb, sono stati utilizzati il primer diretto *E7NotBgl dir*, ed il primer inverso *E7Hind rev*.

Il DNA purificato è stato digerito con le endonucleasi *Not I* e *HindIII* e inizialmente clonato nel vettore pBlueScriptSK(-) tra i siti *NotI* e *Hind III* per la selezione mediante alfa-complementazione dei cloni trasformanti di *Escherichia coli* che sono stati analizzati mediante digestione.

I plasmidi intermedi ricombinanti sono stati sequenziati con i primers *E7NotBgl dir* ed *E7Hind rev* per l’analisi delle sequenze (non essendo stata utilizzata *Pfu* polimerasi per l’amplificazione dei geni).

4.8.2 Clonaggio delle sequenze E7 ed E7GGG nei vettori pET-PRACS-lic-KDEL e pET-PRACS-lic-VAC

Le sequenze relative ai geni E7 ed E7GGG sono state excise dal vettore pBluescriptSK(-) a partire da un clone scelto tra quelli risultati positivi dopo digestione e sottoposte a ligazione, nelle condizioni descritte, nei vettori pET-PRACS-lic-KDEL e pET-PRACS-lic-VAC digeriti con gli stessi enzimi. Si è proceduto quindi alla trasformazione dei batteri XL1 blue. I plasmidi ricombinanti ottenuti dai trasformanti (pET-PRACS-lic-E7-KDEL e pET-PRACS-lic-E7VAC, pET-PRACS-lic-E7GGG-KDEL e pET-PRACS-lic-E7GGG-VAC) verificati mediante digestione *Bgl II-Hind III*, sono stati poi impiegati per il clonaggio delle sequenze

PRACS-lich-E7-KDEL e PRACS-lich-E7VAC, PRACS-lich-E7GGG-KDEL e PRACS-lich-E7GGG-VAC nel vettore pBID4 per la successiva agroinfezione.

4.8.3 Clonaggio delle sequenze PRACS-lic-E7-KDEL e PRACS-lic-E7-VAC, PRACS-lic-E7GGG-KDEL e PRACS-lic-E7GGG-VAC nel vettore pBID4

Le sequenze sono state excise dai vettori ricombinanti con le endonucleasi di restrizione *Pac I* ed *Xho I* per il recupero della intera sequenza di fusione per il successivo clonaggio nel vettore pBID4 (digerito nelle stesse condizioni) mediante reazione di ligazione. Si è proceduto quindi alla trasformazione dei batteri XL-1 blue che sono stati piastrati su LB/Kan e verificati mediante digestione.

4.9 ANALISI DEGLI ESTRATTI DI FOGLIE INFILTRATE DI *Nicotiana benthamiana*

4.9.1 Preparazione degli estratti di foglia ed analisi mediante “immunoblotting”

Piante di *Nicotiana benthamiana* sono state infiltrate sotto vuoto o manualmente con colture di *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 o *Agrobacterium rhizogenes* A4 trasformate con i plasmidi pBID4-Lic-E7-KDEL, pBID4-Lic-E7GGG-KDEL, pBID4-Lic-E7-VAC e pBID4-Lic-E7GGG-VAC.

Alla comparsa dei sintomi dell'infezione (dopo circa 4 giorni) e sino a 7 giorni dall'infiltrazione, i campioni di foglie infiltrate sono stati collezionati ed analizzati per la valutazione dell'espressione.

L'espressione della proteina E7 è stata inizialmente verificata nelle foglie infiltrate a quattro giorni dall'agro-infiltrazione mediante “immunoblotting”, sviluppato con ambo gli anticorpi primari pAb α -lichenasi (Fig. 77) e pAb α -His₆E7 (Fig. 78) seguiti da incubazione con gli anticorpi secondari dell'appropriata specificità. Tale analisi ha dimostrato come l'espressione della proteina sia associata ai sintomi dell'infezione da *Agrobacterium*.

Gli estratti ottenuti da piante di *Nicotiana benthamiana* infiltrate con le colture di *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* trasformati con i plasmidi pBID4-Lic-E7-KDEL mostrano una banda cospicua corrispondente alla fusione della proteina E7 con la lichenasi B (circa 35-38 kDa).

Il valore di ≤ 40 kDa corrisponde effettivamente al pM atteso per il prodotto di fusione completo Lic-E7-KDEL, considerando che la proteina E7 esibisca una mobilità elettroforetica corrispondente al proprio pM teorico di 11 kDa (anziché a quello di circa 21), poiché il pM della lichenasi B corrisponde a 21-24 kDa (Fig. 77, 78, 79, 80).

L'analisi degli estratti di *Nicotiana benthamiana* infiltrate con le colture di *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* trasformati con i plasmidi pBID4-Lic-E7-VAC rivela che le piante, a seguito dell'infiltrazione, esprimono la relativa fusione. I segnali, tuttavia, risultano sdoppiati in due bande distinte che potrebbero rappresentare la forma correttamente processata della fusione per la ritenzione nel vacuolo e la forma non processata ancora provvista di sequenza segnale (Fig. 77, 78, 79, 80).

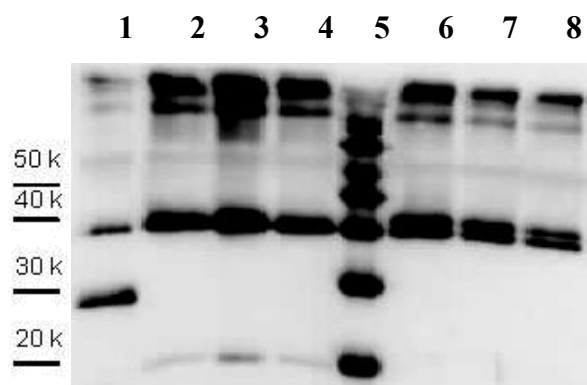


Fig. 77 (pAb α -lichenasi):

(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)

- 1) Lichenasi 30ng
- 2) pBID4-Lic-E7-KDEL (pianta 1)
- 3) pBID4-Lic-E7-KDEL (pianta 2)
- 4) pBID4-Lic-E7-KDEL (pianta 3)
- 5) Marker
- 6) pBID4-Lic-E7-VAC (pianta 1)
- 7) pBID4-Lic-E7-VAC (pianta 2)
- 8) pBID4-Lic-E7-VAC (pianta 3)

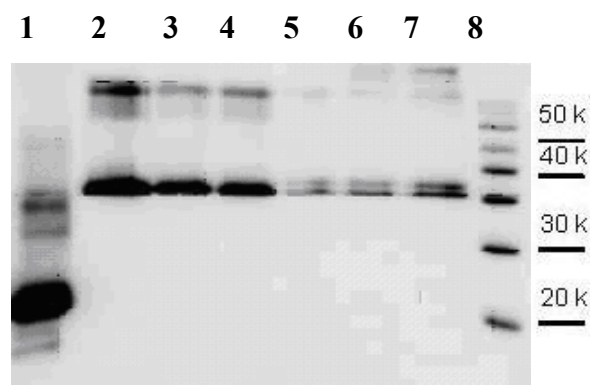


Fig. 78 (pAb α -His₆E7):

(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)

- 1) His₆E7 60ng
- 2) pBID4-Lic-E7-KDEL (pianta 1)
- 3) pBID4-Lic-E7-KDEL (pianta 2)
- 4) pBID4-Lic-E7-KDEL (pianta 3)
- 5) pBID4-Lic-E7-VAC (pianta 1)
- 6) pBID4-Lic-E7-VAC (pianta 2)
- 7) pBID4-Lic-E7-VAC (pianta 3)
- 8) Marker

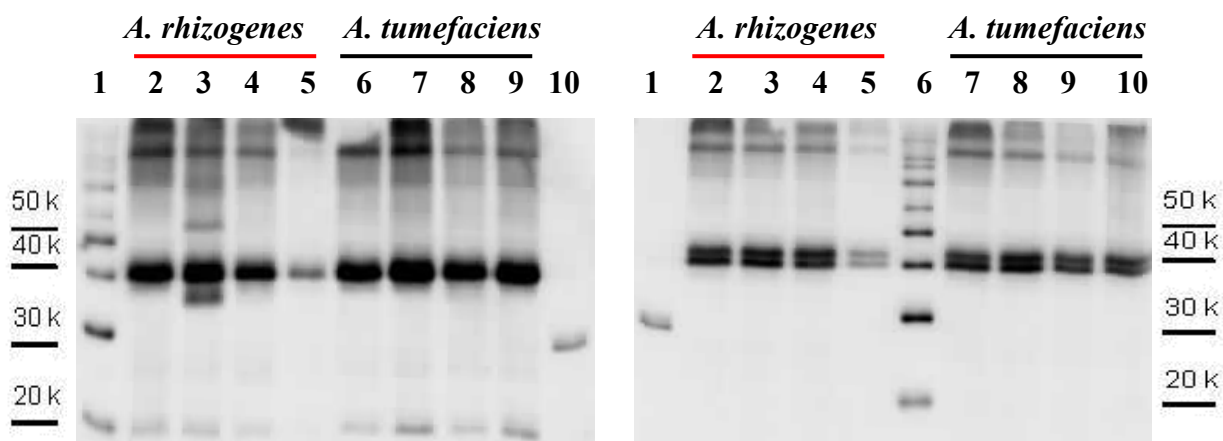


Fig. 79:

- 1) Marker
- 2) pBID4-Lic-E7-KDEL (4 giorni)
- 3) pBID4-Lic-E7-KDEL (5 giorni)
- 4) pBID4-Lic-E7-KDEL (6 giorni)
- 5) pBID4-Lic-E7-KDEL (7 giorni)
- 6) pBID4-Lic-E7-KDEL (4 giorni)
- 7) pBID4-Lic-E7-KDEL (5 giorni)
- 8) pBID4-Lic-E7-KDEL (6 giorni)
- 9) pBID4-Lic-E7-KDEL (7 giorni)
- 10) Lichenasi 30 ng

Fig. 80:

- 1) Lichenasi 30 ng
- 2) pBID4-Lic-E7-VAC (4 giorni)
- 3) pBID4-Lic-E7-VAC (5 giorni)
- 4) pBID4-Lic-E7-VAC (6 giorni)
- 5) pBID4-Lic-E7-VAC (7 giorni)
- 6) Marker
- 7) pBID4-Lic-E7-VAC (4 giorni)
- 8) pBID4-Lic-E7-VAC (5 giorni)
- 9) pBID4-Lic-E7-VAC (6 giorni)
- 10) pBID4-Lic-E7-VAC (7 giorni)

Per ambo i ceppi di *Agrobacterium*, il costrutto che esprime un maggior livello di prodotto si è rivelato essere quello codificante per le fusioni provviste del segnale KDEL, che è stato scelto, quindi, ai fini della produzione massiva di tessuto esprime la fusione di E7 (ed E7GGG) con la lichenasi.

Sia l'espressione della fusione E7-Lic-KDEL, sia della fusione E7-Lic-VAC si mantiene piuttosto stabile dal quarto al settimo giorno dall'infezione, senza variazioni di rilievo nel livello di espressione che si mantiene costantemente elevato (sebbene sembra aumentare leggermente in corrispondenza del quinto giorno). Fa eccezione l'espressione indotta dall'agro-infezione con il ceppo di *Agrobacterium rhizogenes*, che diminuisce drammaticamente dal sesto al settimo giorno. Si è deciso, quindi, di procedere al campionamento in corrispondenza del quinto giorno dall'infiltrazione in assenza di degradazione della fusione. Tali risultati, ottenuti inizialmente per le fusioni con la proteina E7, si sono ripetuti anche per le fusioni con la proteina E7GGG (Fig. 81, 82)

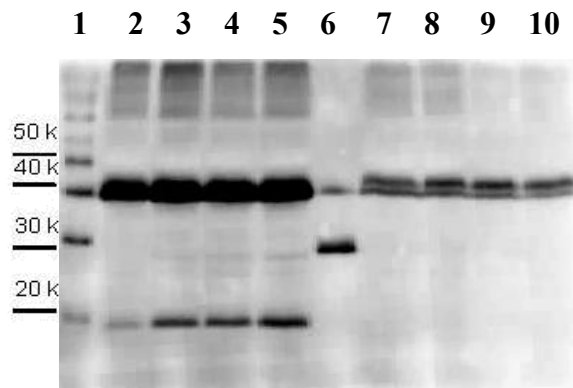


Fig. 81:
(Agrobacterium tumefaciens GV3101)
 1) Marker
 2) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL (giorno 4)
 3) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL (giorno 5)
 4) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL (giorno 6)
 5) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL (giorno 7)
 6) Lichenasi 30 ng
 7) pBID4-Lic-E7GGG-VAC (giorno 4)
 8) pBID4-Lic-E7GGG-VAC (giorno 5)
 9) pBID4-Lic-E7GGG-VAC (giorno 6)
 10) pBID4-Lic-E7GGG-VAC (giorno 7)

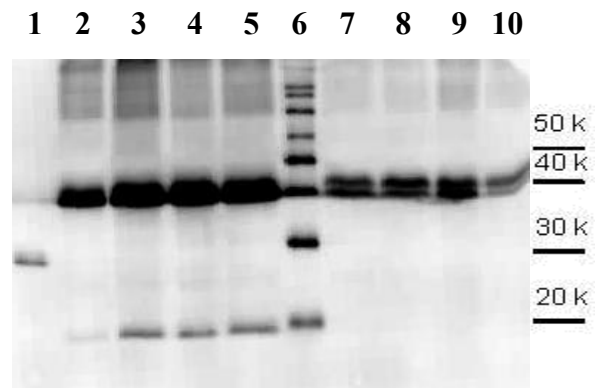


Fig. 82:
(Agrobacterium tumefaciens GV3101)
 1) Lichenasi 30 ng
 2) pBID4-Lic-E7-KDEL (giorno 4)
 3) pBID4-Lic-E7-KDEL (giorno 5)
 4) pBID4-Lic-E7-KDEL (giorno 6)
 5) pBID4-Lic-E7-KDEL (giorno 7)
 6) Marker
 7) pBID4-Lic-E7- VAC (giorno 4)
 8) pBID4-Lic-E7- VAC (giorno 5)
 9) pBID4-Lic-E7-VAC (giorno 6)
 10) pBID4-Lic-E7-VAC (giorno 7)

La quantificazione delle fusioni Lic-E7-KDEL e Lic-E7GGG-KDEL espresse negli estratti vegetali è stata effettuata mediante “immunoblotting” sia sui tessuti infiltrati manualmente sia su quelli infiltrati con l’applicazione del vuoto (Fig. 83, 84).

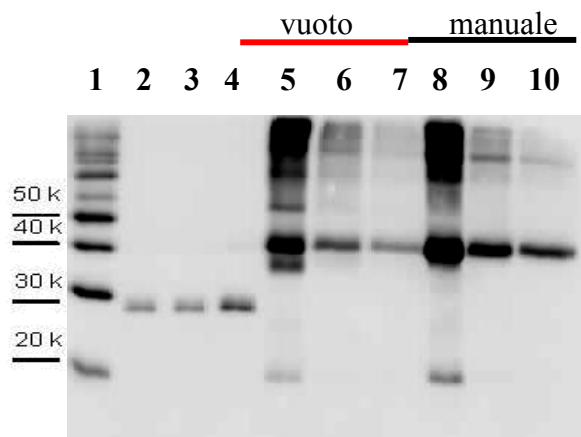


Fig. 83:
 1) Marker
 2) Lichenasi 10 ng
 3) Lichenasi 25 ng
 4) Lichenasi 50ng
 5) pBID4-Lic-E7-KDEL (1µl estratto)
 6) pBID4-Lic-E7-KDEL(1:250)
 7) pBID4-Lic-E7-KDEL(1:500)

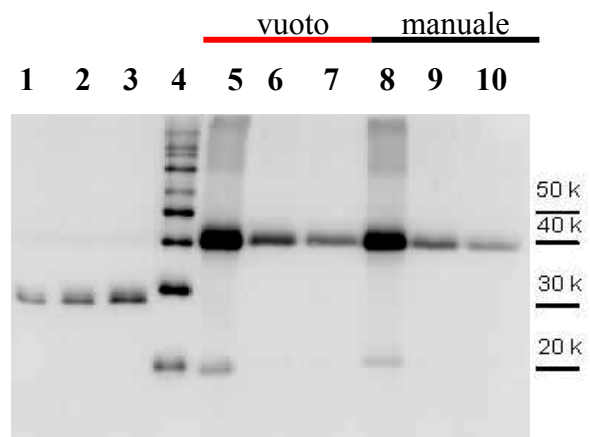


Fig. 84:
 1) Lichenasi 10 ng
 2) Lichenasi 25 ng
 3) Lichenasi 50 ng
 4) Marker
 5) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL(1µl estratto)
 6) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL(1:250)
 7) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL(1:500)

8) *pBID4-Lic-E7-KDEL* (1µl di estratto)
9) *pBID4-Lic-E7-KDEL*(1:250)
10) *pBID4-Lic-E7-KDEL*(1:500)

8) *pBID4-Lic-E7GGG-KDEL*(1µl estratto)
9) *pBID4-Lic-E7GGG-KDEL*(1:250)
10) *pBID4-Lic-E7GGG-KDEL*(1:500)

La stima dei livelli di espressione si attesta intorno ai 400 µg di proteina di fusione Lic-E7-KDEL Lic-E7GGG-KDEL /g di tessuto (corrispondenti a 100 µg di proteina E7 od E7GGG/g di tessuto).

4.9.2 Rivelazione dell'attività lichenasica nelle fusioni mediante Zimogramma

Parallelamente all'immunoblotting, i campioni relativi agli estratti di pianta infiltrati sono stati analizzati per la rivelazione dell'espressione delle proteine di fusione attraverso il metodo dello zimogramma, mediante separazione su gel di poliacrilammide al 12% in presenza di lichenano come substrato.

Tale tecnica, utilizzata per la rivelazione dell'attività della lichenasi B nelle fusioni progettate, ha dimostrato come l'espressione di entrambe le proteine E7 ed E7GGG sia associata ad attività lichenasica e come la fusione delle proteine E7 od E7GGG nel "loop" presente a livello del dominio catalitico non inattivi l'enzima (Fig. 85, 86, 87, 88). Questo risulta di particolare rilievo in quanto dimostra che la selezione clonale di radici esprimenti le proteine E7 od E7GGG potrà essere analizzata attraverso la valutazione di tale attività enzimatica e, dunque, consente l'impiego della lichenasi come "reporter" traduzionale. Inoltre essendo mantenuta l'integrità funzionale della lichenasi è stato possibile rilevare su gel la presenza della banda di attività in corrispondenza del peso molecolare atteso per la fusione e, quindi, confermare ulteriormente l'espressione di un prodotto di fusione integro.

Gli estratti ottenuti da piante di *Nicotiana benthamiana* infiltrate con le colture di *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* trasformati con i plasmidi *pBID4-Lic-E7-KDEL*, *pBID4-Lic-E7GGG-KDEL*, mostrano una banda di attività enzimatica cospicua corrispondente alla fusione della proteina E7 con la lichenasi B (circa 35-38 kD).

L'analisi degli estratti di *Nicotiana benthamiana* infiltrate con le colture di *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* trasformati con i plasmidi *pBID4-Lic-E7-VAC* o *pBID4-Lic-E7GGG-VAC*, rivela che le piante, a seguito dell'infiltrazione, esprimono le relative fusioni. (Fig. 77, 78, 80, 81, 82).

Anche attraverso questo metodo di rivelazione, per ambo i tipi di gene (E7 o E7GGG) e per ambo i ceppi di *Agrobacterium*, si è potuto osservare che il costrutto che esprime un maggior livello di attività enzimatica (e quindi di prodotto di fusione) si è rivelato essere quello codificante per le fusioni provviste del segnale KDEL (Fig. 85, 86, 87, 88).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Lic-E7-VAC Lic-E7-KDEL

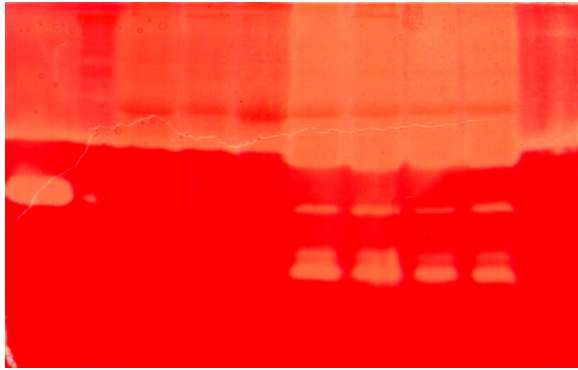


Fig. 85:

- 1) *Lichenasi* 50 ng (27 kD)
- 2) pianta 1
- 3) pianta 2
- 4) pianta 3
- 5) pianta 4
- 6) pianta 1
- 7) pianta 2
- 8) pianta 3
- 9) pianta 4
- 10) "spill over"

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Lic-E7-VAC Lic-E7-KDEL

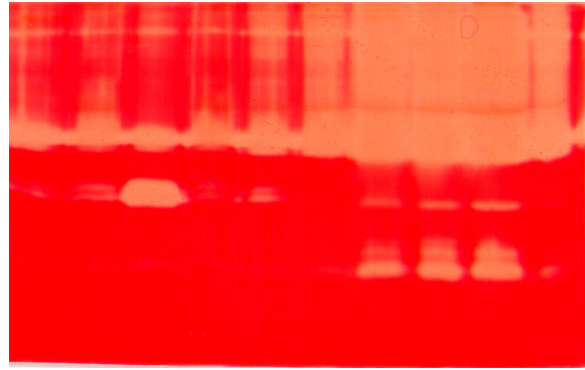


Fig. 86:

- 1) pianta 1
- 2) pianta 2
- 3) *Lichenasi* 50 ng (27 kD)
- 4) pianta 3
- 5) pianta 4
- 6) pianta 1
- 7) pianta 2
- 8) pianta 3
- 9) pianta 4
- 10) "spill over"

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Lic-E7GGG-VAC Lic-E7GGG-KDEL

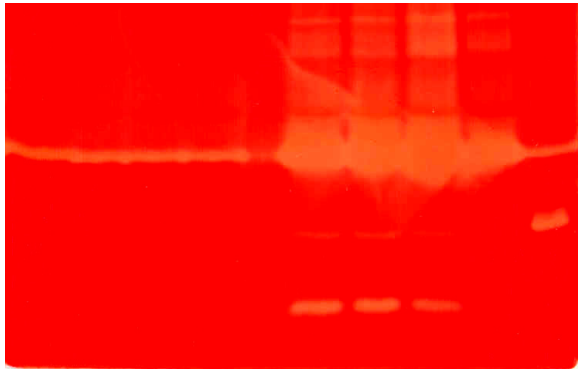


Fig. 87:

- 1) pianta 1
- 2) pianta 2
- 3) pianta 3
- 4) pianta 4
- 5) /
- 6) pianta 1
- 7) pianta 2
- 8) pianta 3
- 9) pianta 4
- 10) *Lichenasi* 50 ng (27 kD)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Lic-E7GGG-VAC Lic-E7GGG-KDEL

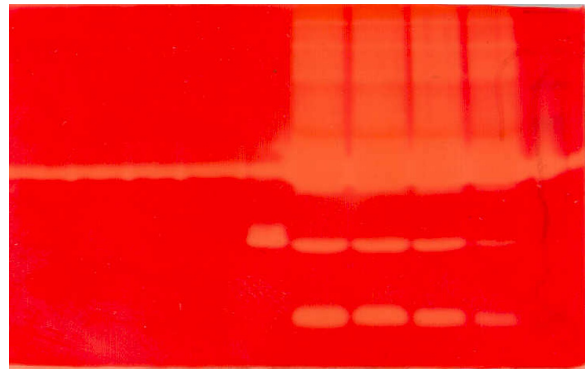


Fig. 88:

- 1) pianta 1
- 2) pianta 2
- 3) pianta 3
- 4) pianta 4
- 5) *Lichenasi* 50 ng (27 kD)
- 6) pianta 1
- 7) pianta 2
- 8) pianta 3
- 9) pianta 4
- 10) "spill over"

4.9.3 Purificazione delle proteine di fusione Lic-E7-KDEL e Lic-E7GGG-KDEL con His₆-tag prodotta da *Nicotiana benthamiana* a seguito di agroinfezione tramite cromatografia per affinità con ioni metallici immobilizzati ed analisi mediante SDS-PAGE ed “immunoblotting” delle proteine di fusione purificate

Ai fini della produzione massiva di tessuto vegetale di *Nicotiana benthamiana* esprime le fusioni di E7 ed E7GGG con la lichenasi, da cui procedere direttamente alla produzione degli estratti crudi o alla purificazione per le vaccinazioni in modello pre-clinico, si è deciso di utilizzare il ceppo GV-1031 di *Agrobacterium tumefaciens* contenente i costrutti pBID4-Lic-E7-KDEL e pBID4-Lic-E7GGG-KDEL, visto l'esito dell'analisi degli estratti in “immunoblotting” ed in zimogramma.

Le foglie infiltrate con *Agrobacterium tumefaciens* trasformato con i costrutti pBID4-Lic-E7-KDEL e pBID4-Lic-E7GGG-KDEL, appena campionate, sono state purificate su colonna di sefarosio Ni-NTA.

Le frazioni di eluizione riunite, dializzate sono state verificate mediante “immunoblotting” sviluppato sia con anticorpo primario policlonale anti-lichenasi (Fig. 89), sia con anticorpo monoclonale di topo anti-His₆ (dati non mostrati). E' stato possibile appurare il mantenimento del tag nella fusione ai fini della purifica, verificare che le fusioni sono state purificate senza degradazione e quantificare densitometricamente mediante “software” la resa della purificazione (Fig. 89, Fig. 90).

Da 40 g di tessuto sono stati purificati circa 6.5 mg di ciascuna proteina di fusione Lic-E7-KDEL e Lic-E7GGG-KDEL con una resa, dunque, di circa 200 µg di proteina di fusione/g di tessuto che corrisponde ad una resa di circa 45 µg di proteina E7 od E7GGG/g di tessuto (rappresentando il pM di E7 e di E7GGG circa un quarto di quello dell'intera fusione).

Il sistema adottato ha dunque permesso di incrementare di circa 10 volte le rese di espressione in *Nicotiana benthamiana* mediante PVX della proteina E7 in versione citoplasmatica e di almeno tre volte le rese della sua versione secretoria rispetto alle nostre precedenti esperienze. L'incremento del livello di espressione della proteina E7GGG fusa alla lichenasi mediante agro-infezione è sicuramente addirittura maggiore, essendo il livello di espressione mediato da PVX ancora più basso di quello relativo ad E7.

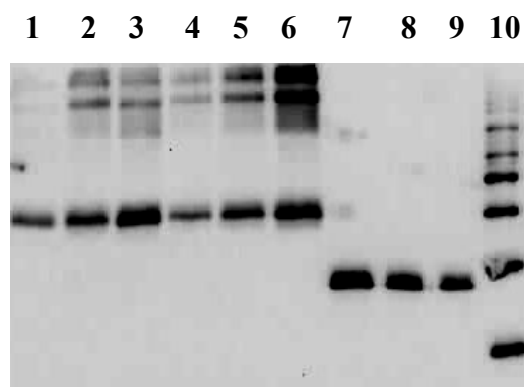


Fig. 89:

- 1) Lic-E7GGG-KDEL 1 μ l 1:10
- 2) Lic-E7GGG-KDEL 0.5 μ l
- 3) Lic-E7GGG-KDEL purificata 1 μ l
- 4) Lic-E7-KDEL 1 μ l 1:10
- 5) Lic-E7-KDEL 0.5 μ l
- 6) Lic-E7-KDEL 1 μ l
- 7) Lichenasi 60 ng (27 kD)
- 8) Lichenasi 40 ng
- 9) Lichenasi 20 ng
- 10) Marker

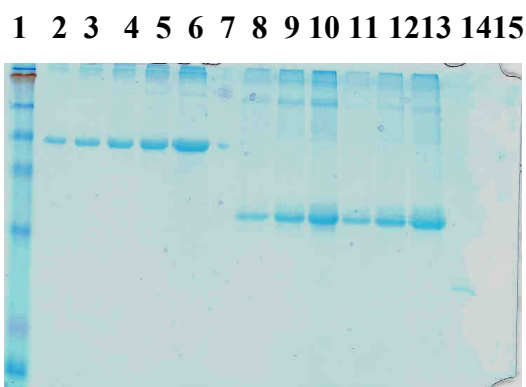


Fig. 90:

- 1) Marker
- 2) BSA 250 ng
- 3) BSA 500 ng
- 4) BSA 1 μ g
- 5) BSA 2.5 μ g
- 6) BSA 5 μ g
- 7) /
- 8) Lic-E7-KDEL 1 μ l
- 9) Lic-E7-KDEL 2 μ l
- 10) Lic-E7-KDEL 3 μ l
- 11) Lic-E7GGG-KDEL 1 μ l
- 12) Lic-E7GGG-KDEL 2 μ l
- 13) Lic-E7GGG-KDEL 3 μ l

4.9.4 Purificazione delle proteine di fusione Lic-E7-KDEL e Lic-E7GGG-KDEL tramite cromatografia a scambio ionico ed analisi mediante SDS-PAGE ed “immunoblotting” delle proteine di fusione purificate

Per purificare ulteriormente la preparazione relativa alle proteine E7-lich-KDEL ed E7GGG-lich-KDEL purificate su resina Ni-NTA, in vista della realizzazione di una formulazione vaccinale il piú pura possibile, le frazioni raccolte dalla purificazione mediante cromatografia per affinità, sono state dializzate e sottoposte ad un ulteriore passaggio di purificazione mediante cromatografia a scambio ionico utilizzando la resina “Q Sepharose Fast Flow column” (Amersham). Tale passaggio ha contribuito a eliminare delle impurità che conferivano un colore bruno alle preparazioni di proteina purificata, senza modificare sostanzialmente il pattern a piú alto peso molecolare e senza determinare alcuna perdita nella resa del prodotto di fusione purificato (*Fig. 91, 92*).

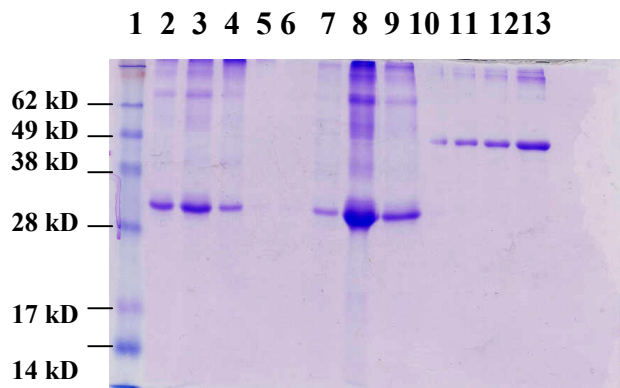


Fig. 91:

- 1) Marker
- 2) Lic-E7-KDEL purificata Ni-NTA 1 μ l
- 3) Lic-E7-KDEL purificata Ni-NTA 5 μ l
- 4) Lic-E7-KDEL dializzata 1 μ l
- 5) "flow through"
- 6) lavaggio
- 7) frazione di eluizione 1 (Q-column)
- 8) frazione di eluizione 2 (Q-column)
- 9) frazione di eluizione 3 (Q-column)
- 10) BSA 250 ng
- 11) BSA 500 ng
- 12) BSA 1 μ g
- 13) BSA 3 μ g

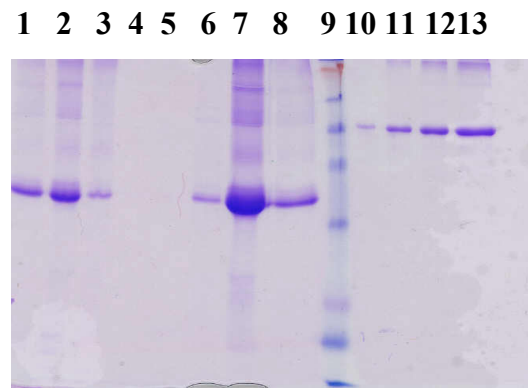


Fig. 92:

- 1) Lic-E7GGG purificata Ni-NTA 1 μ l
- 2) Lic-E7GGG purificata Ni-NTA 5 μ l
- 3) Lic-E7GGG dializzata 1 μ l
- 4) "flow through"
- 5) lavaggio
- 6) frazione di eluizione 1 (Q-column)
- 7) frazione di eluizione 2 (Q-column)
- 8) frazione di eluizione 3 (Q-column)
- 9) Marker
- 10) BSA 250 ng
- 11) BSA 500 ng
- 12) BSA 1 μ g
- 13) BSA 3 μ g

D) REALIZZAZIONE DI UN VACCINO TERAPEUTICO VEGETALE BASATO SULLA FUSIONE E7-LICHENASI ESPRESSA IN RADICI DI *Nicotiana benthamiana* E *Petunia hybrida* MEDIANTE TRASFORMAZIONE STABILE.

4.10 TRASFORMAZIONE DI ESPIANTI FOGLIARI MEDIATA DA *Agrobacterium rhizogenes*.

E' stata ottenuta la rigenerazione di radici a partire da espianti fogliari di *Petunia hybrida* e di *Nicotiana benthamiana* trasformati stabilmente da *Agrobacterium rhizogenes* contenente i costrutti pBID4-Lic-E7-KDEL e pBID4-Lic-E7GGG-KDEL. L'espressione delle proteine di fusione nelle radici e la selezione dei cloni che ne esprimono i livelli migliori saranno utilizzati per l'allestimento di colture d'organo ai fini della produzione di estratti, di liofilizzati oppure per la purificazione dei prodotti di interesse ai fini della vaccinazione in un modello pre-clinico.

5. DISCUSSIONE

Il carcinoma invasivo della cervice uterina, indotto principalmente dal virus del papilloma umano di tipo 16, rappresenta la seconda causa di morte per cancro nella popolazione femminile mondiale.

I principali approcci terapeutici attualmente in uso sono di tipo chirurgico o chemio-radioterapico e, dunque, rappresentano delle tecniche di tipo invasivo accompagnate, oltretutto, da gravosi effetti collaterali che frustrano psicologicamente le pazienti senza essere sempre risolutivi vista l'elevata frequenza di recidive anche in seguito a trattamenti di distruzione chimica o fisica delle lesioni HPV-indotte.

A ciò si aggiunga che tali terapie oltre ad essere dispendiose, richiedono l'assistenza di personale sanitario specializzato: problemi, questi, di difficile risoluzione nei Paesi in via di sviluppo dove il carcinoma cervicale rappresenta una patologia quasi sempre ad esito fatale e dove, quindi, ancora più urgente è la realizzazione di protocolli terapeutici efficaci.

Nei pazienti oncologici, gli antigeni espressi dalle cellule tumorali possono elicitarne risposte immuni specifiche sia umorali che cellulo-mediate che, tuttavia, quasi mai sono in grado di impedire la progressione della patologia. Per questa ragione esiste un notevole interesse nel tentare potenziare e rendere efficaci tali risposte immuni per mezzo di strategie di vaccinazione.

Nel caso dei tumori associati ad HPV, la popolazione "target" per una vaccinazione terapeutica è rappresentata dai soggetti già infettati o che hanno già sviluppato lesioni precancerose causate dai Papillomavirus ad alto rischio. Una terapia vaccinale di successo dovrebbe portare ad una rapida "clearance" delle lesioni riducendo la frequenza degli interventi di tipo chirurgico e conferendo protezione nel caso di esposizioni successive.

La possibilità di affrontare il carcinoma della cervice uterina, di cui è nota l'eziologia virale, attraverso l'induzione di una risposta immunitaria specifica nell'ospite, si concretizza nello sviluppo di vaccini terapeutici basati sull'antigene tumorale E7.

I vaccini a DNA consentono l'induzione di ambo le branche dell'immunità, caratteristica imprescindibile per l'immunoterapia antitumorale. Inoltre, rappresentano una piattaforma per la manipolazione dei geni codificanti per gli antigeni tumorali con l'obiettivo di migliorarne la presentazione al sistema immune, vista l'immunogenicità spesso ridotta di questi. In effetti, anche per quanto riguarda la proteina E7 di HPV16, costrutti che codifichino semplicemente per l'antigene di per sé hanno provato di essere incapaci di stimolare in maniera significativa

il sistema immune a causa di proprietà intrinseche della proteina (Shi *et al.*, 1999; Michael *et al.*, 2002).

In una parte del presente lavoro sperimentale, dunque, con la finalità di sviluppare efficaci vaccini genetici anti-cancro basati sull'oncogene E7, abbiamo progettato e costruito dei geni di fusione di una versione non oncogena del gene E7 di HPV16 (gene E7GGG) con sequenze di pianta e di virus fitopatogeni che si sono rivelate dotate di proprietà immunostimolanti: il gene codificante la “Coat Protein” del virus X della patata e la sequenza segnale di secrezione della proteina inibitrice della poligalatturonasi di *Phaseolus vulgaris*.

Abbiamo caratterizzato l'espressione di tali geni di fusione in cellule di mammifero e dimostrato la loro maggiore immunogenicità rispetto al solo antigene E7GGG attraverso la vaccinazione a DNA mediante somministrazione intramuscolare.

Gli esperimenti hanno indicato che la fusione del gene E7GGG con il gene CP è in grado di proteggere più efficacemente dalla sfida con cellule tumorigeniche rispetto al solo gene E7GGG già dotato di per sé di proprietà immunogeniche più pronunciate rispetto al gene “wild type” (Smahel *et al.*, 2001). Infatti l'immunizzazione con il plasmide pcDNA3/E7GGG-CP conferisce una maggior protezione rispetto a quella basata sul plasmide pcDNA3/E7GGG. Inoltre, negli animali che hanno sviluppato la neoplasia nonostante la vaccinazione con pcDNA3/E7GGG-CP, si è realizzato un sensibile ritardo nello sviluppo ed una notevole riduzione della taglia rispetto ai tumori sviluppati dagli animali vaccinati con pcDNA3/E7GGG.

Probabilmente il fondamento dell'effetto di protezione riscontrato, giace nella dimostrazione che principalmente la vaccinazione basata sulla fusione E7GGG-CP è in grado di determinare un incremento nel livello di IgG totali anti-E7 rilevate nel siero degli animali immunizzati e, dato ancora più rilevante, di indurre la selezione di cloni linfocitari E7-specifici di tipo CD4⁺ e CD8⁺ e quindi di una risposta immune cellulo-mediata molto più consistente rispetto al solo gene E7GGG.

L'induzione della marcata risposta immunitaria cellulo-mediata osservata potrebbe essere imputata alle proprietà immunostimolanti della CP. E' stato, infatti, dimostrato che linfociti T CD4⁺ specifici per un epitopo dominante, in tal caso per la CP, possono coadiuvare l'azione di linfociti T CD4⁺ che riconoscono epitopi immunologicamente silenti, come quelli che caratterizzano un antigene tumorale come E7 (Gerloni *et al.*, 2000). Tale stimolazione, meglio nota come meccanismo “linked T cell help for helper” si realizza per l'interposizione delle cellule dendritiche stimulate dall'“uptake” del peptide costituito dalla fusione dei due antigeni. Le cellule dendritiche così stimulate espongono sulla superficie complessi MHCII-

CP e MHCII-peptide antigenico tumore-specifico (E7GGG) e determinano la sovraregolazione dell'espressione di molecole costimolatrici principalmente sulla superficie di linfociti T CD4⁺ (Savelyeva *et al.*, 2003).

La trascrizione dei geni di fusione da parte delle cellule trasfettate con i plasmidi pcDNA3/E7GGG-CP e pcDNA3/E7GGG-L-CP, nelle nostre mani, non si è dimostrata sottoposta a "down-regulation" (vedi risultati RT-PCR). Di conseguenza, è stato escluso che la spiegazione per i bassi livelli di espressione ottenuti inizialmente risiedesse in una instabilità del trascritto corrispondente alle fusioni. Al contrario, poteva essere ipotizzato che il prodotto d'espressione fosse instabile a causa dell'ingresso nella via proteolitica dell'ubiquitina-proteasoma. In effetti, in presenza degli agenti inibitori di questo meccanismo di proteolisi, i prodotti di fusione E7GGG-CP e E7GGG-L-CP sono risultati invece abbondantemente espressi.

La presenza del "partner" di fusione CP, quindi, non compromette la capacità della proteina E7GGG (già nota per la forma "wild type") di venire degradata nella via proteasoma-ubiquitina ed anzi, probabilmente, la accentua. Infatti, anche se a bassi livelli ed in maniera non riproducibile, siamo comunque riusciti a rilevare l'espressione della proteina E7GGG anche in esperimenti di trasfezione condotti in assenza di inibitori del proteasoma; al contrario i prodotti delle fusioni E7GGG-CP o E7GGG-L-CP sono stati individuati come prodotti non degradati solo in presenza di tali agenti inibitori oppure mediante immuno-precipitazioni.

Non impedendo l'ingresso della proteina E7GGG nella via proteolitica dell'ubiquitina, la fusione con la "coat protein" di PVX non abbatte uno dei principali meccanismi con cui l'oncoproteina può essere presentata sulla superficie delle cellule trasfettate in combinazione con molecole HLA-1 per la stimolazione di cloni linfocitari CD8⁺ E7-specifici *in vivo*.

In immunofluorescenza è stato possibile verificare come la fusione di E7GGG con la CP determini la sintesi di un prodotto rilevato dall'anticorpo anti-E7 che compare in un numero maggiore di vescicole o di inclusioni citoplasmatiche di quanto non accada per il prodotto E7GGG di per sé. Probabilmente, dunque, la fusione con CP determina un generale incremento del "trafficking" intra-cellulare della proteina E7GGG, ed anche questo meccanismo potrebbe sostenere l'incremento della risposta immune (e quindi della protezione dal tumore) rispetto all'immunizzazione con il plasmide pcDNA3/E7GGG.

L'accelerare o comunque il non ostacolare il processamento proteolitico di E7GGG nelle fusioni con CP si sono rivelati quindi, probabilmente piuttosto vantaggiosi in termini di potenziamento dell'immunogenicità della proteina E7, confermando, del resto, l'ipotesi oramai assodata della possibilità di incrementare l'efficacia dei vaccini genetici inducendo la

degradazione dell'antigene tumorale codificato da parte del proteasoma e favorendone, di conseguenza, la processazione / presentazione secondo la via di classe I.

Un secondo meccanismo attraverso cui DNA plasmidico codificante per la CP potrebbe indurre immunità specifica contro l'antigene ad essa fuso, potrebbe essere legato all'auto-assemblamento della proteina di fusione in aggregati multimerici favorenti l'incremento della captazione antigenica da parte delle cellule dendritiche.

Nonostante, in questo lavoro, sia stata caratterizzata l'espressione in cellule di mammifero dei geni di fusione testati nelle vaccinazioni, non abbiamo ancora condotto esperimenti volti a verificare direttamente per nessuno dei prodotti di fusione studiati la formazione di aggregati multimerici auto-assemblantisi eventualmente indotti dalla CP (immuno-localizzazioni in microscopia elettronica). Infatti, i campioni provenienti dalle cellule trasfettate, essendo stati analizzati mediante SDS-PAGE in presenza di un agente denaturante come l'SDS previa bollitura nel tampone di caricamento, possono consentire di per sé di visualizzare principalmente forme monomeriche.

Probabilmente, tali aggregati di grosse dimensioni si formano ma, non ripiegandosi correttamente a causa delle dimensioni stesse, potrebbero essere degradati attraverso la via del proteasoma. Tale eventualità spiegherebbe l'incremento di vescicole e del "trafficking" citoplasmatico osservati con la fusione del gene E7GGG a CP rispetto al gene E7GGG di per sé.

Non è invece chiara la ragione delle risposte più deboli indotte dalla vaccinazione con pcDNA3/E7GGG-L-CP (ma sempre comunque più sostenute rispetto al solo gene E7GGG).

In ogni caso, i risultati ottenuti indicano che tramite la fusione del gene E7GGG con la CP di PVX è possibile ottenere *in vivo* un antigene maggiormente "visibile" al sistema immunitario rispetto all'antigene E7GGG, in grado di indurre una maggiore produzione di IgG totali anti-E7 e, soprattutto, una maggiore stimolazione di cloni linfocitari T E7-specifici probabilmente responsabile del conferimento della migliore protezione dal tumore superando il problema della scarsa immunogenicità dell'antigene di per sé.

Nel corso dello svolgimento del lavoro di tesi è apparso in letteratura un lavoro simile condotto dal gruppo di Smahel (Pokorna *et al.*, 2005) che ha fuso l'intera sequenza della CP del PVA (Potato Virus A) all'estremità 3' della sequenza di un peptide derivato dal gene E7 di HPV16 (aa 44-60) contenente gli epitopi immunodominanti per le cellule B e T in un vettore d'espressione di mammifero. Tale gruppo, è riuscito ad individuare un leggero incremento delle risposte CTL E7-specifiche rispetto alla vaccinazione con il solo gene intero E7 ma non ha individuato la produzione di anticorpi anti-E7 nel siero degli animali

immunizzati, dichiarando di aver comunque ottenuto elevati livelli di protezione. Tali risultati confermano il successo della strategia di fusione da noi adottata anche se i differenti epitopi helper presenti nella CP di PVA rispetto alla CP di PVX potrebbero essere alla base del diverso tipo e della maggior consistenza della risposta immune da noi riscontrata.

La vaccinazione in modello preclinico con il plasmide ricombinante pcDNA3/PGIPss-E7GGG ha consentito di riscontrare nel siero dei topi immunizzati titoli elevati di IgG totali contro la proteina E7, anche più consistenti di quelli riscontrati con la vaccinazione con il plasmide pcDNA3/E7GGG-CP, e la selezione di cloni linfocitari di tipo CD4⁺ e CD8⁺ (anche se meno rilevante di quella presumibilmente dovuta, invece, alla CP nelle fusioni relative con E7GGG).

Nonostante i segni di sofferenza e dimagrimento mostrati dai topi immunizzati con i plasmidi pPGIPss-E7GGG e pPGIPss-E7GGG-KDEL, è stato comunque riscontrato il conferimento di un certo grado di protezione per cui a 3 settimane dalla sfida con cellule tumorali esprimenti E7, nessuno dei topi vaccinati con i succitati plasmidi aveva sviluppato tumori. Tuttavia, nel momento in cui gli animali hanno sviluppato la neoplasia, le percentuali di protezione si sono ridotte rispetto alla vaccinazione con le fusioni di E7GGG con CP.

Sembrerebbe dunque che agli importanti titoli anticorpali sostenuti da questo tipo di vaccinazione non faccia riscontro il conferimento di un corrispondente livello di protezione. Probabilmente, dunque, nell'innescare dei meccanismi che presiedono al conferimento della protezione dal tumore esprime E7 sembrerebbe fondamentale la risposta cellulo-mediata ed una selezione potente di linfociti antigene-specifici come nel caso delle fusioni di E7GGG con CP.

Il consistente livello di anticorpi sostenuto dalla vaccinazione con il plasmide pcDNA3/PGIPss-E7GGG, è stato spiegato con la secrezione dell'antigene E7GGG dovuta alla fusione con la sequenza segnale di origine vegetale. La secrezione sposta il teatro del riconoscimento dell'antigene dalla membrana plasmatica all'ambiente extracellulare. In questo scenario, non sarebbero più coinvolte le molecole MHC di classe I o II e le loro controparti rappresentate dai recettori sulla superficie dei linfociti CD4⁺ o CD8⁺, ma i recettori di cellule del sistema immunitario che riconoscono antigeni solubili e deputate alla produzione di anticorpi come le cellule B.

In effetti, come già menzionato nell'introduzione, molti studi hanno dimostrato che il tipo e l'entità della risposta immune suscitata dipendono dalla localizzazione dell'antigene (legato alla superficie cellulare, ritenuto in ambiente intra-cellulare o secreto). La stessa proteina in

forma secreta induce titoli più alti di IgG rispetto a quando ritenuta nel citosol (Rice *et al.*, 1999) poiché le cellule B necessitano di determinanti antigenici lineari legati alla membrana o di epitopi conformazionali per iniziare il processo di espansione clonale per un'efficiente produzione di anticorpi (Akbari *et al.*, 1999).

In effetti i nostri risultati relativi all'analisi dei mezzi condizionati di cellule trasfettate con il costrutto pcDNA3/PGIPss-E7GGG hanno dimostrato che la proteina E7GGG sembra effettivamente essere veicolata nell'ambiente extracellulare e quindi che la fusione del gene E7GGG con una sequenza segnale di origine vegetale determini probabilmente la secrezione dell'antigene tumorale, rendendolo maggiormente "esposto" al riconoscimento da parte della branca umorale del sistema immunitario.

In effetti i risultati relativi alla trasfezione di cellule di mammifero con il plasmide ricombinante pcDNA3/PGIPss-E7GGG e pcDNA3/PGIPss-E7GGG-KDEL, indicano che le fusioni con PGIPss sono insensibili all'azione degli agenti inibitori del proteasoma risultando difficile individuarle anche in presenza di tali agenti (l'ingresso dei prodotti di fusione nel "pathway" secretorio dovrebbe renderli insensibili alla degradazione proteasomale ubiquitina-mediata cui sono destinate esclusivamente le proteine intracellulari). I nostri studi di immunofluorescenza indicano che i due prodotti di fusione PGIPss-E7GGG e PGIPss-E7GGG-KDEL si ritrovano specificamente nel citoplasma in strutture distribuite in tutta la cellula che studi di fluorescenza confocale potrebbero rivelare essere rappresentate dal sistema endomembranoso. Ciò confermerebbe che la proteina E7GGG fusa alla PGIPss effettivamente veicola l'antigene nel "pathway" secretorio. Nel caso delle trasfezioni con il plasmide pcDNA3/PGIPss-E7GGG, fluorescenza specifica viene anche rilevata nel nucleo (come per E7GGG), per cui la proteina codificata dal plasmide probabilmente non è del tutto efficientemente processata ed in parte resta citoplasmatica conservando le proprietà della proteina E7 ed E7GGG di interagire con il DNA o con proteine nucleari. In effetti, dai pochi campioni per "immunoblot" di qualità che è stato possibile preparare a causa dell'effetto citotossico e apoptogeno riscontrato sulle cellule dopo trasfezione, è possibile riscontrare sempre un debole doppietto di bande che potrebbe corrispondere alle due forme, correttamente processate per la secrezione e non, sintetizzate a partire dal plasmide esprimente le fusioni con PGIPss.

La vaccinazione in modello preclinico con il plasmide ricombinante pcDNA3/PGIPss-E7GGG-CP e pcDNA3/PGIPss-E7GGG-L-CP ha consentito di riscontrare nel siero dei topi immunizzati titoli elevati di IgG totali contro la proteina E7, che nel caso di pcDNA3/PGIPss-

E7GGG-CP sono anche più consistenti di quelli riscontrati con la vaccinazione con il plasmide pcDNA3/E7GGG-CP o con pcDNA3/PGIPss-E7GGG, e la selezione di cloni linfocitari di tipo CD4⁺ e CD8⁺, anche se meno rilevante di quella presumibilmente dovuta, invece, alla CP nella fusione con E7GGG.

Ancora una volta i livelli elevati di anticorpi specifici (soprattutto nel caso di PGIPss-E7GGG-CP) contro E7 accompagnati da una selezione debole di linfociti E7-specifici (sia nel caso di PGIPss-E7GGG-CP che PGIPss-E7GGG-L-CP) non impediscono, come nel caso di PGIPss-E7GGG lo sviluppo del tumore e non forniscono livelli elevati di protezione visti i dati ottenuti dopo immunizzazione.

L'esito positivo degli esperimenti di trasfezione di cellule di mammifero (HEK-293) con i plasmidi ricombinanti pcDNA3/PGIPss-E7-GGG-CP e pcDNA3/PGIPss-E7GGG-L-CP dimostra l'espressione delle sequenze di fusione clonate, nonché la sintesi dei relativi prodotti proteici. Come già annunciato per le trasfezioni con il costrutto PGIPssE7GGG, anche nei lisati delle cellule trasfettate con i plasmidi pcDNA3/PGIPss-E7-GGG-CP e pcDNA3/PGIPss-E7GGG-L-CP è stato possibile individuare sia prodotti proteici probabilmente corrispondenti alle intere sequenze di fusione PGIPss-E7GGG-CP e PGIPssE7GGG-L-CP, sia prodotti di più basso peso molecolare, in quanto probabilmente privi della porzione N-terminale, rappresentata dal peptide segnale PGIPss, prodotti, questi, ragionevolmente identificati con forme proteiche destinate alla secrezione e quindi già sottoposte al "cleavage" del peptide segnale.

In generale, in sistemi sia vegetali che animali, la traslocazione di proteine secretorie nel reticolo endoplasmatico si verifica contemporaneamente alla loro sintesi ("meccanismo di traslocazione co-traduzionale"). In tal caso, il peptide situato all'estremità N-terminale di una proteina possiede due distinte funzioni di segnalazione. Anzitutto, non appena sintetizzato, interagendo con la particella di riconoscimento del segnale (SRP), veicola il ribosoma da cui emerge verso la membrana del reticolo endoplasmatico. Successivamente, il peptide segnale media il trasporto della proteina nascente all'interno del reticolo endoplasmatico, inducendo, tramite un'interazione specifica, l'apertura del canale interno del complesso traslocatore Sec61. Per una frazione dei prodotti proteici PGIPss-E7GGG, PGIPss-E7GGG-CP e PGIPssE7GGG-L-CP, un eventuale mancato riconoscimento del peptide segnale da parte della SRP potrebbe, pertanto, impedire l'ancoraggio alla membrana del reticolo endoplasmatico del ribosoma, che rimarrebbe conseguentemente libero nel citoplasma. L'impossibilità, per i prodotti di fusione generati, di seguire il "pathway" secretorio precluderebbe il corretto processamento del peptide segnale della PGIP.

Tale ipotesi potrebbe giustificare l'identificazione dei prodotti di fusione PGIPss-E7GGG-CP e PGIPss-E7GGG-L-CP nei lisati di cellule di mammifero trasfettate in presenza di agenti inibitori del proteasoma. La sintesi ed il rilascio nel citosol li renderebbero, infatti, suscettibili al processo di degradazione proteolitica ubiquitina-mediato, accomunando il loro destino a quello di tutte le proteine intracellulari.

E' ipotizzabile che le proteine codificate dai plasmidi ricombinanti pcDNA3/PGIPss-E7GGG-CP e pcDNA3/PGIPss-E7GGG-L-CP entrino nel "pathway" secretorio, che consente il corretto processamento del peptide segnale, ma non siano poi effettivamente secrete dalla cellula. I prodotti di fusione E7GGG-CP ed E7GGG-L-CP, una volta all'interno del lume del reticolo endoplasmatico, potrebbero andare incontro ad un processo di ripiegamento ("folding") parziale o non corretto. Ciò ne determinerebbe la retrotraslocazione nel citosol, rapidamente seguita dalla degradazione proteolitica ubiquitina-mediata.

Le forme proteiche troncate potrebbero essere, inoltre, identificate con prodotti di fusione che, entrati nella via secretoria e correttamente processati, sono poi trattenuti dal sistema endomembranoso della cellula. Ad esempio, l'atteso auto-assemblamento delle proteine di fusione, indotto dalla CP, potrebbe determinare la formazione di aggregati multimerici troppo grandi per essere inglobati nelle vescicole di trasporto che gemmano dal reticolo endoplasmatico. Un eventuale mislocazione dei prodotti di fusione potrebbe, inoltre, causarne l'inglobamento in vescicole lisosomiali anziché secretorie. Successive analisi di microscopia elettronica potranno confermare la formazione degli attesi aggregati multimerici ed analisi di immunolocalizzazione potranno fornire indicazioni più dettagliate sulla loro esatta compartimentalizzazione intracellulare. Per fugare i dubbi sulla natura dei prodotti di fusione sintetizzati in cellule di mammifero, essi dovrebbero essere sottoposti ad analisi della sequenza aminoacidica N-terminale.

E' interessante, inoltre, sottolineare ancora una volta la particolare suscettibilità al processo di degradazione proteolitica intracellulare ubiquitina-mediato mostrata dai prodotti di fusione PGIPss-E7GGG-CP e PGIPss-E7GGG-L-CP sia da E7GGG-CP ed E7GGG-L-CP, individuabili principalmente in cellule trasfettate in presenza di agenti inibitori del proteasoma. Numerosi studi sperimentali hanno evidenziato la possibilità di incrementare l'efficacia di vaccini a DNA contro il cancro cervicale, favorendo la degradazione proteasomale della proteina codificata (in genere E7) e potenziandone, di conseguenza, la processazione / presentazione secondo la via di classe I. Ciò è stato generalmente ottenuto attraverso la mutagenesi del gene E7, finalizzata alla destabilizzazione dell'antigene codificato (Shi *et al.*, 1999), oppure mediante l'inserimento, nel vettore plasmidico, di

sequenze capaci di “marcare” la proteina per la degradazione proteasomale (Liu *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2003).

I vaccini genetici costituiti dai plasmidi ricombinanti pcDNA3/PGIPss-E7GGG-CP e pcDNA3/PGIPss-E7GGG-L-CP, risultano intrinsecamente dotati della capacità di favorire la degradazione proteolitica dei prodotti di fusione codificati, ed in grado di indurre una risposta anticorpale marcata anche se non in grado di sommare in sé i benefici, in termini di potenziamento della protezione antitumorale, derivanti dall’azione sinergica della PGIPss e della CP.

In definitiva, questa parte del lavoro permette di evidenziare come il mondo vegetale rappresenti una fonte straordinariamente ricca e facilmente accessibile di sequenze e molecole a valore immunologico, il cui impiego nello sviluppo di nuovi vaccini anti-cancro rappresenta un approccio rivoluzionario alla terapia dei tumori indotti dal virus del papilloma umano e potenzialmente di altri tumori.

La possibilità di applicare protocolli di immunizzazione attiva anti-tumorale si basa sulla capacità propria del paziente di sviluppare, dopo stimolazione con antigeni associati al tumore, una risposta immune capace di superare lo stato di tolleranza da essi instaurato e portare ad una risposta cito-tossica che determini un efficiente “killing” delle cellule tumorali ed impedisca la diffusione metastatica del tumore (Pijpers *et al.*, 2005)

Finora, i vaccini ricombinanti basati sulla proteina E7 di HPV16 usati in “clinical trial” sono stati espressi in baculovirus o in *E. coli* e principalmente come proteine di fusione, vista l’intrinseca instabilità della proteina E7 di per sé (Fernando *et al.*, 1999; Reinstein *et al.*, 2000). Per l’applicazione di un vaccino terapeutico anti-HPV nell’uomo, è di fondamentale importanza ottenere un immunogeno basato sulla proteina E7 che sia stabile, economico ed efficace.

Negli ultimi anni, le piante sono state utilizzate sempre più di frequente come sistemi di espressione eterologa di proteine ricombinanti dal potenziale terapeutico (Twyman *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004; Kirk & Webb, 2005). Alcuni biofarmaceutici che sono stati ottenuti in pianta sono ora in “clinical trial” (Awram *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2005) ed alcuni presidi bio-medici anti-cancro sono stati ottenuti attraverso sistemi d’espressione transienti basati su vettori virali vegetali (Verch *et al.*, 1998; McCormick *et al.*, 1999; Franconi *et al.*, 2002; McCormick *et al.*, 2003; Verch *et al.*, 2004; Canizares *et al.*, 2005).

Abbiamo già riportato la produzione della proteina E7 di HPV16 in piante di *Nicotiana benthamiana* come proteina solubile citosolica realizzando un costrutto citosolico esprime E7 basato su un vettore d'espressione derivato da PVX (Franconi *et al.*, 2002). Topi immunizzati con estratti crudi di pianta contenenti la proteina E7 hanno mostrato la stimolazione di una risposta immune sia umorale che cellulo-mediata, dando indizi su un possibile effetto adiuvante intrinseco allo stesso estratto di pianta. Tali risultati sono stati ottenuti con livelli di espressione di circa 3-4 µg di proteina E7/g di foglia fresca e nonostante la quantità di proteina somministrata con l'estratto fosse 20 volte inferiore alla quantità nota per indurre protezione completa (10 µg di proteina purificata da *E. coli* / dose in co-somministrazione con l'adiuvante Quil-A) (Fernando *et al.*, 1998).

Di conseguenza abbiamo assunto che l'attività immunogenica della formulazione 'in planta' della proteina E7 poteva essere ulteriormente migliorata aumentando il contenuto di proteina E7 della preparazione vaccinale. Ciò poteva essere ottenuto incrementando i livelli d'espressione del sistema vegetale.

Per migliorare le rese di proteine d'interesse espresse in pianta, possono essere usate sequenze segnale per indirizzarla ai fini dell'accumulo, verso specifici compartimenti sub-cellulari come il reticolo endoplasmatico da dove, in assenza di ulteriori segnali di indirizzamento o di ritenzione, la proteina espressa può essere indirizzata per essere secreta nell'apoplasto. Inoltre, il sistema endomembranoso circonda un ambiente più adatto al ripiegamento ed all'assemblaggio di una proteina d'interesse rispetto all'ambiente definito dal citosol, come dimostrato da studi sull'espressione di anticorpi espressi in pianta (Franconi *et al.*, 1999; Schillberg *et al.*, 1999).

E' stato dimostrato che utilizzando un vettore basato su PVX è possibile ottenere l'espressione ma anche la compartimentalizzazione di proteine eterologhe (Franconi *et al.*, 1999; Roggero *et al.*, 2001). Di conseguenza in questa parte del lavoro sperimentale abbiamo voluto dimostrare che fosse realizzabile l'espressione della proteina E7 di HPV16 mediata da PVX nel compartimento secretorio e nell'apoplasto di *Nicotiana benthamiana* utilizzando la sequenza segnale derivata da pianta PGIPss.

Abbiamo dimostrato che tale strategia ha permesso di ottenere un incremento dell'espressione della proteina E7 pari a cinque volte nelle piante infettate con il plasmide ricombinante pPVX-PGIPss-E7 (corrispondente ad una resa di 15 µg di proteina / g di tessuto) rispetto alle piante infettate con il costrutto pPVX-E7 per l'espressione citoplasmatica della proteina di HPV16 (che presenta, come anticipato, una resa pari a circa 3 µg di proteina / g di tessuto).

Questo dato potrebbe essere il risultato di un incremento nella stabilità della proteina dovuto alla strategia d'espressione. La proteina E7 sembrerebbe, infatti, accumularsi nel sistema secretorio ed essere secreta nell'apoplasto. In effetti la proteina è presente in forma solubile anche nei fluidi intercellulari, confermando il successo della strategia di indirizzamento nel "pathway" secretorio adottata (Franconi *et al.*, in press).

Il compartimento endomembranoso rappresenterebbe un sistema naturale per concentrare la proteina E7, renderebbe le procedure di estrazione più semplici e fornirebbe il razionale per la generazione di piante transgeniche per la fito- o la rizosecrezione della proteina E7.

Abbiamo dimostrato che il vaccino vegetale basato sulla proteina E7 con formulazione *in planta* e senza adiuvanti è in grado di elicitare una risposta cellulo-mediata di tipo CTL in un modello pre-clinico. In effetti, è stato possibile riscontrare una potente risposta immune cellulo-mediata principalmente negli animali immunizzati che, al termine dell'esperimento, non avevano sviluppato il tumore. Al contrario, l'induzione di tale tipo di immunità è meno potente nei topi immunizzati nei quali, invece, la neoplasia si sviluppa nonostante la vaccinazione. D'altra parte, in questi ultimi, l'espansione del tumore è stata comunque molto minore rispetto agli animali di controllo immunizzati con l'estratto contenente il PVX "wild type" (Franconi *et al.*, in press).

Tale risultato potrebbe essere la conseguenza di un'attivazione specifica di cellule differenti dai linfociti citotossici, per cui probabilmente la protezione solo parziale dallo sviluppo di tumore potrebbe essere legata all'azione di cellule dell'immunità innata, ad esempio. E' stato in effetti riportato che una strategia immunologica efficace contro lo sviluppo di un tumore dovrebbe determinare l'incremento delle risposte immunologiche legate all'immunità innata od a quella adattativa, oppure di entrambe (Stewart *et al.*, 2003).

I topi immunizzati con l'estratto di pianta contenente una dose maggiore di proteina E7 (cioè quello derivato da piante infettate con il costrutti pPVX-PGIPss-E7) hanno mostrato un incremento della risposta immune ed una protezione più efficace dallo sviluppo del tumore.

E' da notare, inoltre, che anche nella versione 'secretoria' del vaccino l'estratto di pianta conserva le proprietà simil-adiuvanti intrinseche già riportate per la versione 'citoplasmatica' (Franconi *et al.*, 2002).

Proprietà simil-adiuvanti dello stesso tipo sono state già osservate per altri antigeni vaccinali derivati da pianta. Un epitopo scFv anti-idiotipo derivante da un linfoma a cellule B è stato prodotto ad elevati livelli in *Nicotiana benthamiana* mediante un vettore virale derivato da TMV e l'antigene purificato dagli estratti di pianta è stato utilizzato come vaccino terapeutico in protocolli di immunizzazione pre-clinica che ne prevedevano la somministrazione sub-

cutanea. I topi che hanno ricevuto il scFv di per sé, senza adiuvante, hanno mostrato un elevato livello di protezione, statisticamente equivalente a quello mostrato da topi immunizzati con il scFv co-somministrato con l'adiuvante QS-21 (McCormick *et al.*, 1999).

Questi dati dimostrano che l'appropriata conformazione o qualche altro fattore sconosciuto proprio del sistema di espressione vegetale migliora l'efficacia dell'immunogeno.

Lo stesso effetto adiuvante descritto è stato riscontrato nel momento in cui un scFv umano clonato da biopsie di linfomi) è stato espresso in pianta e testato in un modello pre-clinico per l'induzione dell'appropriata risposta anti-idiotipo (McCormick *et al.*, 2003). Tali scFvs prodotti in pianta sono attualmente in "clinical trial" di fase I.

Anche un anticorpo ed un antigene prodotti dalle cellule tumorali di un carcinoma del colon-retto (Verch *et al.*, 1998; Verch *et al.*, 2004) sono stati prodotti in *Nicotiana benthamiana* utilizzando un vettore basato su TMV. L'antigene tumorale purificato da pianta è stato in grado di stimolare cloni linfocitari T specifici con indicazioni, anche in questo caso, sulla presenza di un certo effetto adiuvante conferito alla formulazione vaccinale dalla produzione dell'immunogeno in pianta.

I risultati da noi ottenuti consentono di affermare che l'indirizzamento della proteina E7 nella via di secrezione ha, dunque, dimostrato di incrementare la produzione di tale antigene in pianta e di poter migliorare l'efficacia immunoterapeutica degli estratti vegetali che lo contengono. E' possibile che un ulteriore incremento nel conferimento di tale immunità anti-tumorale possa essere raggiunto attraverso la combinazione degli estratti vegetali contenenti E7 con geni immuno-stimolatori e/o con richiami 'eterologhi'.

In effetti, abbiamo anche effettuato la liofilizzazione di foglie di *Nicotiana benthamiana* infettate con il costrutto pPVX-PGIPss-E7 ottenendo materiale vegetale contenente, quindi, elevati livelli di proteina E7 in cui essa si è dimostrata stabile per almeno un anno a temperatura ambiente.

Tale materiale potrebbe essere utilizzato per la preparazione di estratti ad alta concentrazione di proteina E7 e potrebbe rappresentare un ulteriore miglioramento alla formulazione vaccinale già sperimentata. Inoltre tale sistema potrebbe rendere possibile l'uso degli estratti per immunizzazioni orali. Abbiamo, infatti, utilizzato tessuto vegetale liofilizzato contenente la proteina E7 mescolato a mangime per l'alimentazione di animali. Dati preliminari indicano che tale tipo di alimentazione è stata ben tollerata dagli animali. Inoltre, quando somministrato oralmente secondo questa modalità come richiamo ad una prima dose di vaccino in protocolli di immunizzazione, il liofilizzato contenente E7 determina un incremento dell'entità della risposta immune indotta dalla vaccinazione, dimostrando

l'applicabilità di tale sistema di somministrazione dell'immunogeno (Franconi *et al.*, unpublished)

Questa parte del lavoro rappresenta quindi un significativo passo avanti nella formulazione di un vaccino contro i tumori associati ad HPV con caratteristiche di efficacia, stabilità, semplicità di somministrazione in contesti caratterizzati da carenza di risorse ed adatto alla produzione su larga scala.

Presso il "Fraunhofer Center for Molecular Biotechnologies" (Newark, Delaware) abbiamo costruito i vettori per l'agro-infiltrazione di *Nicotiana benthamiana* con *Agrobacterium tumefaciens* ed *Agrobacterium rhizogenes* per l'espressione transiente di proteine chimeriche derivanti dalla fusione della proteina E7 di HPV16 e della sua versione non mutagena E7GGG con l'enzima batterico lichenasi B di *Clostridium thermocellum*. Il fine della progettazione di tali fusioni è stato quello di produrre una vaccinazione più efficace basata sulla somministrazione di estratti crudi o di proteina E7 od E7GGG purificate da pianta attraverso l'incremento dei livelli di espressione e/o della stabilità di tali antigeni.

In effetti, come già ricordato, la proteina E7, a causa del suo ridotto potere immunogeno, è, nella maggior parte dei vaccini proteici, co-somministrata con adiuvanti o impiegata in forma di proteina di fusione.

Abbiamo utilizzato un sistema di trasformazione mediato da *Agrobacterium* basato sull'infiltrazione di foglie intere su piante. Tale sistema, realizzato attraverso l'infiltrazione manuale o mediante l'applicazione del vuoto, consente al batterio di penetrare gli strati interni del tessuto fogliare determina, di conseguenza, il trasferimento del T-DNA contenente i geni di interesse nelle cellule del mesofillo fogliare ed ha il vantaggio di essere rapido e applicabile anche a un elevato numero di piante.

I risultati ottenuti consentono di affermare che tale sistema di espressione transiente e, probabilmente, la maggiore stabilità conferita alle proteine dalla fusione con l'enzima batterico, sono state d'aiuto nella produzione di tali proteine in pianta ed hanno posto le basi per un ulteriore miglioramento dell'efficacia protettiva di un vaccino terapeutico di origine vegetale basato sulla proteina E7.

Abbiamo infatti dimostrato che tale strategia ha permesso di ottenere un incremento dell'espressione della proteina E7 rispetto al sistema mediato da PVX in assenza di fusioni.

La stima più pessimistica dei livelli di espressione ottenuti si attesta intorno ai 400 µg di proteina di fusione Lic-E7-KDEL o Lic-E7GGG-KDEL per grammo di tessuto

(corrispondenti a 100 µg di proteina E7 od E7GGG per grammo di tessuto). Tale livello di produzione è pari a circa 35 volte quello ottenuto da piante infettate con il costrutto pPVX-E7 (corrispondente ad una resa di circa 3 µg di proteina / g di tessuto) e supera di circa 20 volte anche il livello di proteina E7 espressa dalle piante infettate con il costrutto “secretorio” pPVX-PGIP_{ss}-E7.

Tale incremento risulta ancora più consistente e di maggior significato per la proteina E7GGG che, al di fuori dei costrutti per l'agroinfezione, nel sistema di espressione mediato da PVX (espressione mediata dal costrutto pPVX-E7GGG), è risultata espressa sempre a livelli più bassi di E7. Ciò è di importanza notevole se si pensa che ai fini di una sperimentazione clinica, ponendo l'uso di un'oncoproteina come E7 delle questioni di sicurezza, sarebbe necessario comunque utilizzare un antigene equivalente dotato dello stesso potere immunogeno ma privo di potere trasformante come, appunto la proteina E7GGG.

La rivelazione di attività lichenasica da parte delle fusioni progettate, ha dimostrato come la fusione di entrambe le proteine E7 ed E7GGG a livello del dominio catalitico non inattivi l'enzima. Questo risulta di particolare rilievo in quanto dimostra che la selezione clonale di radici esprimenti le proteine E7 od E7GGG potrà essere analizzata attraverso la valutazione di tale attività enzimatica e, dunque, consentirà l'impiego della lichenasi come “reporter” traduzionale.

Inoltre, tale dato consente di ipotizzare come gli elevati livelli di espressione delle fusioni possano essere in parte attribuibili ad un incremento della stabilità delle proteine E7 ed E7GGG conferito dalla stessa lichenasi che le conserva nella fusione con tali antigeni.

L'indirizzamento verso il reticolo endoplasmatico od il vacuolo ottenuto con l'aggiunta di sequenze di ritenzione specifiche nei costrutti utilizzati per l'agro-infezione, potrebbe avere avuto un ruolo fondamentale nell'accumulo delle proteine chimeriche progettate. Probabilmente esso è stato funzionale anzitutto ad evitare l'accumulo intracellulare delle proteina di fusione estranee, impedendo così il raggiungimento di concentrazioni tossiche e favorendo, di conseguenza, un incremento della loro sintesi.

Inoltre, come già ripetuto, la segregazione in questi compartimenti sub-cellulari fornisce generalmente un sistema più adatto ad un ripiegamento ed ad un assemblaggio appropriati di una proteina (ambiente ossidante, caratterizzato da un'abbondanza di “chaperone” molecolari che assistono il “folding” della proteina e, al contrario, carenza di proteasi) di quanto non sia l'ambiente riducente offerto dal citoplasma e rappresenta, dunque, un sito vantaggioso per un accumulo ad alto livello di una proteina d'interesse.

Abbiamo anche comparato due diversi tipi di fusione per ciascun costrutto, presentanti, appunto, una sequenza segnale per l'indirizzamento verso il reticolo endoplasmatico od il vacuolo. Nelle nostre mani, il costrutto dotato della sequenza KDEL si è rivelato il più efficiente nel guidare un accumulo a livelli elevati di entrambi gli antigeni E7 ed E7GGG fusi all'enzima lichenasi.

Evidentemente, l'indirizzamento verso il reticolo endoplasmatico ha effettivamente rappresentato un sistema naturale per concentrare le proteine di fusione progettate Lic-E7-KDEL e Lic-E7GGG-KDEL nel tessuto vegetale ed ha semplificato le procedure di estrazione e di purificazione.

La stabilizzazione di E7 attraverso la fusione con la lichenasi o la compartimentalizzazione, hanno, infatti, anche consentito di ottenere elevate rese all'atto della purificazione. Quest'ultima si era stata dimostrata, invece, difficoltosa quando i livelli di espressione nel tessuto non erano soddisfacenti (espressione mediata dal costrutto pPVX-His₆-E7, da dati non mostrati).

Gli attuali dati a disposizione, che potrebbero essere ulteriormente migliorati ottimizzando i protocolli di purificazione, confermano che la resa di purificazione per ambo le proteine di fusione Lic-E7-KDEL e Lic-E7GGG-KDEL si attesta intorno ai 200 µg / g di tessuto infiltrato.

L'obiettivo di incrementare i livelli di espressione dell'oncoproteina E7 e della sua versione priva di potere trasformante in pianta in modo da aumentarne la resa di produzione / grammo di tessuto e, in ultima analisi, il contenuto / dose di vaccino è stato quindi raggiunto.

Il sistema attuato, consente quindi finalmente di poter verificare se l'immunizzazione in modello pre-clinico con una dose di immunogeno derivato da pianta uguale a quella nota per conferire il 100% di protezione nel nostro modello (50 µg totali di proteina His₆E7 somministrata in cinque vaccinazioni), migliori effettivamente l'attività immunogenica della formulazione vaccinale derivata da pianta.

Stiamo attualmente effettuando un protocollo di vaccinazione pre-clinico basato sulla somministrazione delle fusioni Lic-E7-KDEL e Lic-E7GGG-KDEL purificate da piante agro-infiltrate.

Accanto alle considerazioni relative all'effetto di dose, si potrebbe aggiungere l'ipotesi che la vaccinazione con le succitate proteine di fusione potrebbe trarre vantaggio dalle considerevoli dimensioni dell'enzima lichenasi. Esse potrebbero costituire un potente stimolo alla risposta immunitaria e quindi conferire alla strategia di fusione con E7 il potere di incrementare la

scarsa immunogenicità dell'oncoproteina, così come nel caso delle fusioni con la CP di PVX nel modello di vaccinazione genetica già sperimentato.

Inoltre, ancora una volta, la presenza di epitopi T helper nell'enzima lichenasi B potrebbero essere responsabili di una maggiore immunogenicità di antigene di fusione rispetto alla sola proteina E7 al come già accaduto nel caso della fusione del gene E7 con il gene codificante per un altro enzima, il gene GUS di *E. coli* (Smahel et al., 2004).

E' stata anche ottenuta la rigenerazione di radici a partire da espianti fogliari di *Petunia hybrida* e di *Nicotiana benthamiana* trasformati stabilmente da *Agrobacterium rhizogenes* contenente i costrutti pBID4-Lic-E7-KDEL e pBID4-Lic-E7GGG-KDEL. L'espressione delle proteine di fusione nelle radici e la selezione dei cloni che ne esprimono i livelli migliori saranno utilizzati per l'allestimento di colture d'organo ai fini della produzione di estratti, di liofilizzati oppure per la purificazione dei prodotti di interesse ai fini della vaccinazione in un modello pre-clinico.

BIBLIOGRAFIA

- Akbari O., Panjwani N., Garcia S., Tascon R., Lowrie D., Stockinger B.** (1999). DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J. Exp. Med.* **189**: 169–178.
- Allen J.E. & Maizels R.M.** (1997). Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunol. Today* **18**: 387-392.
- Altmann A. et al.** (1992) Definition of immunogenic determinants of the human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7. *Eur. J. Cancer* **28**, 326–333.
- Andre S, Seed B, Eberly J, Schraut W, Haas J.** (1998). Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J. Virol*, **72**:1497-1503.
- Androphy E.J., Hubbert N.L., Schiller J.T. & Lowy D.R.** (1987). Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *EMBO J.* **6**: 989-992.
- Antinore M. J., Birrer M. J., Patel D., Nader L. and McCance D. J.** (1996). The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J.* **15**: 1950-1960.
- Apt D., Chong T., Liu Y. & Bernard H.U.** (1993). Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 1993 Aug **67(8)**: 4455-4463.
- Arany I and Tyring S.K.** (1996). Status of local cellular immunity in interferon-responsive and nonresponsive human papillomavirus-associated lesions. *Sex. Transm. Dis* **23**: 475-480.
- Armstrong D.J. & Roman A.** (1993). The anomalous electrophoretic behaviour of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **14**: 1380-1387.
- Armstrong D.J. & Roman A.** (1997). The relative ability of human papillomavirus type 6 and human papillomavirus type 16 E7 proteins to transactivate E2F-responsive elements is promoter and cell-dependent. *Virology* **239**: 238-246.
- Atabekov J.G., Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Noikov V.K., and Arkhipenko M.V.** (2001). Translational activation of encapsidated potato virus X RNA by coat protein phosphorylation. *Virology* **286**: 466-474.
- Austyn J.M.** (1996). New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **183**: 1287-1292.
- Awram P., Gardner R.C., Forster R.L. and Bellamy A.R.** (2002). The potential of plant viral vectors and transgenic plants for subunit vaccine production. *Adv. Virus Res.* **58**: 81-124.

- Bachmann A.** (2002). Disturbance of tumor necrosis factor- α -mediated interferon- β signalling in cervical carcinoma cells. *J. Virol.* **76**: 280-291.
- Baker C.C., Phelps W.C., Lindgren V., Braun M.J., Gonda M.A. and Howley P.M.** (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* **61**: 962-971.
- Baldwin P.J. et al.** (2003). Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 as a therapeutic vaccination for vulval and vaginal intraepithelial neoplasia. *Clin. Cancer Res.* **9**: 5205–5213.
- Ball J.M., Graham D.Y., Opekun A.R., Ginger M.A., Guerrero R.A. and Estes M.K.** (1999). Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study. *Gastroenterol.* **117**: 40-48.
- Balmelli C., Roden R., Potts A., Schiller J.T., De Grandi T., and Nardelli-Haeffliger D.** (1998). Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 virus-like particles elicits neutralizing antibodies in mucosal secretions. *J. Virol.* **72**: 8220-8229.
- Balsitis S.J., Sage J., Duensing S., Münger K., Jachs T., and Lambert P.F.** (2003). Recapitulation of the effects of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene on mouse epithelium by somatic Rb deletion and detection of pRb-independent effects of E7 in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 9094-9103.
- Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B. and Palucka K.** (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 767-811.
- Banks L. Edmonds C. and Vousden K.H.** (1990). Ability of the HPV16 E7 protein to bind Rb and induce DNA synthesis is not sufficient for efficient transforming activity in NIH3T3 cells. *Oncogene* **5**: 1383-1389.
- Baratova L.A., Fedorova N.V., Dobrov E.N., Lukashina E.V., Kharlanov A.N., Nasonov V.V., Serebryakova M.V., Kozlovsky S.V., Zayakina O.V., and Rodionova N.P.** (2004). N-terminal segment of potato virus X coat protein subunits is glycosylated and mediates formation of a bound water shell on the virion surface. *Eur. J. Biochem* **271**: 3136-3145.
- Barbosa M.S., Lowy D.R., and Schiller J.T.** (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J. Virol.* **63**: 1404-1407.
- Barbosa M.S., Edmonds C., Fischer C., Schiller J.T., Lowy D.R., and H. Vousden K.** (1990). The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and SV40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* **9**: 153-160.
- Bardor M., Faveeuw C., Fitchette A.C., Gilbert D., Galas L., Trottein F., Faye L. and Lerouge P.** (2003). Immunoreactivity in mammals of two typical plant glycoepitopes, core $\alpha(1,3)$ -fucose and core xylose. *Glycobiology* **13**: 427-434.

- Barnard P. & McMillan N.A.** (1999). The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signalling mediated by interferon- α . *Virology* **259**: 305-313.
- Barnard P., Payne E. and McMillan N.A.** (2000). The human papillomavirus e7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon- α . *Virology* **277**: 411-419.
- Barton S.E., Maddox P.H., Jenkins D., Edwards R., Cuzick J., and Singer A.** (1988). Effect of cigarette smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic change? *Lancet*. **2**: 652-654.
- Baulcombe D.C., Chapman S. and Santa Cruz S.** (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *The Plant J* **7(6)**: 1045-1053.
- Biemelt S., Sonnewald U., Galmbacher P., Willmitzer L. and Muller M.** (2003). Production of Human Papillomavirus Type 16 Virus-Like Particles in Transgenic Plants. *J. Virol.* **77**: 9211.
- Bontkes H.J., de Gruijl T.D., Bijl A., Verheijen R.H., Meijer C.J., Scheper R.J., Stern P.L., Burns J.E., Maitland N.J., Walboomers J.M.** (1999). Human papillomavirus type 16 E2-specific T-helper lymphocyte responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol. Sept 80 (Pt 9)*: 2453-2459.
- Booy F.P., Roden R.B., Greenstone H.L., Schiller J.T. and Trus B.L.** (1998). Two antibodies that neutralize papillomavirus by different mechanisms show distinct binding patterns at 13 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **281**: 95-106.
- Borysiewicz L.K. et al.** (1996). A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* **347**: 1523-1527.
- Bosch F.X., de Sanjose S., Chapter L.** (2003) Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* **31**: 3-13.
- Bosch F.X., Manos M.M., Munoz N., Sherman M., Jansen A.M., Peto J., Schiffman M.H., Moreno V., Kurman R., and Shah K.V.** (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**: 796-802.
- Boyle J.S., Koniaras C, Lew A.M.** (1997). Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocytes and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int. Immunol* **9**: 1897-1906.
- Braspenning J., Marchini A., Albarani V., Levy L., Ciccolini F. and Cremonesi C.** (1998). The CXXC Zn binding motifs of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein are not required for its in vitro transforming activity in rodent cells. *Oncogene* **16**: 1085-1089.

- Brehm A., Nielsen S.J., Miska E.A., Macance D.J., Reid J.L., Bannister A.J., et al.**(1999). The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histon deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* **18**: 2449-2458.
- Breitbart F., Kirnbauer R., Hubbert N.L., Nonnenmacher B., Trin-Dinh-Desmarquet C., Orth G., Schiller J.T., and Lowy D.R.** (1995). Immunization with virus-like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J. Virol.* **69** (6): 3959-3963.
- Breitbart F. & Coursaget P.** (1999). Human papillomavirus vaccines. *Cancer Biol.* **9**: 431-445.
- Brennan F.R., Jones T.D., and Longstaff M.** (1999). Immunogenicity of peptides derived from a fibronectin-binding protein of *S. aureus* expressed on two different plant viruses. *Vaccine* **17**: 1846-1857.
- Brinkman J.A., Caffrey A.S., Muderspach L.I., Roman L.D., Kast W.M.** (2005). The impact of anti HPV vaccination on cervical cancer incidence and HPV induced cervical lesions: consequences for clinical management. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **26**:129.
- Broudy, V.C., Lin, N.L., Buhring, H.J., Komatsu, N. & Kavanagh, T.J.** (1998) *Blood* **91**: 898-906.
- Bubenik J., Simova J., Hajkova R., Sobota V., Jamdlova T., Smahel M., Sobotkova E., and Vonka V.** (1999). Interleukin-2 gene therapy of residual disease in mice carrying tumours induced by HPV16. *Int. J. Oncol.* **14**: 593-597.
- Burd E. M.** (2003). Human Papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**: 1-17.
- Burk R. D., Kelly P., Ferdman J., Bronberg J., Vermund S. H., Deltovitz J. A., and Landesman S. H.** (1996). Declining presence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex. Transm. Dis.* **23**: 333-341.
- Burns J.E. and Maitland N.J.** (2005). Human Papillomavirus and cancer. *Microbiology today*, Aug. **05**: 116-120.
- Byrne M.A., Taylor-Robinson D., Munday P.E. and Harris J.R.** (1989). The common occurrence of human papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia in women infected by HIV. *AIDS* **3**: 379-382.
- Calarota S., Bratt G., Nordlund S., Hinkula J., Leandersson A.C., E. Sandstrom, and Wahren B.** (1998). Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. *Lancet* **351**: 1320–1325.
- Campo M.S., O'Neil B.W., Grindlay G.J., Curtis F., Knowles G. and Chandrachud L.** (1997). A peptide encoding a B-cell epitope from the N-terminus of the capsid protein L2 of bovine papillomavirus-4 prevents disease. *Virology* **234**: 261-266.
- Canizares M.C., Nicholson L. and Lomonossoff G.P.** (2005). Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunol. And Cell Biol.* **83**: 263-270.

- Carbone, F.R. and Bevan, M.J.** (1990). Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J. Exp.Med.* **171**: 377–387.
- Cella M., Sallusto F. and Lanzavecchia A.** (1997). Origin, maturation and antigen presentation function of dendritic cells. *Curr.Opin. Immunol.* **9**: 10-16.
- Chan P.K., Chan M.Y., Li W.W., Chan D.P., Cheung J.L., and Cheung A.S.** (2001). Association of human beta herpesviruses with the development of cervical cancer: bystanders or cofactors? *J. Clin. Pathol.* **54**: 48-53.
- Chang Y.E., Chen C.H., Ji H., Wang T.L., Hung K., Lee B.P., Huang A.Y., Kurman R.J., Pardoll D.M., and Wu T.** (2000). Antigen specific cancer immunotherapy using a GM-CSF secreting allogenic tumor cell-based vaccine. *Int. J. Cancer* **86 (5)**: 725-730.
- Chang Y. E., & Laimims L. A.** (2000). Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major trans criptional targets of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* **74**: 4174-4182.
- Chapman S., Kavanagh T. and Baulcombe D.** (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J.* **2**: 549.
- Chellappan S., Kraus, V.B., Kroger B., Munger K., Howley P.M., Phelps W.C. & Nevins J.R.** (1992). Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* **89 (10)**: 4549-4953.
- Chen C.H., Wu T.C.** (1998). Experimental vaccine strategy for cancer immunotherapy. *J. Biomed Sci* **5**: 231-252;
- Chen H, Li X.L. and Ljungdahl L.G.** (1997). Sequencing of a 1,3-1,4-b-D-Glucanase (Lichenase) from the Anaerobic Fungus Orpinomyces Strain PC-2: Properties of the Enzyme Expressed in Escherichia coli and Evidence that the Gene Has a Bacterial Origin. *Journal of bacteriology, Vol. 179, No. 19*: 6028–6034.
- Chen L., Thomas E.K., Hu S., Hellstrom I., and Hellstrom K.E.** (1991). Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 110-114.
- Chen X.S., Garcea R.L., Goldberg I., Casini G. and Harrison S.C.** (2000) Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Molecular Cell* **5**: 557-567.
- Chen Y.H., Huang L.H., and Chen T.M.** (1996). Differential effects of progestins and estrogens on long control regions of human papillomavirus types 16 and 18. *Biochen. Biophys. Res. Commun.* **224(3)**: 651-659.
- Cheng W.F., Haung C.F., Chai C.Y., Hsu K F., He L., Ling M., and Wu P.C.** (2001). Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J. Clin. Invest.* **108**: 669-678.

- Chong T, Chan W.K., Bernard H.U.** (1990) Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP1, steroid receptors and a possibly novel transcription factor, PVF: a model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Res.* **Feb 11, 18 (3):** 465-470.
- Chong, T., Apt, D., Gloss, B., Isa, M. & Bernard, H.U.** (1991) The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol.* **1991 Nov 65(11):**5933-5943.
- Chow L.T. and Broker T.R.** (1997). Small DNA tumor viruses. In: *Viral Pathogenesis Eds:* Nathanson N., Ahmed R., Gonzalez-Scarano F., Griffin D.E., Holmes K.V., Murphy F.A. and Robinson L., Rippincott-Raven, Philadelphia: 267-301.
- Christensen N.D., Cladel N.M. and Reed C.A.** (1995). Post-attachment neutralization of papillomaviruses by monoclonal and polyclonal antibodies. *Virology* **207:** 136-142.
- Christensen N.D., Hopfl R., DiAngelo S.L., Cladel N.M., Patrick S.D., Welsh P.A., Budgeon L.R., Reed C.A. and Kreider J.W.** (1994). *J.Gen.Virol.* **75:** 2271-2276.
- Chu N.R., Wu H.B., Wu T. C., Boux L.J., Seigel M.I., and Mizzen L. A.** (2000). Immunotherapy of a human papillomavirus type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising Mycobacterium bovis bacille Calmette - Guerin hsp65 and HPV16 E7. *Clin. Exp. Immunol.* **121:** 216-225.
- Cid-Arregui A., Juárez V., and Zur Hausen H.** (2003). A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies. *J. Virol.* **77:** 4928-4937.
- Clemens K.E., Brent R., Gyuris J. and Münger K.** (1995). Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein in vivo. *Virology* **214:** 289-293.
- Clerici M. et al.** (1997) Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J. Natl. Cancer Inst.* **89:** 245-250.
- Coker A.L., Russell R B., Bond S.M., Pirisi L., Liu Y., Mane M., Kokorina N., Gerasimova T., and Hermonat P. L.** (2001). Adeno-associated virus is associated with a lower risk of high-grade cervical neoplasia. *Exp. Mol. Pathol.* **70:** 83-89.
- Coleman N., Birley H.D., Renton A.N., Hanna N.F., Ryait B.K., Byrne M., Taylor-Robinson D., and Stanley M.A.** (1994). Immunological events in regressing genital warts. *Am. J. Clin, Pathol.* **102:** 768-774.
- Condon C., Watkins S.C., Cellutti C.M., Thompson K., and Falo L.D.** (1996). DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat. Med.* **2:** 1122-1128.
- Connor M.E. and Stern P.L.** (1990). Loss of MHC class-I expression in cervical carcinomas. *Int. J. Cancer* **46:** 1029-1034.
- Corden S.A., Sant-Cassia L.J., Easton A.J. and Morris A.G.** (1999). The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *Mol. Pathol.* **52:** 275-282.

- Cromme, F.V., Airey J., Heemels M.T., Ploegh H.L., Keating P.J., Stern P.L., Meijer C.J. and Walboomers J.M.** (1994). Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J. Exp. Med.* **179**: 335–340.
- Cubie H.A.** et al. (1989). Lymphoproliferative response to fusion proteins of human papillomaviruses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Epidemiol. Infect.* **103**: 625–632.
- Cullen A.P., Reid R., Champion M. and Lorincz A.T.** (1991). Analysis of the physical state of different papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J. Virol.* **65**: 606-612.
- Daniell H., Streatfield S.J. and Wycoff K.** (2001a). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* **6**: 219-226.
- Daniell H., Lee S.B., Panchal T. and Wiebe P.O.** (2001b). Expression of cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J. Mol. Biol.* **311**: 1001-1009.
- Daniell H., Khan M.S. and Alison L** (2002a). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.* **7**: 84-91.
- Daniell H. and Dhingra A.** (2002b). Multigene engineering: dawn of an exciting new era in biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**:136-141.
- Daniell H.** (2002c). Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat. Biotechnol.* **20**: 581-586.
- Da Silva D.M., Eiben G.L., Fausch S.C., Wakabayashi M.T., Rudolf M.P., Velders M.P., and Kast W.M.** (2001). Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J. Cell. Physiol.* **186**: 169-182.
- Davidson E.J. et al.** (2003). Immunological and clinical responses in women with vulval intraepithelial neoplasia vaccinated with a vaccinia virus encoding human papillomavirus 16/18 oncoproteins. *Cancer Res.* **63**: 6032–6041.
- Day P.M., Roden R.B., Lowy D.R. & Schiller J.T.** (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J. Virol.* **72**: 142-150.
- DeCosa B., Moar W., Lee S.B., Miller M. and Daniell H.** (2001). Overexpression of the Bt Cry2Aa” operon in chloroplasts leads to the formation of insecticidal crystals. *Nat. Biotechnol.* **19**: 71-74.
- Deck R.R., DeWitt C.M., Donnelly .J.J, Liu M.A., Ulmer J.B.** (1997). Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine* **15**: 71–78.

- De Gruijl T.D., Bontkes H.J., Stukart M.J., Walboomers J.M.M., Schiller J.T., Groot B.S., Chabaud M.R., Remmink A.J., Verheijen R.H.M., Helmerhorst T.J.M., Meijer C.J.L.M. and Scheper R.J.** (1997). Immunoglobulin G responses against human papillomavirus type 16 virus-like particles in a prospective nonintervention cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**: 630-638.
- De Gruijl T.D., Bontkes H.J., Walboomers J.M.M., Stukart M.J., Doekhie F.S., Remmink A.J., Helmerhorst T.J.M., Verheijen R.H.M., Duggan-Keen M.F., Stern P.L., Meijer C.J.L.M. and Scheper R.J.** (1998). Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. *Cancer Res.* **58**: 1700–1706.
- De Jong A. et al.** (2002). Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine. *Vaccine* **20**: 3456–3464.
- De Jong A., O'Neill T., Khan A.Y., Kwappenberg K.M., Chisholm S.E., Whittle N.R., Dobson J.A., Jack L.C., St Clair Roberts J.A., Offringa R., van der Burg S.H. and Hickling J.K.** (2002). Enhancement of human papillomavirus type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine. *Vaccine* **20 (29-30)**: 3456-3464.
- De Lorenzo G., D'Ovidio R. and Cervone F.** (2001) The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (pgips) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **Vol. 39**: 313-335.
- De Marco F., Hallez S., Brulet J.M., Gesché F., Marzano P., Flamini S., Marcante M.L., and Venuti A.** (2003). DNA vaccine against HPV16 E7-expressing tumour cells. *Anticancer Res.* **23**: 1449-1454.
- De Villiers E.M, Fauquet C, Broker TR, et al.** (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**: 17–27.
- De Wilde C., De Neve M., De Rycke R., Bruyns A.M., De Jaeger G., Van Montagu M., Depicker A. & Engler G.** (1996) *Plant Sci.* **114**, 233-241.
- Deliyannis G, Boyle J.S., Brady J.L., Brown L.E., Lew A.M.** (2000). A fusion DNA vaccine that targets antigen-presenting cells increases protection from viral challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 6676-6680.
- Dell G. and Gaston K.** (2001). Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 1923-1942.
- Desaintes C., Demeret C., Goyat S., Yaniv M. and Thierry F.** (1997). Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cervical carcinoma cells leads to apoptosis. *EMBO J.* **16**: 504-514.
- Di Lonardo A., Marcante M.L., Poggiali F., and Venuti A.** (1998). HPV16 E7 antibody levels in cervical cancer patients: before and after treatment. *J. Med. Virol.* **54**: 192.

- Di Matteo A., Federici L., Mattei B., Salvi G., Johnson K.A., Savino C., De Lorenzo G., Tsernoglou D., and Cervone F.** (2003). The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 10124-10128.
- Di Paolo J.A., Popescu N.C., Alvarez L. & Woodworth C.D.** (1993). Cellular and molecular alterations in human epithelial cells transformed by recombinant human papillomavirus DNA. *Crit Rev Oncog.* **4 (4)**: 337-360.
- Dick F. A. & Dyson N. J.** (2002). Three regions of the pRb pocket domain affect its inactivation by human papillomavirus E7 protein. *J. Virol.* **76**: 6224-6234.
- Doan T., Herd K., Ramshaw I., Thomson S., and Tindle R. W.** (2005). A poly-tope DNA vaccine elicits multiple effector and memory CTL responses and protects against human papillomavirus 16 E7-expressing tumour. *Cancer Immunol. Immunother.* **54 (2)**: 157-171.
- Dong X.P., Tubenrauch F., Beyer-Finkler E., and Pfister H.** (1994). Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV16 DNA from cervical cancers. *Int. J. Cancer* **58**: 803-808.
- Doorbar J.** (1996). The E4 proteins and their role in the viral life cycle. In: *Papillomavirus Reviews: Current research on Papillomaviruses*. Ed.: Lacey C., Leeds University Press, Leeds: 31-38.
- Doran P.M.** (2002). Properties and applications of hairy-root cultures. In: OKSMAN-CALDENTY, K.-M. and BARZ, W.H., eds. *Plant biotechnology and transgenic plants*. New York, Mercel Dekker Inc. P. 143-162.
- Duensing S., Lee L., Duensing A., Basile J., Piboonniyom S., Gonzalez S. et al.** (2000). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 10002-10007.
- Duensing S., Duensing A., Crum C.P., and Münger K.** (2001). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res.* **61**: 2356-2360.
- Duggan-Keen M.F., Brown M.D., Stacey S.N. and Stern P.L.** (1998). Papillomavirus vaccine. *Frontiers in Biosciences* **3**: 1192-1208.
- Dupuy C., Buzoni-Gatel D., Touze A., Le Cann P., Bout D., and Coursaget P.** (1997). Cell mediated immunity induced in mice by HPV16 L1 virus-like particles. *Microb. Pathol.* **22 (4)**: 219-225.
- Dürst M., Kleinheinz A., Hotz M. and Gissmann L.** (1985). The physical state of human papillomavirus 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J. Gen. Virol.* **66**: 1515-1522.
- Dyson N., Howley P.M., Munger K. & Harlow E.** (1989) *Science* **243**: 934-937.

- Edmonds C. & Vousden K.H.** (1989). A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J. Virol.* **63**: 2650-2656.
- Elson D.A, Riley R.R., Lacey A., Thordarson G., Talamantes F.J. and Arbeit J.M.** (2000). Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer Res.* **60**: 1267- 1275.
- Evander M., Frazer I.H., Payne Y.M., Qi Y. M., Hengst K., Mc Millan N.A.J.**(1997). Identification of the alpha (6) integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol* **71**: 2449-2456.
- Feltkamp M.C., Smits H.L., Vierboom M.P., Minnaar R.P., De Jongh B.M., Drijfhout J.W., Ter Schegget J., Melief C.J. and Kast W.M.** (1993). Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J. Immunol.* **23**: 2242.
- Feltkamp M. C., Vreugdenhil G. R., Dierboon M. P., Ras E., van der Burg S. H., ter Schegget J., Melief C. J. M., and Kast W. M.** (1995). Cytotoxic T lymphocytes raised against a subdominant epitope offered as a synthetic peptide eradicate human papillomavirus type 16-induced tumors. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2242-2249.
- Feltquate D.M., Heaney S., Wedster R.G., and Robinson H.L.** (1997). Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J. Immunol.* **158**: 2278-2284.
- Ferlay J., Bray F., and Pisani P.** (2001). Globocan 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Lyons, France: IARC Press.
- Fernando G.J., Stewart T.J., Tindle R.W. and Frazer I.H.** (1998). Vaccine-induced Th1-type responses are dominant over Th2-type responses in the short term whereas pre-existing Th2 responses are dominant in the longer term. *Scand. J. Immunol.* **47**: 459.
- Fernando G.J.P., Murray B., Zhou J. and Frazer I.H.** (1999). Expression, purification and immunological characterization of the transforming protein E7, from cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *Clin. Exp. Immunol.* **115**: 397.
- Ferrara A. et al.** (2003). Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer II: results of a clinical pilot study in 15 individual patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **129**: 521–530.
- Ferrara A., Nonn M., Sehr P., Schreckenberger C., Pawlita M., Durst M., Schnender A., and Kaufmann A.M.** (2003). Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer II: results of a clinical pilot study in 15 individual patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol* **129** (9): 521-530.
- Firzlaff J.M., Luscher B and Eisenman R.N.** (1991). Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5187-5191.

- Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P., and Twyman R.M.** (2004). Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 152-158.
- Flores E.R. & Lambert P. F.** (1997). Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J. Virol.* **71**: 7167-7179.
- Franconi R., Roggero P., Piazzini P., Arias F. J., Desiderio A., Bitti O., Pashkou-lov D., Mattei B., Bracci L., Masenga V., Milne R. G., and Benvenuto E.** (1999). Functional expression in bacteria and plants of an scFv antibody fragment against tospoviruses. *Immunotechnology* **4**: 189-201.
- Franconi R., Di Bonito P., Dibello F., Accardi L., Muller A., Cirilli A., Simeone P., Donà M. G., Venuti A., and Giorgi C.** (2002). Plant-derived human papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection. *Cancer Res.* **62**: 3654-3658.
- Franconi R., Massa S., Illiano E., Muller A., Cirilli A., Accardi L., Di Bonito P., Giorgi C., and Venuti A.** (in press). Exploiting the plant secretory pathway to improve the anti-cancer activity of a plant-derived HPV16 E7 vaccine. *Int. J. Immunopath. Ph.*
- Franconi R. and Venuti A.** (2005). HPV vaccines in plants: an appetising solution to control infection and associated cancers. In: Papillomavirus research, from natural history to vaccines and beyond. Ed. Campo S. Caister Academic Press: 357-372.
- Frazer I.H.** (2004). Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature Rev. Immunol.* **4**: 46-54.
- Frediani M, Cremonini R., Salvi G., Caprari C., Desiderio A., D'Ovidio R., Cervone F., and De Lorenzo G.** (1993). Cytological localization of the pgip genes in the embryo suspensor cells of *Phaseolus vulgaris* L. *Theor Appl Genet* **87**: 369-373.
- Fu T.M., Ulmer J.B., and Caulfield M.J.** (1997). Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen-presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol. Med.* **3**: 362-371.
- Fujikawa K., Furuse M., Uwabe K.I., Maki H. & Yoshie O.** (1994) Nuclear localization and transforming activity of human papillomavirus type 16 E7-beta-galactosidase fusion protein: characterization of the nuclear localization sequence. *Virology* **204** (2): 789-793.
- Fynan E.F., Webster R.G., Fuller D.H., Haynes J.R., Santoro J.C., Robinson H.L.** (1993). DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11478–11482.
- Garcia-Carranca A., Thierry F. and Yaniv M.** (1988). Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J Virol*, **62**: 4321–4330.
- Garmory H.S., Brown K. A. and Titball R.W.** (2003). DNA vaccines: improving expression of antigens *Genetic Vaccines and Therapy* **1**:2.

- Gerard C.M., Baudson N., Kraemer K., Bruk C., Garcon N., Paterson Y., Pan Z.K. and Pardoll D.** (2001). Therapeutic potential of protein and adjuvant vaccinations on tumor growth. *Vaccine* **19**: 2583-2589.
- Gerber S., Lane C., Brown D.M., Lord E., Dilorenzo M., Clements J.D., Rybicky E., Williamson A.L. and Rose C.** (2001). Human papillomavirus virus-like particles are efficient oral immunogens when coadministered with E.coli heat-labile enterotoxin mutant R192G or CpG DNA. *J. Virol.* **75 (10)**: 4752-4760.
- Giddings G.** (2001). Transgenic plants as protein factories. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 450-454.
- Giles S.** (2003). Transmission of HPV. *Can. Med. Assoc. J.* **168 (11)**.
- Gleba Y., Marillonnet S. and Klimyuk V** (2004). Engineering viral expression vectors for plants: the “full” virus and the deconstructed virus’ strategies. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 182-188.
- Goldstone S. E., Palefsky, J. M., Winnett, M. T. & Neefe, J. R.** (2002). Activity of HspE7, a novel immunotherapy, in patients with anogenital warts. *Dis. Colon Rectum* **45**: 502–507.
- Gomord V. and Faye F.** (2004). Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 171-181.
- Gonzalez S.L., Stremlau M., He L., Basile J.R., and Münger K.** (2001). Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J. Virol.* **75**: 7583-7591.
- Goodman R. M., Horne R. W., and Hobart J. M.** (1975). Reconstitution of potato virus X in vitro. *Virology* **68**: 299-308.
- Graham, Smiley J, Russell W.C., Nairn R.** (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.J. *Gen Virol Jul* **36 (1)**: 59-74.
- Grana X., Garriga J., and Mayol X.** (1998). Role of the retinoblastoma protein family, pRb, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* **17**: 3365-3383.
- Greenfield I., Nickerson J., Penman S. & Stanley M.** (1991). Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* **88 (24)**: 11217-11221.
- Grossman S.R. & Laimins L.A.** (1989). E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene* **4 (9)**:1089-1093.
- Gunn G.R., Zubair A., Peters C., Pan Z.K., Wu T.C., and Paterson Y.** (2001). Listeria monocytogenes vaccine vectors that express different molecular forms of human papillomavirus 16 E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV16. *J. Immunol.* **167**: 6471-6479.

- Gurunathan S., Klinman D.M., Seder R.A.** (2000). DNA vaccines: Immunology application and optimisation. *Annu Rev Immunol* **18**: 927-974.
- Haddad D., Liljeqvist S., Stahl S., Andersson I., Perlmann P., Berzins K., Ahlborg N.** (1997). Comparative study of DNA-based immunization vectors: effect of secretion signals on the antibody responses in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **18**: 193–202.
- Hagensee M.E., Yaegashi N. and Galloway D.A.** (1993). Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* **67**: 315-322.
- Halbert C.L., Demers G.W., and Galloway D.A.** (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* **65**: 473-478.
- Hallez S., Detremmerie O., Giannouli C., Thielemans K., Gajewski T.F., Burney A., and Leo O.** (1999). Interleukin-12-secreting human papillo-mavirus type 16-transformed cells provide a potent cancer vaccine that generates E7-directed immunity. *Int. J. Cancer* **81**: 428-437.
- Halpert R., Fruchter R.G., Sedlis A., Butt K., Boyce J.G. and Sillman F.H.** (1986). Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet. Gynecol.* **68**: 251-258.
- Hamill J.D. and Lidgett J.A.** (1997) Hairy root cultures - Opportunities and key protocols for studies in metabolic engineering. In: Doran, Pauline M. eds. Hairy roots - *Culture and applications*. Netherlands, Harwood Academic Publishers 1-31.
- Harro C.D., Pang Y.Y.S., Roden R.R.B.S., Hildesheim A., Wang Z., Reynolds M.J., Mast T.C., Robinson R., Murphy B.R., Karron R.A., Dillner J., Schiller J.T. and Lowy D.R.** (2001). Safety and immuno-nogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J. Natl. Cancer I.* **93**: 284-292.
- Hawley-Nelson P., Vousden K.H., Hubbert N.L., Lowy D.R. & Schiller J.T.** (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* **8** (12):3905-3910.
- Heck D.V., Yee C.L., Howley P.M., and Münger K.** (1992). Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89** (10): 4442–4446.
- Helen S., Garmory K., Brown A. and Titball R.W.** (2001). DNA vaccines: improving expression of antigens *Genetic Vaccines and Therapy* **1**: 2.
- Helt A.M., Funk J.O., and Galloway D.A.** (2002). Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. *J. Virol.* **76**: 10559-10568.

- Henrik U. Stotz, Ann I. T. Powell, Susan E. Damon, I. Carl Greve, Alan B. Bennett and John M. Labavitch** (1993). Molecular Characterization of a Polygalacturonase Inhibitor from *Pyrus communis* 1. cv Bartlett' *Plant Physiol.* **102**: 133-138.
- Ho G.Y., Buck R.D., Klein S., Kadish A.S., Chang C.J., Palan P., Basu J., Tachezy R., Lewis R. and Romney S.** (1995). Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**: 1365-1371.
- Hobbs S., Warkentin T.D. and DeLong C.M.** (1993). Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol. Biol.* **21**: 17-26.
- Hood E.E., Woodard S.L. and Horn M.E.** (2002). Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants – myths and realities. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 630-635.
- Howley P.M. Fields B.N. and Knipe D.M.** (1996). Papillomavirinae:the viruses and their replication. In *Fields virology*,, Eds Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers 2045-2076.
- Huang P.S., Patrick D.R., Edwards G., Goodhart P.J., Huber H.E., Miles L., Garsky V.M., Oliff A. and Heimbrook D.C.** (1993). Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Molecular and Cellular Biology*, **13** (2): 953–960.
- Hubbert N.L., Sedman S.A. & Schiller J.T.** (1992). Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol.* **66** (10): 6237-6241.
- Hung C. F., Cheng W. F., He L., Juang J., Lin C. T., and Wu T. C.** (2003). Enhancing major histocompatibility complex class I antigen presentation by targeting antigen to centrosomes. *Cancer Res.* **63**: 2393-2398.
- Hung C. F., Cheng W. F., Hsu K. S., Chai C. Y., He L., Ling M., and Wu T. C.** (2001 a). Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen. *Cancer Res.* **61**: 3698-3703.
- Hung C.F., Cheng W.F., Chai C.Y., Hsu K.F., He L, Ling M, Wu T.C.** (2001b). Improving vaccine potency through intracellular spreading and enhanced MHC class I presentation of antigen. *The Journal of Immunology* **166**: 5733-5740.
- Hung C.F., Hsu K.S., Cheng W.F., Chai C.Y., He L., Ling M., and Wu T.C.** (2001c). Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to a gene encoding the extracellular domain of Fms-like tyrosine kinase 3-ligand. *Cancer Res.* **61**: 1080-1088.
- Hung C.F., He L., Juang J., Lin T.J., Ling M., and Wu T.C.** (2002). Improving DNA vaccine potency by linking Marek's disease virus type 1 VP22 to an antigen. *J. Virol.* **76**: 2676-2682.

- Hwang E.S., Naeger L.K. and Di Maio D.** (1996). Activation of the endogenous p53 growth inhibitory pathway in HeLa cervical carcinoma cells by expression of the bovine papillomavirus E2 gene. *Oncogene* **12**: 795-803.
- Hwang E.S., Riese D.J.I.I., Settleman J., Nilson L.A., Honig J., Flynn S. et al.** (1993). Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene. *J. Virol.* **67**: 3720-3729.
- Ishii K.J., Weiss W.R., Ichino D., Verthelyi D., Klinman D.M.** (1999). Activity and safety of DNA plasmids encoding IL-4 and IFN- γ . *Gene Ther.* **6**: 237-244.
- Iwasaki A. and Kelsall B.L.** (2001). Unique function of CD11b⁺, CD8⁺, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J. Immunol.* **166**: 4884-4890.
- Jacobs M.V., Snijders P.J., van den Brule A.J., Helmerhorst P.J., Meijer C.J., and Walboomers J.M.** (1997). A general primer P5+/GP6(+)-mediated PCR enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 791-795.
- Jaraquemada D., Marti M. and Long E.O.** (1990). An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* **172**: 947-954.
- Jeon S., Allen-Hoffmann B.L., and Lambert P.F.** (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Virol.* **69**: 2989-2997.
- Jeon S. and Lambert P.F.** (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 1654-1658.
- Ji H., Wang T.L., Chen C.H., Hung C.F., Pai S., Lin K.Y., Kurman R.J., Pardoll D.M., and Wu T.C.** (1999). Targeting HPV16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine HPV16 E7-expressing tumors. *Hum. Gene Ther.* **10**: 2727-2740.
- Jones R.E., Heimbrook D.C., Huber H.E., Wegrzyn R.J., Rotberg N.S., Stauffer K.J., Lumma P.K., Garsky V.M., and Oliff A.** (1992). Specific N-methylations of HPV-16 E7 peptides alter binding to the retinoblastoma suppressor protein. *Journal of Biological Chemistry*, **267**(2): 908-912.
- Jones R.E., Wegrzyn R.J., Patrick D.R., Balishin N.L., Vuocolo G.A., Riemen M.W., Defeo-Jones D., Garsky V.M., Heimbrook D.C., and Oliff A.** (1990). Identification of HPV-16 E7 peptides that are potent antagonists of E7 binding to the retinoblastoma suppressor protein. *Journal of Biological Chemistry* **265** (22):12782-12785.
- Kadish A.S., Ho G.Y.F., Burk R.D., Wang Y.X., Romney S.L. Ledwidge R. and Angeletti R.H.** (1997). Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**: 1285-1293.

- Kadish A.S., Einstein M.H.** (2005). Vaccine strategies for human papillomavirus-associated cancers. *Curr. Opin. Oncol.* **17**: 456.
- Kalantari M., Blennow E., Hagmar B. and Johansson B.** (2001). Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn. Mol. Pathol.* **10**: 46-54.
- Kapila J., De Rycke R., Van Montagu M and Angenon G.** (1997). An agrobacterium mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* **122**: 101-108.
- Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M., Pniewski T., Letellier M., Lisowa O., Yusibov V., Koprowski H., Plucienniczak A. and Legocki A.B.** (1999). A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J.* **13**: 1796-1799.
- Kaufmann A.M., Stern P.L., Rankin E.M., Sommer H., and Nuessler V.** (2002). Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* **8**: 3676-3685.
- Kawabata K., Takakura Y, Hashida M.** (1995). The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm. Res.* **12**: 825–830.
- Kawana K., Yoshikawa H., Taketani J., Yoshiike K., and Kanda T.** (1998). In vitro construction of pseudovirions of human papillomavirus type 16: incorporation of plasmid DNA into reassembled L1/L2 capsids. *J. Virol.* **72**: 10298-10300.
- Kawana K., Yoshikawa H., Taketani Y., Yoshiike K. and Kanda T.** (1999). Common neutralization epitope in minor capsid protein L2 of human papillomavirus type 16 and 6. *J. Virol.* **73**: 6188-6190.
- Kelso A.** (1995). Th1 and Th2 subsets: paradigms lost?. *Immunol. Today* **16**: 374-379.
- Khang J.H., Jin S.W., Yoon H.S., Yoo W. D., Kim H.S., Hahm K.S., et al.** (1997). Analysis of the conformational change of recombinant human papillomavirus type 18 E7 protein induced by metal binding. *Virus Res.* **49**: 147-154.
- Kim C.J., Um S.J., Kim T.Y., Kim E.J., Park T.C., Kim S.J. et al.** (2000). Regulation of cell growth and HPV genes by exogenous estrogen in cervical cancer cells. *Int. J. Obstet. Gynecol.* **10**: 157-164.
- Kim M.S. and Sin J.I.** (2005). Both antigen optimization and Lysosomal targeting are required for enhanced anti-tumour protective immunity in a human papillomavirus E7-expressing animal tumor model. *Immunology* **116** (2): 255-266.
- Kim T.W., Hung C.F., Boyd D., Juang J., He L., Kim J.W., Hardwick J.M., and Wu T.C.** (2003). Enhancing DNA vaccine potency by combining a strategy to prolong dendritic cell life with intracellular targeting strategies. *J. Immunol.* **171**: 2970-2976.

- Kim T.W., Hung C.F., Boyd D., Juang J., He L., Kim J.W., Hardwick J.M., and Wu T.C.** (2003a). Enhancing DNA vaccine potency by combining a strategy to prolong dendritic cell life with intracellular targeting strategies. *J. Immunol.* **171**: 2970-2976.
- Kim T.W., Hung C.F., Ling M., Juang J., He L., Hardwick J.M., Kumar S., and Wu T.C.** (2003b). Enhancing DNA vaccine potency by coadministration of DNA encoding antiapoptotic proteins. *J. Clin. Invest.* **112**: 109-117.
- Kim T.W., Hung C.F., Boyd D., He L., Ling M., Kaiserman D., Bird P.I., and Wu T.C.** (2004). Enhancement of DNA vaccine potency by coadministration of a tumor antigen gene and DNA encoding serine protease inhibitor-6. *Cancer Res.* **64**: 400-405.
- Kim T. Y., Myoung H. J., Kim J. H., Moon I. S., Kim T. G., Ahn W. S., and Sin J. I.** (2002). Both E7 and CpG-oligodeoxynucleotide are required for protective immunity against challenge with human papillomavirus 16 (E6/E7) immortalized tumor cells. *Cancer Res.* **62**: 7234-7240.
- Kirk D., Mason H.S. and Tacket C.** (2004). *Trial investigation.*
- Kirk D.D. and Webb S.R.** (2005). The next 15 years: taking plant-made vaccine beyond proof of concepts.
- Kirnbauer R., Booy F., Cheng N., Lowy D.R. & Schiller J.T.** (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 12180-12184.
- Kirnbauer R., Taub J., Greenstone H., Roden R., Durst M., Gissmann L., Lowy D. R., and Schiller J. T.** (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J. Virol.* **67**: 6929-6936.
- Kirnbauer R., Hubbert N.L., Wheeler C.M., Becker T.M., Lowy D.R. and Schiller J.T.** (1997). A virus-like particle enzyme-linked-immunosorbent-assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**: 494-499.
- Klavinskis L.S., Gao L, Barnfield C, Lehner T, Parker S.** (1997). Mucosal immunization with DNA-liposome complexes. *Vaccine* **15**: 818–820.
- Klencke B. et al.** (2002). Encapsulated plasmid DNA treatment for human papillomavirus 16-associated anal dysplasia: a Phase I study of ZYC101. *Clin. Cancer Res.* **8**: 1028–1037.
- Klinman D.M., Takeno M., Ichino M., Gu M., Yamshchikov G., Mor G., Conover J.** (1997). DNA vaccines: safety and efficacy issues. *Springer Semin. Immunopathol.* **19**: 245–256.
- Klinman D.M., Yamshchikov G. and Ishigatsubo Y.** (1997). Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.* **158**: 3635-3639.
- Klinman D.M., Currie D., Gurstel I., and Verthelyi D.** (2004). Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol. Rev.* **199**: 201-216.

- Koenig R. & Letemann D.E.** (1989). Potato X virus. *Descript. Plant. Vir.* 354.
- Komakhin R.A., Abdeeva I.A., Salekhi Dzhuzani G.R., Goldenkova I.V., Zhuchenko A.A.** (2005) Thermostable lichenase as a translational reporter. *Genetika* **41** (1): 30-39.
- Koprowsky H. and Yusibov V.** (2001). The green revolution: plants as eterologous expression vectors. *Vaccine* **19**. 2734-2741.
- Koutsky L.A., Ault K.A., Wheeler C.M., Brown D.R., Barr E., Alvarez F.B., Chiacchierini L. M., and Jansen K.U.** (2002). A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *New Engl. J. Med.* **347**: 1645-1651.
- Koutsky L.A., K.A. Ault, C.M. Wheeler, D.R. Brown, E. Barr, F.B. Alvarez, L.M. Chiacchierini and K.U. Jansen.** (2002). A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N. Engl. J. Med.* **347**: 1645.
- Kozak M.** (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **196**: 947-950.
- Kozak M.** (1997). Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positins +5 and +6. *EMBO J.*, **16**: 2482-2492.
- Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldshmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., and Klinman D.M.** (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**: 546-549.
- Krieg A. M., Wu T., Weeratna R., Efler S.M., Love-Homan L., Yang L., Yi A.K., Short D. and Davis H.L.** (1998). Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Oroc.Natl Acad.Sci. USA* **95**: 12631-12636.
- Krul M.R., Tijhaar E.J., Kleijne J.A., Van Loon A.N., Nievers M.G., Schipper H., Geerse L., Van der Kolk M., Steerenberg P.A., Mooi F.R., and Den Otter W.** (1996). Induction of an antibody response in mice against human papillomavirus type 16 after immunization with HPV recombinant Salmonella strains. *Cancer Immunol. Immunother* **43**: 44-48.
- Kuklin N, Daheshia M, Karem K, Manickan E, Rouse B.T.** (1997). Induction of mucosal immunity against herpes simplex virus by plasmid DNA immunization. *J. Virol.* **71**:3138–3145.
- Laga M., Icenogle J.P., Marsella R., Manoka A.T., Nzila N., Ryder R.W., Vermund S.H., Heyward W.L., Nelson A. and Reeves W.C.** (1992). Genital papillomavirus infection and cervical dysplasia-opportunistic complication of HIV infection. *Int. J. Cancer* **50**: 45-48.
- Lazcano-Ponce E., Herrero R., Munoz N., Cruz A., Shah K.V., Alonso P. et al.** (2001). Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int. J. Cancer.* **91**: 412-420.

- Le Cann P., Coursaget P., Iochmann S. and Touze A.** (1994). Self-assembly of human papillomavirus type 16 capsids by expression of the L1 protein in insect cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**: 269-274.
- Lee A.K. and Eisinger M.** (1976). Cell-mediated immunity (CMI) to human wart virus and wart-associated tissue antigens. *Clin. Exp. Immunol.* **26**: 419-424.
- Leiserowitz G.S., Hall K.S., Foster C.A., Hitchcock M.E., Christensen N.D., Heim K. and Smith L.H.** (1997). Detection of serologic neutralizing antibodies against HPV-11 in patients with *condyloma acuminata* and cervical dysplasia using an *in vitro* assay. *Gynecol. Oncol.* **66**: 295-299.
- Lenz P., Day P.M., Pang Y.Y., Frye S.A., Jensen P.N., Lowy D.R., and Schiller T.** (2001). Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J. Immunol.* **166**: 5346-5355.
- Lewis P.J., Cox G.J.M., van Drunen L., van den Hurk S, Babiuk L.A** (1997). Polynucleotide vaccines in animals: enhancing and modulating responses. *Vaccine* **15**: 861-864.
- Li M., Beard P., Estes P.A., Lyon M.K. and Garcea R.L.** (1998). Intercapsomeric disulphide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J. Virol* **72**: 2160-2167.
- Liaw K.L., Hildesheim A., Burk R.D., Gravitt P., Wacholder S., Manos M.M. et al.** (2001). A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J. Infect. Dis.* **183**: 8-15.
- Lin C.T., Chang T.C., Chao A, Dzung E, Soong Y.K., Hung C.F., Lai C.H.** (2005) Enhancement of DNA vaccine potency through linkage of antigen gene to ER chaperone molecules, ER-60, tapasin, and calnexin. *J Biomed Sci* **12 (2)**: 279-287.
- Lin K.Y., Guarneri F.G., Staveley-O'Carroll K.F., Levitsky H.I., August J.T., Pardoll D.M., and Wu T.C.** (1996). Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* **56**: 21-26.
- Liu J.S., Kuo S.R., Broker T.R. and Chow L.T.** (1995). The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2 and E2c proteins in cell-free DNA replication. *J Biol Chem* **270**: 27283-27291.
- Liu W.J., Gao F.G., Zhao K.N., Zhao W., Fernando G.J.G., Ranjeni T. and Frazer I.H.** (2002b). Codon modified Human Papillomavirus Type 16 E7 DNA vaccine enhances Cytotoxic T-lymphocytes induction and anti-tumour activity. *Virology* **301**: 43-52.
- Liu Y.J.** (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**: 259-262.
- Livingston J.B., Lu S, Robinson H, Anderson D.J.** (1998). Immunization of the female genital tract with a DNA-based vaccine. *Infect. Immun.* **66**: 322-329.

- Lopez-Borges S., Gallego M.I. and Lazo P.A.** (1998). Recurrent integration of papillomavirus DNA within the human 12q14-15 uterine breakpoint region in genital carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* **23**: 55-60.
- Lowe R.S., Brown D.R., Bryan J.T., Cook J.C., George H.A., Hofmann K.J., Hurni W.M., Joyce J., Lehman E.D., Markus H.Z., Neeper M.T., Schultz L.D., Shaw A.R., and Jansen K.U.** (1997). Human papillomavirus type 11 neutralizing antibodies in the serum and genital mucosal secretions of African green monkeys immunized with HPV11 virus-like particles expressed in yeast. *J. Infect Dis.* **176**: 1141-1145.
- Lu S., Wyatt R, Richmond J.F., Mustafa F, Wang S, Weng J, Montefiori D.C., Sodroski J, Robinson H.L.** (1998). Immunogenicity of DNA vaccines expressing human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein with and without deletions in the V1/2 and V3 regions. *AIDS Res. Hum. Retrovir* **14**: 151-155.
- Lu W., Arraes L.C., Ferreira W.T. and Andrieu J.M.** (2004). Therapeutic dendritic cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat. Med.* **10**: 1359-1365.
- Ludmerer S.W., Benincasa D., Mark G.E. and Christensen N.D.** (1997). A neutralizing epitope of human papillomavirus type 11 is principally described by a continuous set of residues which overlap a distinct linear, surfac-exposed epitope. *J. Virol.* **71**: 3834-3839.
- Luxton, J.C., Rose R.C., Coletart T., Wilson P. and Shepherd P.S** (1997). Serological and T helper cell responses to human papillomavirus type 16 L1 in women with cervical dysplasia or cervical carcinoma and in healthy controls. *J. Gen. Virol.* **78**: 917-923.
- Ma J.K., Hikmat B.Y., Wycoff K., Vine N.D., Chargelegue D., Yu L., Hein M.B., Lehner T.** (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* **4**: 601-606.
- Ma J.K., Drake P.M.W. and Christou P.** (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.* **4**: 794-805.
- Ma J.K-C., Chikwamba R., Sparrow P., Fischer R., Mahoney R. and Twyman R. M.** (2005). Plant-derived pharmaceuticals – the road forward. *TRENDS in Plant Science* **10** (12).
- MacGregor R.R., Boyer J.D., Ugen K.E., Tebas P., Higgins T.J., Baine Y., Ciccarelli R.B., Ginsberg R.S., and Weiner D.B.** (2005). Plasmid vaccination of stable HIV-positive subjects on antiviral treatment results in enhanced CD8 T-cell immunity and increased control of viral “blips”. *Vaccine* **23**: 2066-2073.
- Magnusson P.K.E., Lichtenstein P., and Gyllenstein U.B.** (2000). Heritability of cervical tumors. *Int. J. Cancer* **88**: 698-701.
- Mannhardt B., Weinzimer S.A., Wagner M., Fiedler M., Cohen P., and Jansen-Dürr P.** (2000). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein binds and inactivates growth-inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 6483-6495.

- Marodon G., Rocha B.** (1994). Activation and 'deletion' of self-reactive mature and immature T cells during ontogeny of Mls-1a mice: implications for neonatal tolerance induction. *Int. Immunol.* **6**: 1899–1904.
- Martin T., Parker S.E., Hedstrom R., Le T., Hoffman S.L., Norman J., Hobart P., Lew D.** (1999). Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum. Gene Ther.* **10**: 759–768.
- Martinez C., Petruccelli S., Giulietti A.M. and Alvarez M.A.** (2005). Expression of the antibody 14D9 in *Nicotiana Tabacum* hairy roots. *Plant Biotech.* **8** (2).
- Marusic C., Rizza P., and Lattanzi L.** (2001). Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **75**: 8434-8439.
- Mason H.S., Haq T.A., Clements J.D. and Arntzen C.J.** (1998). Edible vaccine protects mice against *E. coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* **16**: 1336-1343.
- Massimi P. and Banks L.** (1997). Repression of p53 transcriptional activity by the HPV E7 proteins. *Virology* **227**: 255-259.
- Matorras R., Ariceta J.M., Rementeria A., Corral J., Gutierrez de Teran G., Diez J. et al.** (1991). Human immunodeficiency virus-induced immunosuppression : a risk factor for human papillomavirus infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **164**: 42-44.
- Matzinger P.** (1994). Tolerance, danger and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 991-1045.
- Maw R.D., Reitano M, Roy M.** (1998). An international survey of patients with genital warts: perceptions regarding treatment and impact on lifestyle. *Int J STD AIDS* **9**: 571–578.
- May M., Dong X.P., Beyer-Finkler E., Stubenrauch F., Fuchs P.G. and Pfister H.** (1994). The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escape from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J.* **13**: 1460-1466.
- McCormick A.A., Kumagai M.H., Hanley K., Turpen T.H., Hakim I., Grill L.K., Tusè 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.* **96**: 703.
- McCormick A.A., Reinl S.J., Cameron T.I., Vojdani F., Fronefield M., Levy R. and Tusè 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.
- McIntyre M.C., Frattini M.G., Grossman S.R. and Laimims L.A.** (1993). Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerisation, and transformation but not for Rb binding. *J. Virol.* **67**: 3142-3150.

- McIntyre M.C., Ruesch M.N. and Laimins L.A.** (1996). Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* **215**: 73-82.
- Menkaus T.J., Bai Y., Zhang C., Nikolov Z.L. and Glatz C.E.** (2004). Considerations for the recovery of recombinant proteins from plants. *Biotechnol. Prog.* **20**: 1001-1014.
- Michel N., Osen W., Gissmann L., Schumaker T.N.M., Zentgraf H., and Müller M.** (2002). Enhanced immunogenicity of HPV16 E7 fusion proteins in DNA vaccination. *Virology* **294**: 47-59.
- Moniz M., Ling M., Hung C.F., and Wu T.C.** (2003). HPV DNA vaccines. *Frontiers in Bioscience* **8**: 55-68.
- Mor G., Singla M., Steinberg A.D., Hoffman S.L., Okuda K., Klinman D.M.** (1997). Do DNA vaccines induce autoimmune disease? *Hum. Gene Ther.* **8**: 293–300.
- Muderspach L. et al.** (2000). A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive. *Clin. Cancer Res.* **6**: 3406–3416.
- Muderspach L., Wilczynski S., Roman L., Bade L., Felix J., Small L.A., Cast W.M., Fascio G., Marty V. and Weber J.S.** (2000). A phase I trial of a human papillomavirus peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV16 positive. *Clin. Canc. Res.* **6**: 3406-3416.
- Muller H. & Helin K.** (2000). The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* **1470**: M1-M12.
- Münger K., Phelps W.C., Bubb V., Howley P.M. & Schlegel R.** (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol.* **63** (10):4417-4421.
- Münger K., Werness B.A., Dyson N., Phelps W.C., Harlow E. and Howley P.M.** (1989) Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *Embo Journal*, **8**(13): 4099–4105.
- Münger K., Yee C.L., Phelps W.C., Pietenpol J.A., Moses H.L. and Howley P.M.** (1991) Biochemical and biological differences between E7 oncoproteins of the high- and low-risk human papillomavirus types are determined by amino-terminal sequences. *Journal of Virology*, **65**(7):3943–3948.
- Münger K., Basile J.R., Duensing S., Eichten A., Gonzales S.L., Grace M., and Zacny V.L.** (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* **20**: 7888-7898.
- Murakami M., Gurski K.J., Marincola F.M., Ackland J., and Steller M.A.** (1999). Induction of specific CD8⁺ T-lymphocyte responses using a human papillomavirus 16 E6/E7 fusion protein and autologous dendritic cells. *Cancer Res.* **59**: 1184-1187.

- Nakagawa M., Viscidi R., Deshmukh I., Da Costa M., Palefsky J.M., Farhat S., and Moscichi A.D** (2002). Time course of humoral and cell-mediated immune responses to human papillomavirus type 16 in infected women. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 877-882.
- Nardelli - Haesliger D., Roden R., Balzelli C., Potts A., Schiller J., and De Grandi P.** (1999). Mucosal but not parenteral immunization with purified human papillomavirus type 16 virus-like particles induces neutralizing titers of antibodies throughout the estrous cycle of mice. *J. Virol.* **73**: 9609-9613.
- Nasiell K., Roger V., Nasiell M.** (1986). Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecol.* **67 (5)**: 665-669.
- Nead M.A., Baglia L.A., Antinore M.J., Ludlow J.W. and McCance D.J.** (1998). Rb binds c-Jun and activates transcription. *EMBO J.* **15**: 2865-2869.
- Newfield L., Bradlow H.L., Sepkovic D.W. and Auborn K.**(1998). Estrogen metabolism and the malignant potential of human papillomavirus immortalized keratinocytes. *Proc.Soc. Exp. Biol. Med.* **217**: 322-326.
- Nonnenmacher B., Hubbert N.L., Kirnbauer R., Shah K.V., Munoz N., Bosch F.X., Desanjose S., Viscidi R., Lowy D.R. and Schiller T.J.** (1995). Serologic response to human papillomavirus type -16 (HPV-16) virus-like particles in HPV-16 DNA-positive invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia grade III patients and controls from Colombia and Spain. *J. Infect. Dis.* **172**: 19-24.
- Nuchtern J.G., Biddison W.E. and Klausner R.D.**(1990). Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* **343**: 74-76.
- O'Connor M.J., Tan S.H., Tan C.H. & Bernard H.U.** (1996). YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J Virol.* **70(10)**:6529-6539.
- Ogra P.L., Faden H. and Welliver R.C.** (2001). Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 430-445.
- Okada E, Sasaki S, Ishii N, Aoki I, Yasuda T, Nishioka K, Fukushima J, Miyazaki J, Wahren B, Okuda K.** (1997). Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12- and granulocytemacrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cellmediated immune responses against HIV-1 antigens. *J. Immunol.* **159**:3638-3647.
- Owen R.L. and Jones A.L.** (1974). Epithelial cell specialization within human Peyer's patches and ultrastructural study of internal lymphoid follicles. *Gastroenterol.* **66**: 189-203.
- Owen R.L. and Bhalla D.K.** (1983). Cytochemical analysis of alkaline phosphatase and esterase activities and of lectin-binding and anionic sites in rat and mouse Peyer's patch M cells. *Am. J. Anat.***168**: 199-212.
- Pardoll D. M.** (1998). Cancer vaccines. *Nature Medicine Vaccine Supplement* **4**: 525-531.

- Patrick D.R., Zhang K., Defeo-Jones D., Vuocolo G.R., Maigetter R.Z., Sardana M.K., Oliff A. and Heimbrook D.C.** (1992). Characterization of functional HPV-16 E7 protein produced in Escherichiacoli. *Journal of Biological Chemistry*, **267(10)**:6910–6915.
- Patrick D.R., Oliff A. and Heimbrook D.C.** (1994). Identification of a novel retinoblastoma gene product binding site on human papillomavirus type 16 E7 protein. *Journal of Biological Chemistry*, **269(9)**: 6842–6850.
- Pawelec G., Heinzl S., Kiessling R., Muller L., Ouyang Q., Zeuthen J.** (2000). Escape mechanisms in tumor immunity: a year 2000 update. *Crit Rev Oncol.* **11 (29)**: 97-133.
- Peng S., Frazer I.H., Fernando G.J., and Zhou J.** (1998). Papillomavirus virus-like particles can deliver defined CTL epitopes to the MHC class I pathway. *Virology* **240**: 147-157.
- Persson G, Andersson K, Krantz I.** (1996). Symptomatic genital papillomavirus infection in a community: incidence and clinical picture. *Acta Obstet Gynecol Scand*; **75**: 287–290.
- Pertmer T.M., Roberts T.R., Haynes J.R.** (1996). Influenza virus nucleoproteinspecific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J. Virol.* **70** :6119–6125.
- Peto J., Gilham C., Fletcher O., Matthews F.E.** (2004). The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet*, **364**: 249–256.
- Phelps W.C., Yee C.L., Munger K. and Howley, P.M.** (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* **53(4)**: 539-547.
- Phillips A.C., & Vousden K.H.** (1997). Analysis of the interaction between human papillomavirus type 16 E7 and the TATA-binding protein, TBP. *J. Gen. Virol.* **78**: 905-909.
- Pijpers F, Faint R, Saini N.** (2005). Therapeutic cancer vaccines. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**: 623.
- Pinto L.A., Edwards J., Castle P.E., Harro C.D., Lowy D.R., Schiller J.T., Wallace D., Kopp W., Adelsberger J.W., Baseler M.W., Berzofsky J.A. and Hildesheim A.** (2003). Cellular immune responses to human papillomavirus 16 L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV16 L1 virus-like particles. *J. Infect. Dis.* **188 (2)**: 327-338.
- Piruzian ES, Monzavi-Karbassi B, Darbinian NS, Goldenkova IV, Kobets NS, Mochulsky AV.** (1998). The use of a thermostable beta-glucanase gene from Clostridium thermocellum as a reporter gene in plants. *Mol Gen Genet.* **257(5)** :561-7.
- Pontieri G.M., Bernelli-Zazzera A., Bianchi-Santamaria A., Faggioni A., Frati L., Gazzaniga P.P., Ippoliti F., Ragona G., Russo M.A., Salerno A., Santamaria L. and Tolone G.** (1996). Patologia Generale. *Ediz. Piccin.*

- Porreco R., Penn I., Droegemueller W., Greer B. and Makowski E.** (1975). Gynecologic malignancies in immunosuppressed organ homograft recipients. *Obstet. Gynecol.* **45**: 359-364.
- Raz E., Carson D.A., Parker S.E., Parr T.B., Abai A.M., Aichinger G., Gromkowski S.H., Singh M., Lew D., Yankauckas M.A., Baird S.M., Rhodes G.H.** (1994). Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9519–9523.
- Reinstein E., Scheffner M., Oren M., Ciechanover A. and Schwartz. A.** (2000). Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene* **19**: 5944.
- Remmink A.J., Walboomers J.M.M., Helmerhorst T.M., Voorhorst F.J., Rozendaal L., Risse E.J.K., Meijer C.J.L.M. and Kenemans P.** (1995). The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int. J. Cancer* **61**: 306-311.
- Ressing M.E., van Driel W.J., Celis E., Sette A., Brandt R.M., Hartman R., Anholts J.D.H., Schreuder G.M.T., Terharmel W.B., Fleuren G.J., Trimbos B.J., Kast W.M., and Melief C.J.N.** (1996). Occasional memory cytotoxic T-cell responses, of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A*0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res.* **56**: 582-588.
- Ressing M. E., van Driel W. J., Brandt R. M., Kenter G. G., de Jong J. H., Bauknecht T., Fleuren G. J., Hoogerhout P., Offringa R., Sette A., Celis E., Grey H., Trimbos B. J., Kast W. M., and Melief C. J. N.** (2000). Detection of T helper responses but non of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. *J. Immunother* **23 (2)**: 255-266.
- Restifo N.P., Ying H, Hwang L, Leitner W.W.** (2000). The promise of nucleic acid vaccines *Gene Ther* **7**: 89-92.
- Rice J., King C.A., Spellerberg M.B., Fairweather N., Stevenson F.K.** (1999). Manipulation of the pathogen-derived genes to influence antigen presentation via DNA vaccines. *Vaccine* **17**: 3030-3038.
- Richart R. M.** (1973). Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol. Annu.* **3**: 301-328.
- Rittich S., Duskova M., Mackova J., Pokorna D., Jinoch P., Smahel M.** (2005) Combined immunization with DNA and transduced tumor cells expressing mouse GM-CSF or IL-2. *Oncol Rep* **13 (2)**: 311-317.
- Roche J.K. & Crum C.P.** (1991). Local immunity and the uterine cervix: implications for cancer-associated viruses. *Cancer Immunol. Immunother.* **33**: 203-209.
- Roden R.B., Armstrong A., Haderer P., Christensen N.D., Hubbert N.L., Lowy D.R., Schiller J.T. and Kirnbauer R.** (1997). Characterization of a human papillomavirus type 16 variant-dependent neutralizing epitope. *J. Virol.* **71**: 6247-6252.

- Roden R.B., Hubbert N.L., Kirnbauer R., Christensen N.D., Lowy D.R. and Schiller J.T.** (1994). Assessment of the serological relatedness of genital human papillomaviruses by hemagglutination inhibition. *J. Virol.* **70**: 7570-7474.
- Roden R.B., Lowy D.R., and Schiller J.I.** (1997). Papillomavirus is resistant to dessication. *J. Infect. Dis.* **176**: 1076-1079.
- Roden R.B., Weissinger E.M., Henderson D.W., Booy F., Kirnbauer R., Mushinski J.F., Lowy D.R. and Schiller J.T.** (1994). Neutralization of bovine papillomavirus by antibodies to L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* **68**: 3298-3301.
- Roggero P., Ciuffo M., Benvenuto E. and Franconi R.** (2001). The expression of a single-chain Fv antibody fragment in different plant hosts and tissues by using potato virus X as a vector. *Protein Expres. Purif.* **22**: 70.
- Roman M., Martin-Orozco E., Goodman J.S., Nguyen M.D., Sato Y., Ronaghy A., Kornbluth R.S., Richman D.D., Carson D.A., Raz E.** (1997). Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1promoting adjuvants. *Nat. Med.* **3**: 849–854.
- Rose B.R., Thompson C.H., Zhang J., Stoeter M., Stephen A., Pfister H.** (1997). Sequence variation in the upstream regulatory region of HPV18 isolates from cervical cancers. *Gynecol. Oncol.* **66**: 282-289.
- Routes J.M., Ryan S., Steinke J., and Cook J.L.** (2000). Dissimilar immuno-genicities of the adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins influence tumor development. *Virology* **277**: 48-57.
- Roy K, Mao H.Q., Huang S.K., Leong K.W.** (1999). Oral gene delivery with chitosanDNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat. Med.* **5**: 387–391.
- Rudolf M.P., Nieland J.D., Da Silva D.M., Velders M.P., Muller M., Greenstone H.L., Schiller J.T., and Kast W.M.** (1999). Induction of HPV16 capsid protein-specific human T cell responses by virus-like particles. *Biol. Chem.* **380**: 335-340.
- Rudolf M.P., Fausch S.C., Da Silva D.M., and Kast W.M.** (2001). Human dendritic cells are activated by chimeric human papillomavirus type 16 virus-like particles and induce epitope-specific human T cell responses in vitro. *J. Immunol.* **166**: 5917-5924.
- Ruesch M.N. & Laimins L.A.** (1997). Initiation of DNA synthesis by human papillomavirus E7 oncoproteins is resistant to p21-mediated inhibition of cyclin E-cdk2 activity. *J Virol.* **71 (7)**: 5570-5578.
- Ruiz O.N., Hussein H., Terry N. and Daniell H.** (2003). Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiol.* **132**: 1-9.
- Sadler L., Safflas A., Wang W., et al.** (2004). Treatment for cervical intraepithelial neoplasia and risk of preterm delivery. *JAMA* **291**: 2100–2106.
- Sandhu J.S., Krasnyansky S.F., Domier L.L., Korban S.S., Osadjan M.D. and Buetow D.E.** (2000). Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing

- respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Res.* **9**: 127-135.
- Sanford J.C., Smith F.D. and Russell J.A.** (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol.* **217**: 483-509.
- Santa Cruz S., Chapman S., Roberts A.G., Roberts I.M., Prior D.A.M. and Oparka K.J.** (1996). Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 6286-6290.
- Santin A.D., Hermonat P.L., Lavaggi A.** (1999). Induction of human papillomavirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18- positive cervical cancer. *J. Virol.* **73**: 5402-5410.
- Sapp M., Volpers C., Muller M., and Streck R. E.** (1995). Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J. Gen. Virol.* **76**: 2407-2412.
- Sasaki S., Hamajima K., Fukushima J., Ihata A., Ishii N., Gorai I., Hirahara F., Mohri H., Okuda K.** (1998a). Comparison of intranasal and intramuscular immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a DNA-monophosphoryl lipid A adjuvant vaccine. *Infect. Immun.* **66**: 823-826.
- Sasaki S., Sumino K., Hamajima K., Fukushima J., Ishii N., Kawamoto S., Mohri H., Kensil C.R., Okuda K.** (1998b). Induction of systemic and mucosal immune responses to human immunodeficiency virus type 1 by a DNA vaccine formulated with QS21 saponin adjuvant via intramuscular and intranasal routes. *J. Virol.* **72**: 4931-4939.
- Sasson I.M., Haley N.J., Hoffmann D., Wynder E.L., Hellberg D. and Nisson S.** (1985). Cigarette smoking and neoplasia of the uterine cervix: smoke constituents in cervical mucus. *N.Engl. J. Med.* **312**: 315-316.
- Savelyeva N., Munday R., Spellerberg M. B., Lomonosoff G. P., and Stevenson F. K.** (2001). Plant viral genes in DNA idiotype vaccines activate linked CD4⁺ T-cell mediated immunity against B-cell malignancies. *Nature Biotech.* **19**: 760-764.
- Savelyeva N., Zhu D., and Stevenson F. K.** (2003). Engineering DNA vaccine that include plant virus coat proteins. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **20**: 101-111.
- Schafer A.W., Friedman M., Mielke B., Schwartlander B. and Koch M.A.** (1991). The increased frequency of cervical dysplasia-neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus is related to the degree of immunosuppression. *Am. J. Obstet Gynecol.* **164**: 593-599.
- Schiffman M. H., & Brinton L.A.** (1995). The epidemiology of cervical carcinoma. *Cancer* **76**: 1888-1901.
- Schillberg S., Zimmermann S., Voss A. and Fischer R.** (1999). Apoplast and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. *Transgenic Res.* **8**: 255.

- Schiller J.T.** (1999). Papillomavirus-like particle vaccines for cervical cancer. *Mol. Med. Today* **5**: 209-215.
- Schrager L.K., Friedland G.H., Maude D., Schreiber K., Adachi A., Pizzuti D.J. et al.** (1989). Cervical and vaginal squamous cell abnormalities in women infected with human immunodeficiency virus. *J. Acquir. Immune def. Syndr.* **2**: 570-575.
- Schwarz E., Freese U.K., Gissmann L., Mayer W., Roggenbuck B., Stremlau A. et al.** (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**: 111-114.
- Sedman S.A., Barbosa M.S., Vass W.C., Hubbert N.L., Haas J.A., Lowy D.R. & Schiller J.T.** (1991). The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol.* **65(9)**: 4860-4866.
- Seedorf Krammer G., Durst M., Suhai S. and Rowekamp W.G.** (1985). Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* **145**: 181-185.
- 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 oilbodies. *J. Plant Biotechnol.* **4**: 95-101.
- Sharp J.M. and Doran P.M.** (2001). Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnology Progress* **17(6)**: 979-992.
- Sheets E.E. et al.** (2003). Immunotherapy of human cervical highgrade cervical intraepithelial neoplasia with microparticle-delivered human papillomavirus 16 E7 plasmid DNA. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **188**: 916-926.
- Shepherd P.S., Rowe A.J., Cridland J.C., Coletart T., Wilson P. and Luxton J.C.** (1996). Proliferative T-cell responses to human papillomavirus type 16 L1 peptides in patient with cervical dysplasia. *J. Gen. Virol.* **77**: 593-602.
- Sherr C.J.** (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* **60**: 3689-3695.
- Shi W., Bu P., Liu J., Polack A., Fischer S. and Qiao L.** (1999). Human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine: mutation in the open reading frame of E7 enhances specific cytotoxic T-lymphocyte induction and anti-tumor activity. *J. Virol.* **73**: 7877-7881.
- Shivprasad S., Pongue G.P., Lewandowski D.J., Hidalgo J., Donson J., Grill L.K. and Dawson W.O.** (1999). Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in Tobacco Mosaic Virus-based vectors. *Virology* **255**: 312-323.
- Silverstein A.M., Segal S.** (1975). The ontogeny of antigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* **142**: 802-804.
- Smahel M., Sima P., Ludvíková V., and Vonka V.** (2001). Modified HPV16 E7 genes as DNA vaccine against E7-containing oncogenic cells. *Virology* **281**: 231-238.

- Smahel M., Pokorna D., Mackowa J., and Vlasak J.** (2004). Enhancement of immunogenicity of HPV16 E7 oncogene by fusion with *Escherichia coli* beta-glucuronidase. *J. Gene. Med.* **6** (10): 1092-1101.
- Smith G.** (1996). Virus proteins that bind cytokines, chemokines or interferons. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 467-471.
- Smolenska L., Roberts I.M., and Learmonth D.** (1998). Production of a functional single chain antibody attached to the surface of a plant virus. *FEBS Lett.* **441**: 379-382.
- Smotkin D. & Wettstein F.O.** (1986). Transcription of human papillomavirus type 16 early genes I cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 4680-4684.
- Soto U.** (1999). Conversion of HPV18 positive non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrids to invasive growth involves loss of TNF- α mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex. *Oncogene* **18**: 3187-3198.
- Speidel K., Osen W., Faath S., Hilgert I., Obst R., Braspenning J., Momburg F., Hammerling G.J. and Rammensee H.G.** (1997). Priming of cytotoxic T lymphocytes by five heat-aggregated antigens in vivo: conditions, efficiency, and relation to antibody responses. *Eur. J. Immunol.* **27**: 2391-2399.
- Stannard L.M.** (1995). Papillomavirus. <http://web.uct.ac.za/dept/mmi/stannard/emimages.html>
- Stehle T. and Harrison S.C.** (1996). Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* **4**: 183-194.
- Stehle T., Yan Y., Benjamin T.L. and Harrison S.C.** (1994). Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* **369**: 160-163.
- Steinberg T., Ohlschlager P., Sehr P., Osen W., and Gissmann L.** (2005). Modification of HPV16 E7 genes: correlation between the level of protein expression and CTL response after immunization of C57BL/6 mice. *Vaccine* **23** (9):1149-1157.
- Steinman R.M.** (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol* **9**: 271-296.
- Stevenson, F.K., Ottensmeier C.H., Johnson P., Zhu D., Buchan S.L., McCann KJ., Roddick J.S., King A.T., McNicholl F., Savelyeva N. and Rice J.** (2004). DNA vaccines to attack cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 14646-14652.
- Stewart T.J., Smyth M.J., Fernando G.J., Frazer I.H. and Leggatt G.R.** (2003). Inhibition of early tumor growth requires J α 18-positive (natural killer T) cells. *Cancer Res.* **63**: 3058.
- Storey A.M., Thomas M., Kalita A., Harwood C., Gardiol D., Mantovani F., Breuer J., Leigh I.M., Matlashewski G. and Banks L.** (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* **235**: 229-234.

- Streatfield S.J., Jilka J.M., Hood E.E., Turner D.D., Bailey M.R., Mayor J.M., Woodard S.L., Beifuss K.K., Horn M.E., Delaney D.E., Tizard I.R. and Howard J.A.** (2001). Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine* **19**: 2742-2748.
- Su P.F., Chiang S.Y., Wu C.W., and Wu F.Y.** (2000). Adeno-associated virus major Rep78 protein disrupts binding of TATA binding protein to the p97 promoter of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* **74**: 2459-2465.
- Suzich J.A., Ghim S.J. and Palmer-Hill F.J.** (1995). Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11553-11557.
- Svab Z. and Maliga P.** (1993). High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 913-917.
- Swan D.C., Tucker R.A., Tortolero-Luna G., Mitchell M.F., Wideroff L., Unger E.R., Misenbaun R.A., Reeves W.C. and Icenogle J.P.** (1999). Human papilloma (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1030-1034.
- Syrjänen S.M. & Syrjänen K.J.** (1999). New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann. Med.* **31**: 175-187.
- Tacket C.O., Mason H.S., Losonsky G., Clements J.D., Levine M.M. and Arntzen C.J.** (1998). Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial-antigen delivered in transgenic potato. *Nat. Med.* **4**: 607.
- Tacket C.O., Mason H.S., Losonsky G., Estes M.K., Levine M.M. and Arntzen C.J.** (2000). Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potato. *J. Infect. Dis.* **182**: 302.
- Tacket C.O., Pasetti M.F., Edelman R., Howard J.A. and Streatfield S.** (2004). *Vaccine* **22** (31-32): 4385-4389
- Tan J., Yang N.S., Turner J.G., Niu G.L., Maassab H.S., Sun J., Herlocher M.L., Chang A.E., and Hu H.Y.** (1999). Interleukin-12 cDNA skin transfection potentiates human papillomavirus E6 DNA vaccine-induced antitumor immune response. *Cancer Gene Ther.* **6**: 331-339.
- Tan S.H., Leong L.E., Walker P.A. & Bernard H.U.** (1994). The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J. Virol.* **68**(10): 6411-6420.
- Thanavala Y., Yang Y.F., Lyons P., Mason H.S., Arntzen C.** (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3358–3361.
- Thierry F. and Yaniv M.** (1987). The BPV1-E2 *trans*-acting protein can be either activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J.* **6**: 3391-3397.

- Thierry F., Spyrou G., Yaniv M. & Howley P.** (1992). Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J Virol.* **66** (6): 3740-3748.
- Thornland E.C., Myers S.L., Persing D.H., Sarkar G., Mc Govern R.M., Gostout B.S. et al.** (2000). Human Papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res.* **60**: 5916-5912.
- Tighe H., Corr M., Roman M., and Raz E.** (1998). Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunol. Today* **19**: 89-97.
- Tindle R.W.** (2002). Immune evasion in human papillomavirus – associated cervical cancer. *Nature Rev. Cancer* **2**: 1-7.
- Toubart P., Desiderio A., Salvi G., Cervone F., Daroda L., De Lorenzo G., Bergmann C., Darvill A.G. and Albersheim P.** (1992). Cloning and characterisation of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris*. *Plant J.* **2**: 367.
- Twyman R.M., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Fischer R.** (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* **21**: 570-578.
- Ulmer J.B., Donnelly J.J., Parker S.E., Rhodes G.H., Felgner P.L., Dworki V.J., Gromkowski S.H., Deck R.R., De Witt D.M., Friedman A, Hawe L.A., Leander K.R., Martinez D., Perry H.C., Shiver J.W., Montgomery D.C., Liu M.A.** (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**:1745–1749.
- van Driel W.J. et al.** (1999). Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial. *Eur. J. Cancer* **35**: 946–952.
- van Driel W.J., Resting M.E., Kenter G.G., Brandt R.M., Krull E.J., van Rossum A.B., Schuurin E., Offringa R., Bauknecht T., Tamm-Hermelink A., van Dam P.A., Fleuren G.J., Kast M.W., Meief C.J. and Trimbos J.B.** (1999). Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial. *Eur. J. Cancer.* **35**: 946-952.
- van Kooten C. and Banchereau J.** (1997). Functional role of CD40 and its ligand. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **113**: 393-399.
- Varsani A., Williamson A.L., Rose R.C., Jaffer M., and Rybicki E.P.** (2003). Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Arch. Virol.* **148**: 1771.
- Verch T., Yusibov V. and Koprowski H.** (1998). Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant-virus vector. *J. Immunol. Meth.* **220**: 69.

- Verch T., Hooper D.C., Kiyatkin A., Steplewski Z. and Koprowski H.** (2004). Immunization with a plant-produced colorectal cancer antigen. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**: 92.
- Veress G., Szarka K., Dong X.P., Gergely L., and Pfaister H.** (1999). Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* **80**: 1043-1053.
- Viallet J., Liu C., Emond J. & Tsao M.S.** (1994). Characterization of human bronchial epithelial cells immortalized by the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16. *Exp Cell Res.* **212** (1):36-41.
- Villa L.I., Costa R.L.R., Petta C.A., Andrade R.P., Ault K.A., Giuliano A.R., Wheeler C.M., Koutsky L.A., Malm C., Lehtinen M., Skjeldestad F.E., Olsson S.E., Steinwall M., Brown D.R., Kurman R.J., Ronnet B.M., Stoler M.H., Ferenczy A., Harper D.M., Tamms G.M., Yu J., Lupinacci L., Railkar R., Taddeo F., Jansen K., Esser M.T., Sings H.L. Saah A.J. and Barr E.** (2005). Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6,11,16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* **6**: 271-278.
- Voinnet O., Rivas S. Meste P. and Baulcombe D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant J.* **33**: 949-956.
- Von Knedel Doeberitz M., Rittmuller C., Aengeneyndt F., Gjansen-Durr P., and Spiitkovsky D.** (1994). Reversible repression of papillomavirus onco-gene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenol-type and E6-p53 and E7-pRb interactions. *J. Virol.* **68**: 2811-2821.
- von Krogh G.** (2001). Management of anogenital warts (condylomata acuminata). *Eur J Dermatol* **11**: 598–604.
- Walboomers J.M., Jacobs M.V., Manos M.M., Bosch F.X., Kummer J.A., Shah K.V. et al.** (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* **189**: 12-19.
- Walboomers J.M.M., Jacobs M.V., van Oostveen J.W., van den Brule A.J.C., Snijders P.J.F. and Meijer C.J.L.M.** (1997). Detection of human papillomavirus infection and possible clinical implications. In: Human papillomavirus infections in dermatovenereology. Eds: Gross G. and von Krogh G., CRC Press, London, Tokio, New York: 341-364.
- Walmsley A.M. and Arntzen C.J.** (2000). Plants for delivery of edible vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 126-129.
- Wang Z.H., Hansson B.G., Forslund O., Dillner L., Sapp M., Schillet T.J., Bjerre B and Dillner J.** (1996). Cervical-mucus antibodies against human papillomavirus type 16, type 18 and type 33 capsids in relation to presence of viral DNA. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 3056-3062.

- Warzecha H., Mason H.S., Lane C., Tryggvesson C., Rybicki E., Williamson A.L., Clements J.D. and Rose R.C.** (2003). Oral Immunogenicity of Human Papillomavirus-Like Particles Expressed in Potato. *J. Virol.* **77**: 8702.
- Warzecha H. and Mason H.S.** (2003) Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants *J. Plant Physiol.* **160**: 755–764.
- Webster K.J., Parish J., Pandya M., Stern P.L., Clarke A.R. and Gaston K.** (2000). The Human Papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of p16 HPV 16 proteins and via p53-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **275**: 87-94.
- Weiner D. B. & Kennedy R. C.** (1999). Vaccini genetici. *Le Scienze* **374**: 48-56.
- Welch P.J. and Wang J.Y.** (1995). Disruption of retinoblastoma protein function by coexpression of its C pocket fragment. *Genes and Development*, **9(1)**: 31–46.
- Werness B.A., Levine A.J. & Howley P.M.** (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248 (4951)**: 76-79.
- White H.D., Crassi K.M., Givan A.L., Gonzalez J.L., Memoli V.A., Green W.R. and Wira C.R.** (1997). CD3 (+) CD8 (+) CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause. *J. Immunol.* **158**: 3017-3027.
- White W.I., Wilson R.D., Palmer-Hill F.J., Woods R.M., Ghim S.J., Hewitt L.A., Goldman D.M., Burke S.J., Jenson A.B., Koenig S. and Suzich J.A.** (1999). Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *J. Virol.* **73**: 4882-4889.
- Winkelstein W. Jr.** (1990). Smoking and cervical cancer –current status: a review. *Am. J. Epidemiol.* **131**: 945-957.
- Wongsamuth R. and Doran P.M.** (1997). Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotechnology and Bioengineering.* **54 (5)**: 401-415.
- Wu I.C., Guarneri F.G., Stavely-O’Carroll K.F., Viscidi R.P., Lewitsky H.E., Hedrick L., Cho K.R., August T., and Pardoll D.M.** (1995). Engineering an intracellular pathway for MHC class II presentation of HPV16 E7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 11671-11675.
- Wu Y., Wang X., Csencsits K.L., Haddad A., Walters N., Pascual D.W.** (2001). M cell-targeted DNA vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 9318-9323.
- Yee C., Krishann-Hewlett I., Baker C.C., Schlegel R. and Howley P.M.** (1985). Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.* **119**: 361-366.
- Yokoyama M., Tsutsumi K., Pater A. & Pater M.M.** (1994). Human papillomavirus 18-immortalized endocervical cells with in vitro cytokeratin expression characteristics of adenocarcinoma. *Obstet Gynecol.* **83 (2)**: 197-204.

- You Z., Huang X., Hester J., Toh H.C., Chen S.-Y.** (2001). Targeting dendritic cells to enhance DNA vaccine potency. *Cancer Res.* **61**: 3704-3711.
- Yu J. and Langridge W.H.** (2001). A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat. biotechnol.* **19**: 548-552.
- Yuan F., Auburn K. and James C.** (1999). Altered growth and viral gene expression in human papillomavirus type 16-containing cancer cell line treated with progesterone. *Cancer Invest.* **17**: 19-29.
- Yuan H., Estes P.A., Chen Y., Newsome J., Olcese V. A., Garcea R.L. and Schlegel R.** (2001). Immunization with a pentameric fusion protein protects against papillomavirus infection. *Journal of Virology* **17**: 7848-7853.
- Yusibov V., Hooper D.C., Spitsin S.V., Fleysh N. Kean R.B., Mikheeva T. Deka D., Karasev A., Cox S., Randall J. and Koprosky H.** (2002). Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* **20 (25-26)**: 3155-3164.
- Zhang L., Tang Y., Akbulut H., Zelterman D., Linton P.J., and Deisseroth A.B.** (2003). An adenoviral vector cancer vaccine that delivers a tumor-associated antigen/CD40-ligand fusion protein to dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 15101-15106.
- Zhou X., Qian X., Zhao Q., Lu Y., and Xiong M.** (2004). Efficient expression of modified human papillomavirus 16 E6/E7 fusion protein and the antitumor efficacy in a mouse model. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 303-307.
- Zuo Y.G., Wang J.B., Jin H.Z. and Yue-hua L.** (2004). Immunogenicity of mutant and wild HPV16 DNA vaccines. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao (Acta academieMedicinae Sinicae)* **26 (5)**: 554-557.
- Zur Hausen H.** (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Rev. Cancer* **2**: 342-350.
- Zwaveling S., Ferreira Mota S.C., Nouta J., Johnson M., Lipford G.D., Offringa R., van der Burg F.H., and Meief C.J.M.** (2002). Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J. Immunol.* **169**: 350-358.

RINGRAZIAMENTI

La mia più completa gratitudine va alla dott.ssa Rosella Franconi la cui vivace curiosità ed intelligenza restano uno dei principali motivi della mia ammirazione e uno dei più forti esempi e stimoli per me come giovane ricercatrice. Esse sono sorgente inesauribile di collaborazioni (tra cui quella presso un centro d'eccellenza come il "Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology" – Newark, Delaware) e progetti alcuni dei quali alla base del lavoro qui realizzato.

Ringrazio particolarmente anche il dott. Eugenio Benvenuto, il quale ha reso possibile la realizzazione di questo lavoro ed ha generosamente autorizzato la mia esperienza all'estero.

Ringrazio sentitamente il dott. Aldo Venuti, esempio pragmatico ed umano di ricerca e di disponibilità professionale e personale: grazie a lui è stato possibile iniziare questa attività e realizzare concretamente la mia esperienza all'estero. Il periodo lavorativo speso nel suo laboratorio con i suoi collaboratori è stato uno tra i più sereni e fruttuosi della mia giovane carriera.

In riferimento agli ultimi sei mesi, la mia gratitudine è rivolta al Direttore esecutivo del "Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology" (Newark, Delaware), dott. Vidadi Yusibov ed al mio supervisore diretto dott. Vadim Mett per la disponibilità con cui hanno curato il mio arrivo in tale centro e con cui hanno seguito la mia esperienza di laboratorio, per i preziosi insegnamenti e le tecnologie d'avanguardia messe a disposizione.

Ringrazio il gruppo della dott.ssa Colomba Giorgi (ISS), in particolare la Dott.ssa Paola Di Bonito, per il prezioso pAb α -E7 senza il quale non sarebbe stato possibile rilevare molti dei risultati ottenuti.

Ringrazio la dott.ssa Elena Illiano e la dott.ssa Paola Simeone, le prime compagne di lavoro incontrate a Roma, nonché carissime amiche. Hanno condiviso con me le gioie e le frustrazioni di questo lavoro; la forza e l'affetto della prima e la solidarietà e il supporto della seconda hanno contribuito notevolmente ai miei risultati e non solo.

Ringrazio Lina, forte e solare anche nelle difficoltà, per il supporto pratico e morale mai rifiutato. Un ricordo tanto affettuoso va ad Olivia ed Alessandra: vivaci, volenterose, disponibili e fattive nel laboratorio, sempre pronte ad aiutare.

Grazie a tutti coloro che, direttamente o indirettamente, hanno contribuito al raggiungimento di questo obiettivo.

Grazie alla mia famiglia, provata da un anno difficile ma finalmente passato: ai miei genitori per il costante pensiero, a mia sorella ed a mio fratello per l'affetto, il sostegno e la leggerezza

che mi comunicano sempre, nonostante tutto, ed ai miei zii per l'amore con cui mi hanno seguito negli studi e nella vita.

“Dulcis in fundo”, un ringraziamento speciale va a Fabrizio, sul cui inossidabile ottimismo e sul cui amorevole ed incondizionato aiuto ho potuto sempre contare in questi ultimi due anni (e soprattutto in questi ultimi 6 mesi), i più ricchi e fortunati della mia vita.