



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE E BIOTECNOLOGIE AGRARIE

CICLO XXIV

Coordinatore: prof. Mauro Spanghero

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

Sistemi di produzione per molecole simil-immunoglobuliniche in dicotiledoni

DOTTORANDO

dott.ssa Sara Raccovelli

SUPERVISORE

prof. Stefano Marchetti

ANNO ACCADEMICO
2010/2011

Dicots-based production systems for immunoglobulin-like molecules

This thesis falls within the field of molecular farming, which consists in the production of pharmaceutically important and commercially valuable proteins in genetically modified higher plants. The research project exposed here has the purpose of testing the feasibility and optimize the production process of immunoglobulin-like molecules in plants, using a molecule of pharmaceutical interest (minibody) as a prototype and taking advantage of the tobacco plant as a production platform.

The minibody is an immunoglobulin-like molecule that is designed to be used in active immunotherapy for non-Hodgkin lymphoma (NHL). It consists of three functionally distinct regions: a patient-specific tumor marker (idiotype), a carrier with stability and immunogenicity properties (C_H3 region from a murine antibody), and a terminal portion with adjuvant function derived from the human cytokine interleukin-1- β (IL1 β nonapeptide).

The analyses performed in this thesis have shown the feasibility of the production of minibody immunoglobulin-like molecules in tobacco. To deeply understand and subsequently improve the production system at multiple levels, different strategies were adopted. The *in silico* analysis led to the replacement of the original signal peptide with PSlyc, the transit peptide of a tomato pathogen-related protein, whose nucleotide sequence has been replaced in all vectors here created. Four prototype forms for the minibody protein have been successfully produced in tobacco, each differing by the presence of a human or murine C_H3 region and the presence/absence of the IL1 β nonapeptide. Crude protein extracts from transformed tobacco leaves were analyzed by ELISA assay to test the presence of the minibody and by immunoprecipitation and Western blot to reveal the correct molecular weight. The retention of the minibody in the endoplasmic reticulum has been proved to increase the expression level of the molecule about 3-fold compared to apoplasmic secretion. The use of a light-inducible and tissue specific regulation system, based on the RBS promoter, was superior to the use of non-specific 35S viral promoter. The use of RBS terminator did not show any clear advantage over the use of the most common nos terminator sequence. The comparison between two different vector backbones showed the superiority of pSTART vector over pCAMBIA vector in terms of rooting and quality of the regenerated plants obtained. Preliminary purification tests by affinity chromatography have demonstrated the inapplicability of the procedures employing Protein A for molecules such as the minibody. Agroinfiltration assays performed to set a fast and reliable system for testing new constructs have lead to promising results, although the procedure is still undergoing a setting phase.

In this work I evaluated the effectiveness of a production system for antibody-like molecules in plants and I sought strategies for the improvement of the existing production platform. Minibodies are molecules that represent the broad category of immunoglobulin-like molecules. The minibody variants studied here were designed for clinical application in the maintenance treatment of NHL, and are a good example of a patient-specific drug whose needs are well met by the many advantages of molecular farming. Tobacco is a model species for dicots; all the regulatory elements studied in this work using tobacco plants can easily be adapted to other dicots. The results and considerations presented in this thesis are a valuable starting point for the development of new strategies for the production of immunoglobulin-like molecules employing the leaves of dicots as a production platform.

*A mia nonna,
che è orgogliosa di me quanto io lo sono di lei.*

1. SOMMARIO

1.	Introduzione	8
1.1	Molecular farming	8
1.1.1	Produzione di proteine ricombinanti in sistemi eterologhi	8
1.1.2	Le piante come bioreattori.....	8
1.1.3	Il tabacco come specie modello	10
1.1.4	Tecnica di trasformazione mediata da <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
1.1.5	Le strategie di espressione in pianta	15
1.2	Linfomi non-Hodgkin e vaccini paziente-specifici	18
1.2.1	Linfomi non-Hodgkin	18
1.2.2	Terapia contro i NHL.....	21
1.2.3	Vaccini idiotipo-specifici.....	22
1.2.4	Anticorpi e molecole simil-anticorpali	25
1.2.5	Nuova molecola: il minibody.....	29
2.	Scopo della tesi.....	33
3.	Materiali e metodi.....	34
3.1	Strumenti di analisi bioinformatica	34
3.1.1	ENTREZ - NCBI website	34
3.1.2	The sequence manipulation suite 2 (SMS2).....	35
3.1.3	ExpASy	35
3.1.4	CBS prediction servers.....	36
3.1.5	SIG-Pred.....	38
3.1.6	Primer3 plus	39
3.2	Metodologie di biologia molecolare	40
3.2.1	Miniprep per l'estrazione di DNA plasmidico	40
3.2.2	Quantificazione della concentrazione e del grado di purezza del DNA	40
3.2.3	Digestione degli acidi nucleici con enzimi di restrizione	40
3.2.4	Trattamento con fosfatasi alcalina dei vettori digesti	41
3.2.5	Saldatura di frammenti di DNA	41
3.2.6	PCR, reazione a catena della polimerasi	41
3.2.7	Elettroforesi di acidi nucleici in gel di agarosio e loro visualizzazione	43
3.2.8	Elaborazione di immagini da gel di agarosio	44
3.2.9	Recupero di frammenti di DNA da gel.....	45
3.2.10	Reazione di A-tailing	45

3.2.11	Estrazione di DNA genomico da tessuto fogliare	45
3.2.12	Preparazione di cellule competenti di <i>E. coli</i> JM101.....	46
3.2.13	Trasformazione di cellule competenti di <i>E. coli</i> JM101.....	46
3.2.14	Preparazione di cellule competenti di <i>A. tumefaciens</i>	48
3.2.15	Trasformazione di cellule competenti di <i>A. tumefaciens</i>	48
3.2.16	Glycerol stock delle colonie di interesse	48
3.2.17	Vettori plasmidici utilizzati	48
3.3	Trasformazione e rigenerazione di <i>Nicotiana tabacum</i>	53
3.3.1	Substrati	53
3.3.2	Disinfezione di semi di tabacco	54
3.3.3	Trasformazione di <i>N. tabacum</i> con <i>A. tumefaciens</i>	55
3.3.4	Tecnica di coltivazione in idroponica	56
3.3.5	Agroinfiltrazione.....	59
3.4	Tecniche di caratterizzazione e quantificazione proteica	61
3.4.1	Estrazione di proteine totali da tessuto fogliare.....	61
3.4.2	DAS-ELISA	62
3.4.3	Elaborazione dei risultati ELISA	64
3.4.4	Saggio GUS istochimico	66
3.4.5	Estrazione di GUS da tessuto fogliare	67
3.4.6	Saggio GUS fluorimetrico	68
3.4.7	Quantificazione proteica	68
3.4.8	Immunoprecipitazione	69
3.4.9	SDS-PAGE e analisi Western blot	70
3.4.10	Cromatografia di affinità.....	70
4.	Risultati.....	72
4.1	Analisi bioinformatica della proteina-minibody.....	72
4.1.1	Analisi della sequenza primaria.....	74
4.1.2	Predizione delle caratteristiche fisico-chimiche	77
4.1.3	Presenza di domini conservati	78
4.1.4	Analisi del peptide segnale e ricerca di un nuovo candidato.....	80
4.2	Progettazione e realizzazione di costrutti vettoriali	109
4.2.1	I costrutti a disposizione.....	109
4.2.2	Sostituzione di PSott con PSlyc.....	110
4.2.3	Trasformazione di <i>A. tumefaciens</i> con i costrutti portanti PSlyc	114
4.2.4	Inserzione del segnale di ritenzione nel reticolo endoplasmico KDEL.....	115

4.2.5	Trasformazione di <i>A. tumefaciens</i> con pSTART_35S _{LLTCK} _PSlyc_Va-KDEL_nos	118
4.2.6	Sostituzione del promotore 35S con il promotore RBS in pSTART	119
4.2.7	Creazione di RBS _{LLTCK} e clonazione in pSTART	123
4.2.8	Sostituzione del terminatore nos con RBster in pSTART	126
4.2.9	Trasformazione di <i>A. tumefaciens</i> con i costrutti RBS	130
4.2.10	Inserimento della cassetta di espressione di pSTART in pCAMBIA2300.....	130
4.2.11	Trasformazione di <i>A. tumefaciens</i> con pCAMBIA2300_35S _{LLTCK} _GUS_nos	132
4.2.12	Creazione di GUSintr e suo inserimento in costrutti per agroinfiltrazione.....	133
4.2.13	Trasformazione di <i>A. tumefaciens</i> con costrutti portanti GUSintr.....	138
4.2.14	Inserzione della sequenza KDEL nei costrutti codificanti Vb, Vc e Vd.....	139
4.2.15	Trasformazione di <i>A. tumefaciens</i> con i costrutti portanti KDEL	144
4.3	Trasformazione di <i>N. tabacum</i>	146
4.3.1	Processo di trasformazione e crescita in idroponica.....	146
4.3.2	Le quattro forme base di vaccino Va, Vb, Vc e Vd	151
4.3.3	Confronto fra Va e VaKDEL.....	151
4.3.4	Confronto fra promotori 35S _{LLTCK} , RBSnat e RBS _{LLTCK} e terminatori nos e RBster	152
4.3.5	Confronto fra vettori pSTART e pCAMBIA.....	152
4.3.6	Validazione di GUSintr.....	154
4.3.7	Prove di agroinfiltrazione	155
4.4	Analisi dei trasformati	156
4.4.1	Validazione della tecnica di selezione utilizzata per i vaccini	156
4.4.2	Le quattro forme base di vaccino Va, Vb, Vc e Vd	161
4.4.3	Valutazione della sequenza di ritenzione nell'ER KDEL in Va.....	163
4.4.4	Valutazione di promotore e terminatore RBS.....	166
4.4.5	Confronto fra vettori pSTART e pCAMBIA.....	174
4.4.6	Validazione di GUSintr.....	179
4.4.7	Prove di agroinfiltrazione	179
4.5	Verifica dell'integrità della molecola prodotta	182
4.6	Prove preliminari di purificazione	183
5.	Discussione.....	185
5.1	Risultati ottenuti e prospettive future	185
5.1.1	Espressione di molecole simil-anticorpali in tabacco.....	185
5.1.2	Introduzione di PSlyc.....	185
5.1.3	Ritenzione del minibody nel reticolo endoplasmico	187
5.1.4	Sostituzione degli elementi regolatori nella cassetta di espressione	188

5.1.5	pSTART vs. pCAMBIA.....	191
5.1.6	Prove di purificazione.....	192
5.1.7	Prove di agroinfiltrazione.....	193
5.2	Conclusioni.....	195
6.	Bibliografia.....	196
7.	Indice delle figure.....	208
8.	Indice delle tabelle.....	216
9.	Ringraziamenti.....	218

1. INTRODUZIONE

1.1 MOLECULAR FARMING

1.1.1 PRODUZIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI IN SISTEMI ETEROLOGHI

Per molecular farming si intende la produzione di proteine di grande interesse farmaceutico e commerciale in sistemi eterologhi, ovvero al di fuori della loro origine naturale (Franken et al., 1997; Fischer e Emans, 2000). Questo processo comprende l'identificazione di una proteina che presenti un'attività terapeutica o diagnostica desiderata, l'individuazione della sua sequenza amminoacidica e nucleotidica e infine la sua espressione in un organismo ospite. Un classico esempio di molecular farming è la produzione di insulina ricombinante in batteri, la prima proteina ricombinante impiegata per uso terapeutico (Walsh, 1998).

L'obiettivo del molecular farming è quello di produrre grandi quantità di una proteina farmaceutica attiva e sicura, ad un prezzo sostenibile. Questo processo avviene su due livelli: lo sviluppo di una piattaforma di espressione ottimizzata e l'espansione (scale-up) del sistema a livelli di produzione industriale (Fischer e Emans, 2000).

1.1.2 LE PIANTE COME BIOREATTORI

Due importanti scoperte hanno rivoluzionato il settore delle biotecnologie applicate alle piante: la capacità di una singola cellula vegetale di rigenerare *in vitro* una pianta intera dotata di tutte le caratteristiche genetiche del genitore (Birch, 1997) e la possibilità di trasferire geni nel genoma vegetale utilizzando il batterio del suolo *Agrobacterium tumefaciens* (Van Larebeke et al., 1974). Le potenzialità dell'uso delle piante come sistema di produzione per proteine ricombinanti di interesse farmaceutico è stato evidenziato fra il 1986 e il 1990. Importanza cruciale hanno avuto la riuscita produzione di anticorpi interi e funzionali in pianta (Hiatt et al., 1989) e di molecole come l'ormone della crescita umano (Barta et al., 1986), che hanno dimostrato la potenzialità delle piante di produrre correttamente molecole complesse di derivazione mammifera. Un grande numero di proteine ricombinanti è stato prodotto in pianta da allora (Figura 1.1), a dimostrazione della capacità dei bioreattori verdi di competere con i sistemi di produzione industriale esistenti (Barta et al., 1986; Mason et al., 1992; Pen et al., 1992, Fischer e Emans, 2000).

Fra i molti eccellenti esempi presenti in letteratura si vuole porre in primo piano, poiché affine alle tematiche presentate in questa tesi, il lavoro di Daniell e coll. e Benvenuto e coll. relativo alla produzione di molecole vaccino in pianta, con particolare riferimento alla realizzazione di antigeni protettivi contro malattie infettive o autoimmuni e alle strategie di produzione impiegabili (Marusic et al., 2007; Daniell et al., 2009; Davoodi-Semiromi et al., 2010; Davoodi-Semiromi et al., 2009; Lombardi et al., 2009; Chebolu e Daniell, 2009; Komarova et al., 2010).

Le piante rappresentano un sistema economico per la produzione di proteine ricombinanti in quanto al basso costo di produzione della biomassa vegetale si aggiunge la possibilità di utilizzare le infrastrutture esistenti per la coltivazione, trasformazione e conservazione dei prodotti agricoli, il che consente di ridurre notevolmente l'investimento di capitale necessario per una produzione su scala industriale (Giddings, 2001; Stoger et al., 2004). Ksnadi et al. (1997) hanno stimato che il costo di produzione delle proteine ricombinanti in pianta può essere da 10 a 50 volte inferiore a quello delle

stesse proteine prodotte in *E. coli*. Le piante, inoltre, possiedono un sistema di modificazione delle proteine post-traduzionale simile a quello animale con solo alcune differenze relative alla glicosilazione, senza però presentare i rischi di trasmissione all'uomo di agenti infettivi quali virus, prioni e micoplasmi che rappresentano un concreto rischio per i bioreattori a cellule animali (Fischer e Emans, 2000). La produzione di proteine ricombinanti in pianta si è generalmente focalizzata sull'uso di foglie (in sistemi ospite come il tabacco) e di tessuti di riserva come i semi (nei cereali come riso e mais); sono state inoltre sviluppate tecniche per l'ottimizzazione dei livelli di espressione e l'indirizzamento delle proteine in particolari compartimenti cellulari e subcellulari (Stoger et al., 2004).

	Piante transgeniche	Lieviti	Batteri	Culture cellulari animali	Animali transgenici
Dimensione del gene inserito	Nessun limite	Limite non noto	Limite non noto	Limitata	Limitata
Accuratezza del folding proteico	Alta	Media	Bassa	Alta	Alta
Assemblaggio di proteine multimeriche	Sì	No	No	No	Sì
Glicosilazione	Corretta (possibili differenze minori)	Non corretta (iper-glicosilazione)	Assente	Corretta (possibili differenze minori)	Corretta (possibili differenze minori)
Propagazione	Facile	Facile	Facile	Difficile	Fattibile
Resa proteica	Alta	Alta	Media	Medio-Alta	Alta
Tempi di produzione	Medi	Medi	Bassi	Alti	Alti
Costi di produzione	Bassi	Medi	Medi	Alti	Alti
Metodo di conservazione	Economico / temperatura ambiente o -20°	Economico / -20°C	Economico / -20°	Costoso / Azoto liquido	Costoso
Sicurezza	Alta	Non nota	Bassa	Media	Bassa
Costi di espansione industriale	Bassi	Alti	Alti	Alti	Alti
Scala di produzione	Mondiale	Limitata	Limitata	Limitata	Limitata
Distribuzione	Facile	Fattibile	Fattibile	Difficile	Difficile

Tabella 1.1 Proprietà della produzione di proteine ricombinanti in diversi sistemi di espressione (da Fischer e Emans, 2000)

La qualità delle proteine prodotte in pianta, valutata in termini di folding, modificazioni post-traduzionali e attività biologica, è comunque un parametro cruciale che richiede una particolare attenzione per ogni singola molecola presa in considerazione. La Tabella 1.1 espone le principali caratteristiche che differenziano il sistema di produzione in pianta da sistemi tradizionali come batteri, lieviti e colture cellulari.

Products	Proteins	Transgenic plants	Products	Proteins	Transgenic plants
Blood and plasma proteins	Albumin	Potato, tabacco	Hormones, cytokins and growth factors	GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor)	Tobacco, candy cane
	Aprotinin	Maize		Interferon β	Tobacco
	Collagen I	Tobacco		Interferon α	Tobacco
Vaccines	Enkephalin	Tobacco		Interferon γ	Rice
	Hemoglobin	Tobacco		Somatotropin hGH (human Growth Hormon)	Tobacco (chloroplasts)
	Human $\alpha 1$ antitrypsin	Rice		Erythropoitin	Tobacco (cells)
	Bet v 1	Tobacco		Epidermal Growth Factor (EGF)	Tobacco
	Cholera toxin B subunit	Potato		Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Moss
	Glycoprotein B from human cytomegalovirus (CMV)	Tobacco		Interleukin 2	Potato
	Cholera toxin B subunit-insulin fusion protein	Potato		Human interleukin 6	Tobacco
	D2 peptide of fibronectin binding protein B of <i>S. aureus</i>	Black bean		Interleukin 10	Tobacco
	VP1	<i>Medicago sativa</i> , Black bean		Interleukin 12	Tobacco
	VP2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Insulin like Growth factor (IGF)	Rice	
	VP4	<i>Medicago sativa</i>	Enzymes	Converting enzyme of angiotensin	Tobacco, tomato
	Hemagglutinin	Tobacco		Protein c (seric proteas)	Tobacco
Hepatitis antigen	Tobacco and Potato	Glucocerebrosidase		Tobacco (plant and seed)	
gp41 glycoprotein	Soybean	Alpha-trichosantin		Tobacco	
Enterotoxine B of <i>E. coli</i>	Potato, tabacco	Human acetylcholinesterase		Tomato	
Cholera toxine B of <i>V. cholera</i>	Potato	Dog gastric lipase		Tobacco	
Epitope of <i>P. falciparum</i>	Tobacco	Human transglutaminase	Tobacco		
Norwalk virus capsid	Tobacco, potato	Others	Hirudin	Tobacco, Colza	
G protein of rabies virus	Tobacco, spinach, tomato		Endostatin	Tobacco	
Autoantigène	Potato		Human lactoferrin	Tobacco, rice	

Figura 1.1 Elenco esemplificativo di proteine terapeutiche prodotte in pianta (da Lienard et al., 2007)

1.1.3 IL TABACCO COME SPECIE MODELLO

Il tabacco (*Nicotiana tabacum* L.) è una pianta dicotiledone, appartenente alla famiglia delle Solanacee. Delle 64 specie appartenenti al genere *Nicotiana*, soltanto *N. tabacum* L. (Figura 1.2) e *N. rustica* (anche se meno importante) sono oggi diffusamente coltivate (Ceriotti e Amandola, 1979). *N. tabacum* ($2n=4x=48$) è un allotetraploide naturale, formato dall'ibridazione di due progenitori diploidi ($2n=24$), *N. sylvestris* e *N. tomentosiformis* approssimativamente 6 milioni di anni fa (Okamoto e Goldberg, 1985). Il ciclo di una pianta di tabacco dura all'incirca 3 mesi, e una pianta genera fino a un milione di semi. La brevità del ciclo vitale e la facilità di coltivazione rendono questa specie particolarmente adatta alla ricerca scientifica (Ceriotti e Amandola, 1979).



Figura 1.2 *Nicotiana tabacum* L.

Già verso la metà del XVIII secolo furono esaminati alcuni dei primi ibridi e loro discendenti. Studi classici di genetica, citologia e fisiologia sono stati compiuti sulle specie di *Nicotiana*; tra i principali problemi studiati vi sono l'ereditarietà negli ibridi, la poliploidia, le aberrazioni cromosomiche, l'autoincompatibilità, l'ereditarietà citoplasmatica, la sintesi degli alcaloidi (nicotina), la fotosintesi, la fotorespirazione e la virologia (Ceriotti e Amandola, 1979). La maggior parte delle scoperte nel campo della cellula, delle colture cellulari e della biologia molecolare applicate ai vegetali derivano dalla sperimentazione con piante di tabacco. L'estrema versatilità dimostrata in questi studi ha fatto diventare il tabacco un sistema modello nel campo della biologia vegetale (Ganapathi et al., 2004). Lavorando con piante e colture cellulari di tabacco, Murashige e Skoog hanno sviluppato un terreno di coltura *in vitro* la cui formulazione è diventata uno standard nella trasformazione e rigenerazione di molteplici specie vegetali (Murashige e Skoog, 1962). Studi *in vitro* con colture cellulari di tabacco hanno permesso di ampliare la conoscenza sul controllo della crescita e del differenziamento dei tessuti vegetali (Ganapathi et al., 2004). Tecniche come l'isolamento, la coltivazione e la rigenerazione di piante da protoplasti o l'ibridazione somatica sono state sviluppate grazie al sistema tabacco, e da qui applicate ad altre specie. Gran parte dei metodi di trasformazione attuali sono stati sviluppati per la prima volta a partire dal sistema tabacco (Tabella 1.2).

Metodo	Riferimento
Uptake diretto del DNA	Paszkowski et al., 1984
Mediato da <i>Agrobacterium</i>	Horsch et al., 1985
Elettroporazione	Shillito et al., 1985
Mediato da liposomi	Deshayes et al., 1985
Microiniezione	Crossway et al., 1986
Biolistico	Klein et al., 1988

Tabella 1.2 Metodi di trasformazione genetica utilizzati in tabacco

Il tabacco è stato l'ospite d'elezione per gli studi di produzione di proteine di interesse terapeutico in pianta, e molte molecole sono state prodotte utilizzando questo sistema (Tabella 1.3). La produzione di proteine in tabacco rappresenta infatti un sistema ideale: la proteina eterologa viene espressa generalmente in foglia (vengono prodotte approssimativamente 40 tonnellate di foglie per acro) e il sistema produttivo non richiede che le piante siano in fase di fioritura. Le foglie contengono il 10% in peso di proteina, e si stima che possano venir prodotti circa 2.000 kg di proteina per acro ad anno (Ganapathi et al., 2004).

Proteina	Applicazione	Livello di espressione	Riferimento
Proteina C umana	Anticoagulante	0.001% SLP	Cramer et al., 1999
GM-CSF umano	Neutropenia	NR	Giddings et al., 2000
Somatotropina umana	Ormone della crescita	7 % SLP (cloroplasti)	Staub et al., 2000
Eritropoietina umana	Anemia	0.01% SLP	Kusnadi et al., 1997
EGF umano	Riparazione delle ferite e proliferazione cellulare	0.001% SLP	Cramer et al., 1999
Interferone beta umano	Epatite B e C	0.01% FW	Kusnadi et al., 1997
Emoglobina alfa e beta umane	Sostituto del sangue	0.05% SP	Cramer e Weissenborn, 1996
Collagene omotrimerico umano	Collagene	0.01% FW	Ruggiero et al., 2000
Enzima di conversione dell'angiotensina	Ipertensione	NR	Giddings et al., 2000
Alfa tricosantina	Terapia dell'HIV	2% SLP	Giddings et al., 2000

Tabella 1.3 Molecole di interesse farmaceutico prodotte in piante di tabacco transgenico

FW: fresh weight, peso fresco; SLP: soluble leaf protein, proteina solubile da foglia;

SP: seed protein, proteina di seme; NR: dato non riportato

1.1.4 TECNICA DI TRASFORMAZIONE MEDIATA DA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Agrobacterium tumefaciens è un batterio fitopatogeno Gram- presente nei suoli agrari; è l'agente eziologico dei cosiddetti "tumori del colletto" che colpiscono diverse specie vegetali, in particolar modo dicotiledoni. La presenza del tumore a livello del colletto impedisce il normale flusso xilematico delle sostanze nutritive dalla radice all'apparato fogliare (Stachel et al., 1986) (Figura 1.3).



Figura 1.3 Un tumore al colletto generato da *Agrobacterium tumefaciens*

Un fattore determinante per l'insorgenza della malattia è la presenza di una ferita a livello dei tessuti dell'ospite, dove la pianta rilascia un succo cicatriziale contenente sostanze fenoliche come acetosiringone e idrossiacetosiringone che, oltre a favorire la neosintesi di lignina, richiamano la presenza di *A. tumefaciens* e inducono nel batterio l'attivazione di geni *vir*, fattori determinanti per la patogenicità (Glick e Pasternak, 1999). Il metodo di trasformazione mediato da *A. tumefaciens* sfrutta la capacità intrinseca del batterio di infettare le piante attraverso l'introduzione stabile di un frammento di DNA batterico nel genoma della cellula vegetale ospite. La fitopatogenicità del batterio è strettamente legata alla presenza di geni *vir*, a loro volta localizzati in un plasmide chiamato pTi (*plasmid Tumor inducing*) (Glick e Pasternak, 1999) (Figura 1.4).

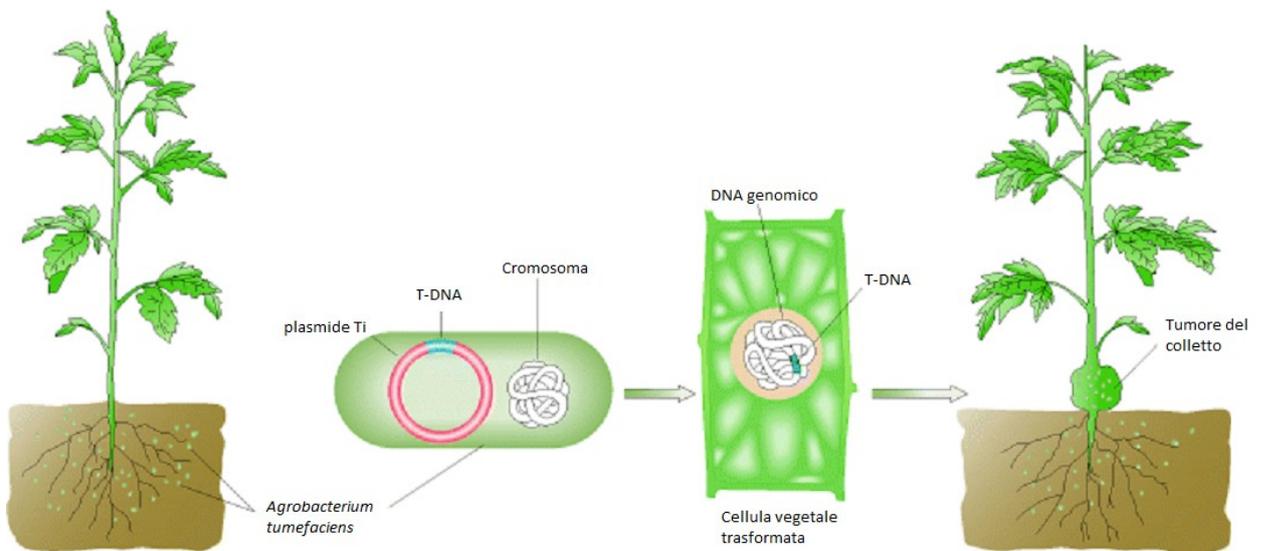


Figura 1.4 Processo di infezione di *A. tumefaciens*

Un plasmide è un frammento di DNA extranucleare di forma circolare capace, nel caso di molti fitopatogeni, di portare ulteriori informazioni genetiche funzionali all'instaurazione della malattia. Il plasmide presente in *A. tumefaciens* (pTi) è uno dei più grandi plasmidi presenti in natura (superiore a 200 kb) (Zaenen et al., 1974) (Figura 1.5). All'interno del plasmide si possono distinguere due regioni distinte: il T-DNA e l'operone/regulone *vir*. Il T-DNA, fiancheggiato da sequenze nucleotidiche conservate chiamate *right* e *left border repeat* (RBR e LBR) (Hansen e Chilton, 1999), contiene gli oncogeni che concorrono allo sviluppo del tumore del colletto e i geni responsabili della sintesi di opine (*mas*, *ocs* e *nos*), amminoacidi modificati metabolizzabili unicamente dal patogeno (Drummond e Chilton, 1978). La presenza dei geni *vir* all'interno del plasmide Ti è invece necessaria ad *A. tumefaciens* per stabilire le fasi iniziali del rapporto ospite-patogeno e introdurre stabilmente nel genoma della cellula vegetale il T-DNA sotto forma di singolo filamento nucleotidico (ssT-DNA).

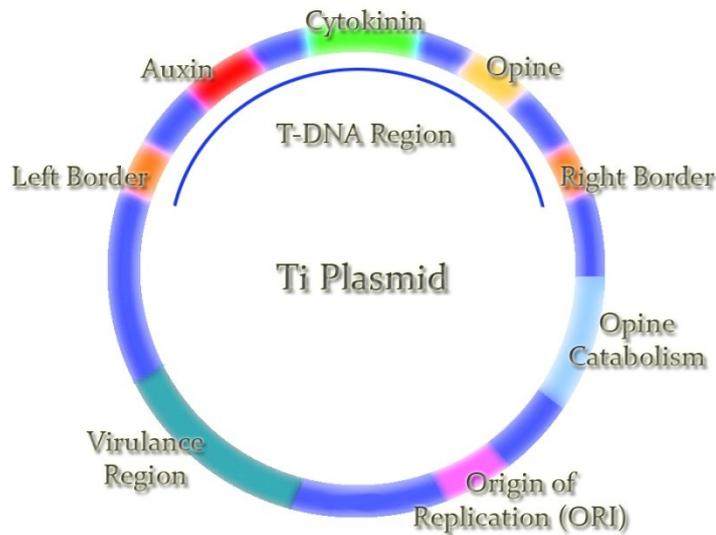


Figura 1.5 Struttura del plasmide pTi

I prodotti dei geni *virA* e *virG* sono espressi costitutivamente nella cellula batterica a bassi livelli e sono responsabili dell'attivazione a valle di altri geni *vir*, in seguito al riconoscimento di molecole segnale rilasciate dalla pianta in prossimità della ferita. Le proteine VirA e VirG mostrano somiglianze con altri sistemi di regolazione a due componenti riscontrate nei batteri (Winans, 1992). Gli altri geni *vir* sono invece coinvolti nel trasporto del ssT-DNA dalla cellula batterica alla cellula vegetale, mediante la formazione di un pilo di trasferimento i cui componenti sono codificati dai geni dell'operone *virB* (Lai e Kado, 2000). Il taglio del T-DNA avviene in corrispondenza del LBR e del RBR ed è eseguito da un'endonucleasi codificata da *virD1* e *virD2*. I prodotti dei geni *virC* aumentano invece l'efficienza del processo associandosi ad un'ulteriore sequenza chiamata *overdrive*, in corrispondenza della quale viene specificamente reclutata l'endonucleasi VirD1 (Primrose et al., 2001). Nel trasferimento alla cellula vegetale, il ssT-DNA neo-formato si associa a diversi monomeri della proteina VirE, in grado di prevenire la degradazione del DNA da parte di esonucleasi presenti nel citoplasma dell'ospite. Successivamente la presenza di proteine quali VirE1-E2 e VirF, mediate dall'azione di ricombinasi presenti nel nucleo della cellula eucariote, favorisce l'integrazione del T-DNA nel genoma dell'ospite secondo meccanismi ancora non del tutto chiariti (Figura 1.6).

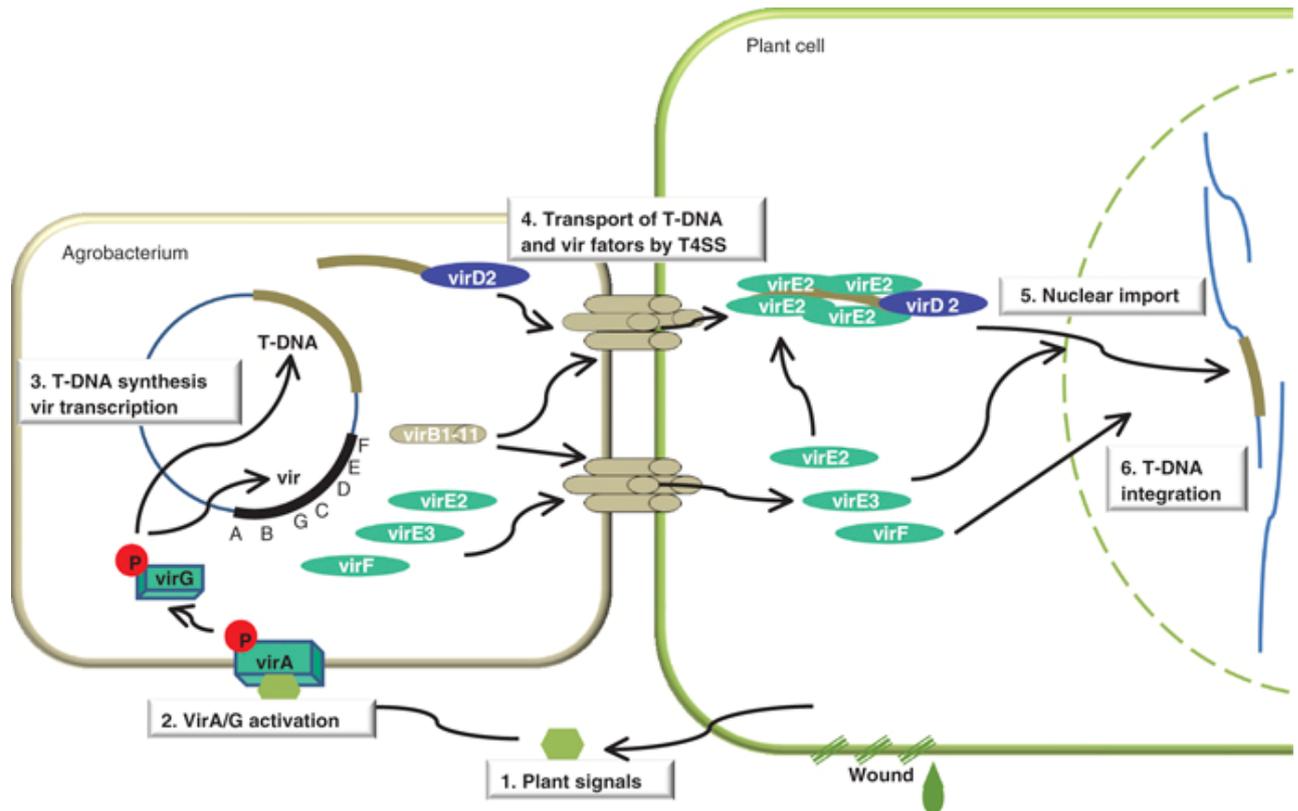


Figura 1.6 Interazione ospite-patogeno: attivazione e ruolo dei geni *vir* in un'infezione di *A. tumefaciens*

L'utilizzo di *A. tumefaciens* nella trasformazione di cellule vegetali è reso possibile dalla sostituzione della sequenza del T-DNA originario, presente sul plasmide Ti, con la sequenza genica di interesse. In questo modo, alla fase di infezione della cellula ospite segue l'introduzione di un frammento di DNA esogeno all'interno del genoma vegetale. Al fine di ovviare ad alcune caratteristiche negative intrinseche del plasmide Ti, quali il basso numero di copie e la facilità di rottura, sono state apportate alcune modifiche strutturali; la regione del T-DNA risulta infatti fisicamente separata da quella codificante i geni *vir* perché portata su un diverso plasmide, consentendo quindi la trasformazione delle cellule bersaglio solo in presenza di entrambi i plasmidi internamente alla cellula batterica. Questo "sistema binario di espressione" riduce considerevolmente le dimensioni del plasmide Ti, in quanto permette l'eliminazione dei geni coinvolti nel catabolismo delle opine, quelli deputati alla coniugazione e altri geni codificanti funzioni non essenziali. La creazione di ceppi di T-DNA disarmati è stato un miglioramento nella trasformazione, ma l'assenza di tumore ha richiesto l'impiego di un metodo alternativo per identificare i trasformati. Per risolvere il problema sono stati preparati T-DNA contenenti marcatori di selezione, così che le cellule riceventi i costrutti possono essere selezionate sulla base della presenza di resistenze a farmaci o a erbicidi (Primrose et al., 2004). L'introduzione di marcatori (come i geni *hpt* e *nptII*) ha rappresentato il primo metodo per l'identificazione semplificata dei trasformati vegetali. Il marcatore e il transgene vengono infatti clonati in tandem sullo stesso T-DNA (Sheng e Citovsky, 1996).

1.1.5 LE STRATEGIE DI ESPRESSIONE IN PIANTA

Nelle piante trasformate e nelle loro progenie si registra spesso una considerevole variabilità di espressione del transgene inserito. Considerato che tra il numero di copie integrate del transgene e il

livello di espressione genica vi è solitamente scarsa correlazione, le differenze nell'espressione sono state attribuite principalmente al cosiddetto "effetto posizione", ovvero l'influenza negativa o positiva del contesto cromatinico in cui viene casualmente a inserirsi il gene di interesse sui livelli di espressione del gene stesso (Sanders et al., 1987). Obiettivo del molecular farming è quello di ottenere trasformati che producano la proteina di interesse con alte rese; a questo proposito, la scelta del costrutto utilizzato per la trasformazione (Figura 1.7) deve essere finalizzata all'ottimizzazione di tutte le fasi dell'espressione genica, considerando anche la stabilità finale della proteina. Il gene deve innanzitutto essere trascritto correttamente e a livello adeguato; l'mRNA risultante deve essere stabile e contenere specifiche sequenze che favoriscano la sua traduzione in proteina.

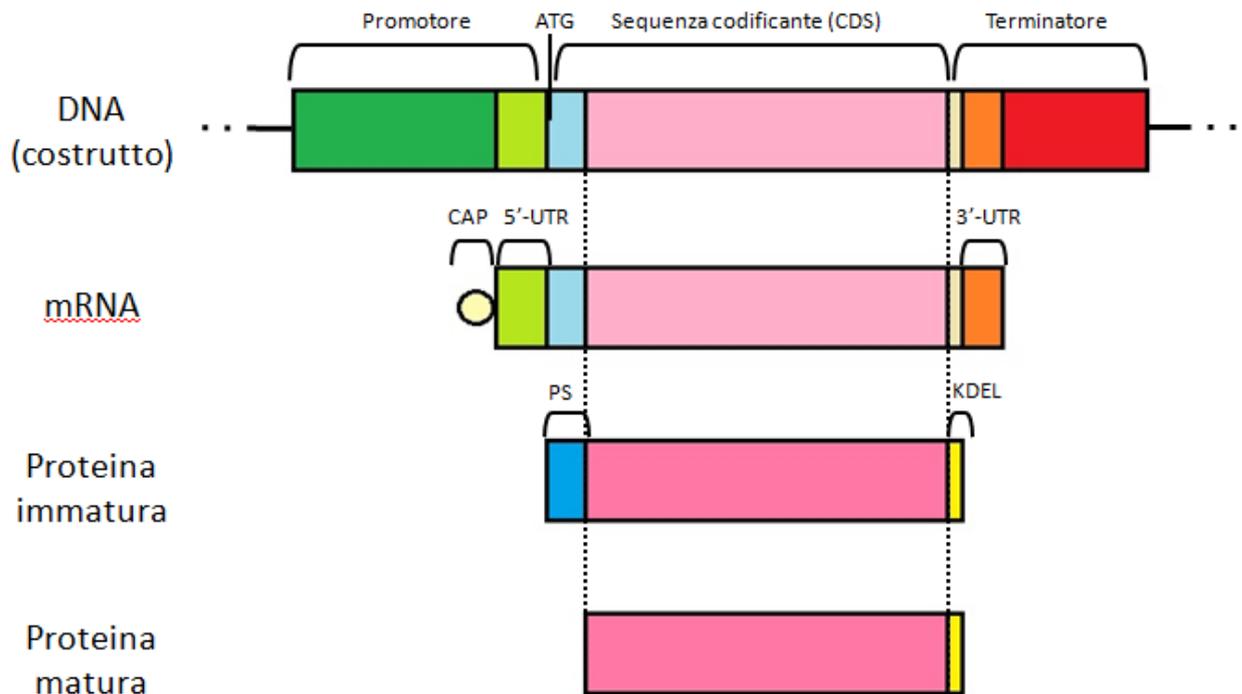


Figura 1.7 Struttura generale di una cassetta di espressione eucariotica

In questo esempio sono mostrate solamente le strutture primarie di acidi nucleici e peptidi; per semplicità è stata considerata una CDS priva di introni

Al fine di ottenere elevati livelli di trascrizione, i due elementi più importanti da considerare sono il promotore e il sito di poliadenilazione (Ma et al., 2003). I segnali di poliadenilazione più diffusi sono quelli relativi ai geni 35S di CaMV (cauliflower mosaic virus), *nos* di Agrobacterio e *ssu* di pisello (Ma et al., 2003). A livello di promotore, la scelta è senz'altro più ampia e diversificata, e per un'espressione costitutiva a livelli medio-alti ricade su promotori virali (es. virus del mosaico del cavolfiore, CaMV) o di proteine ubiquitarie (es. ubiquitina-1 di mais) (Sanger et al., 1990). Livelli di espressione troppo elevati possono, tuttavia, causare un ridotto vigore della pianta (nel caso in cui buona parte delle risorse energetiche siano impiegate nella produzione di proteine eterologhe non essenziali) o anche mettere in pericolo la sua sopravvivenza. Per questo motivo, i promotori tessuto-specifici, che regolano l'espressione del transgene esclusivamente in un determinato distretto, sono particolarmente utili poiché consentono la produzione di proteine eterologhe altrimenti fitotossiche

e facilitano le successive fasi di purificazione. Ad esempio, l'espressione di una proteina ricombinante nel seme può efficacemente prevenire effetti tossici alla pianta ospite (Chinn e Comai, 1996).

La regolazione dell'espressione genica avviene non solo a livello trascrizionale, ma anche post-trascrizionale. Le sequenze leader non tradotte in posizione 5' (5'-UTR), la scelta di codoni preferenziali per una certa specie vegetale e la presenza di sequenze destabilizzanti l'mRNA possono influenzare l'efficienza della traduzione della sequenza codificante il transgene (CDS) (Goddijn e Pen, 1995).

Poiché la subunità ribosomiale 40S interagisce per prima con il complesso che si lega al cap, la struttura e la sequenza del leader sono importanti per una traduzione efficiente (Gallie, 1993). Pertanto, al fine di migliorare l'espressione di transgeni in pianta, le sequenze 5'-UTR devono essere considerate bersagli preferenziali di opportune modifiche. Gli aspetti di una sequenza leader importanti per un'efficiente traduzione dell'mRNA sono: la lunghezza, la presenza di strutture secondarie, il contesto in cui è inserito il codone AUG e la sequenza nucleotidica (Kozak, 1991c). Le dimensioni delle sequenze 5'-UTR eucariotiche variano largamente da 3 a 572 nucleotidi, ma il 70% dei leader si caratterizza per una lunghezza compresa tra 20 e 80 nucleotidi (Kozak, 1984). Il riconoscimento del primo codone AUG può essere pregiudicato da una sequenza leader troppo corta (Kozak, 1991a) e comunque sequenze leader lunghe possono determinare un vantaggio traduzionale potendo reclutare più subunità ribosomiali 40S (Kozak, 1991b). All'estremità in 3' il leader fornisce il contesto di riconoscimento del codone di inizio traduzione, il quale si è rivelato ugualmente importante per ottenere buoni livelli di espressione (Kozak 1989). Per le piante, è stata proposta la sequenza consenso AACAAUGG (Lutcke et al., 1987).

Le proteine indirizzate al sistema endomembranoso contengono una sequenza peptidica leader N-terminale, che viene solitamente tagliata prima del completamento della traduzione e la cui assenza porta a una localizzazione citoplasmatica della proteina finale. Il taglio del peptide segnale (PS) sembra essere essenziale per garantire un corretto folding del dominio N-terminale della proteina nascente (Beena et al., 2004). I peptidi segnale che indirizzano le proteine nel reticolo endoplasmatico (ER, endoplasmic reticulum) sono caratterizzati da una regione aminotermine carica positivamente, una regione idrofobica centrale e una polare al terminale carbossilico che sembra definire il sito di taglio. Esiste una certa analogia strutturale e funzionale tra le sequenze segnale delle piante e quelle di altri organismi (Iturriaga et al., 1989). Senza ulteriori segnali, una proteina che presenta un peptide N-terminale viene indirizzata alla via secretoria, e veicolata dall'ER al Golgi verso lo spazio extracellulare (definito apoplasto nei tessuti vegetali). Utilizzando particolari sequenze (ad es. H/KDEL) al terminale carbossilico della proteina, è possibile determinarne la ritenzione nell'ER (Figura 1.7); essa tuttavia non è assoluta, in quanto esiste un flusso continuo di proteine verso il Golgi ma anche dal Golgi verso l'ER (Vitale e Denecke, 1999). Il reticolo endoplasmatico rappresenta un compartimento cellulare adatto all'espressione stabile di proteine eterologhe in quanto è un ambiente ossidante che promuove la formazione di ponti disolfuro, ha un pH neutro (7.1), è ricco in chaperoni, ed è quasi completamente privo di proteasi (Conceição e Raikhel, 1996).

1.2 LINFOMI NON-HODGKIN E VACCINI PAZIENTE-SPECIFICI

1.2.1 LINFOMI NON-HODGKIN

Linfoma è il termine generico con cui viene comunemente indicata la patologia neoplastica che coinvolge primitivamente il sistema linfoide centrale (timo o midollo osseo) e quello periferico (linfonodi, milza). Deriva da una mutazione maligna dei linfociti B o T, che proliferano in maniera incontrollata formando una massa tumorale (Mariuzzi, 2006; National Cancer Institute, 2010). I linfomi si collocano tipicamente nei linfonodi, ma possono verificarsi anche in altre zone del sistema linfatico e diffondersi attraverso i vasi sanguigni coinvolgendo altri organi (Macmillan Cancer Support, 2010).

I linfomi possono essere suddivisi in due macrocategorie: i linfomi di Hodgkin e i linfomi non-Hodgkin. Ogni 7 linfomi diagnosticati, 6 sono linfomi non Hodgkin e uno è un linfoma di Hodgkin (Codignola et al., 2010). I linfomi di Hodgkin sono caratterizzati dalla presenza di una tipologia distintiva di cellule mutate chiamate cellule di Reed-Sternberg (Figura 1.8).

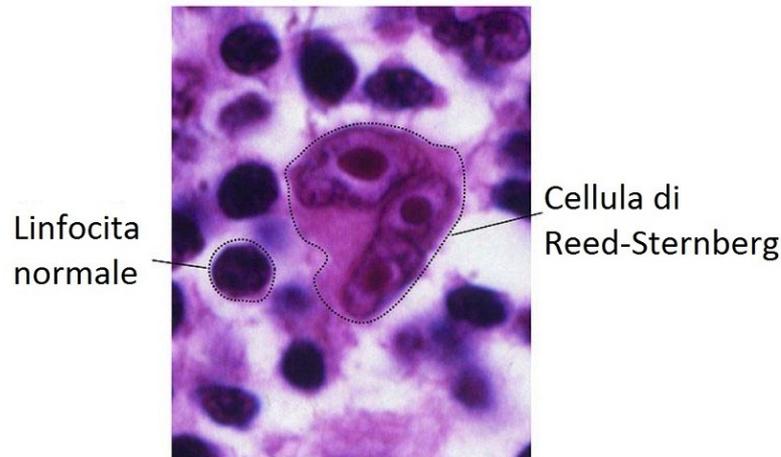


Figura 1.8 Immagine al microscopio di una cellula di Reed-Sternberg in comparazione a un linfocita sano

I linfomi non-Hodgkin (non-Hodgkin's lymphomas, NHL) rappresentano il vasto insieme di tutti gli altri linfomi. I NHL comprendono circa 30 diversi sottotipi (NHS, 2008). Secondo il sistema di classificazione delle neoplasie linfoidi della World Health Organization (WHO), i vari sottotipi di NHL sono divisi fra linfomi che prendono origine da cellule B e linfomi che originano da cellule T o natural killer (NK) (Harris et al., 2000). Questa distinzione è a sua volta ampiamente basata sul sistema di classificazione delle neoplasie linfoidi europeo-americano "REAL" (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms).

In ciascuna categoria ricadono diversi insiemi, che si differenziano secondo la morfologia cellulare, l'immunofenotipo (ossia gli antigeni espressi dalla cellula tumorale), le proprietà genetiche del tumore e il decorso clinico (Harris et al., 1994). Il linfoma diffuso a grandi cellule B (Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) e il linfoma follicolare (Follicular Lymphoma, FL) sono i sottotipi di linfoma più comuni, rappresentando complessivamente più della metà di tutti i casi di NHL (Armitage e Weisenburger, 1998). Il decorso dei NHL può essere aggressivo (caratterizzato da una rapida velocità di divisione delle cellule linfomatose) oppure indolente (quando la velocità di proliferazione delle

cellule linfomatose è lenta e c'è una gran percentuale di cellule stazionarie) (Fisher, 2003). La Figura 1.9 mostra quali dei maggiori sottotipi di NHL sono caratterizzati come aggressivi e quali come indolenti.

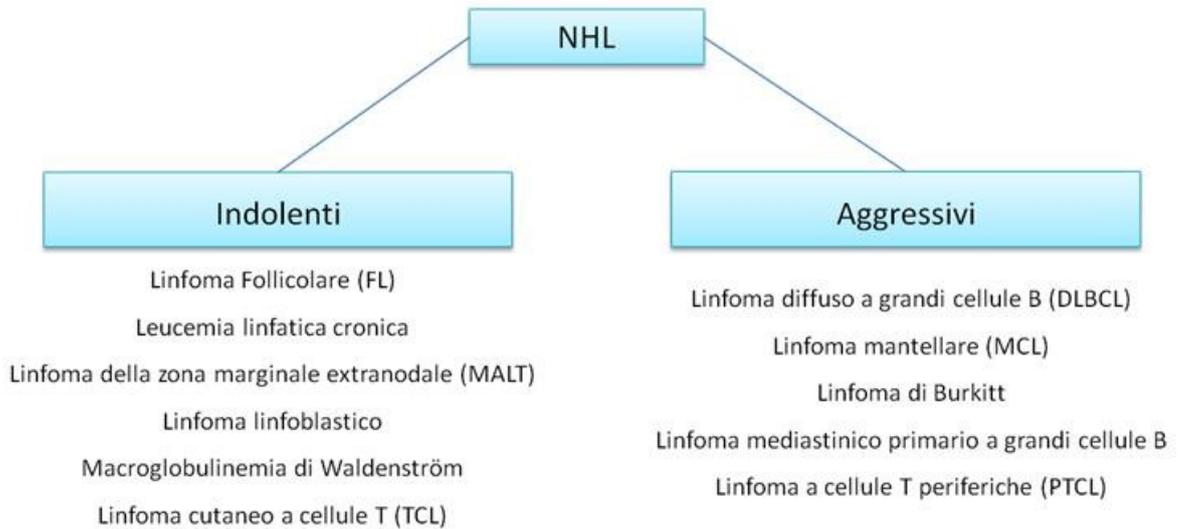


Figura 1.9 Caratterizzazione del decorso clinico per i principali sottotipi di NHL (Da Harris et al., 1994)

Il successo della terapia nei NHL dipende grandemente dal decorso clinico aggressivo o indolente: mentre i regimi terapeutici attuali possono essere risolutivi per diversi casi di NHL di tipo aggressivo, nella maggior parte dei NHL a decorso indolente i trattamenti non sono efficaci (Datamonitor, 2009).

La stadiazione dei NHL avviene secondo la classificazione di Ann Arbor (Carbone et al., 1971). In questo sistema gli stadi del linfoma sono distinti a seconda del numero di regioni linfonodali coinvolte, la loro localizzazione e il coinvolgimento di organi che non sono parte del sistema linfatico (extralinfonodali).

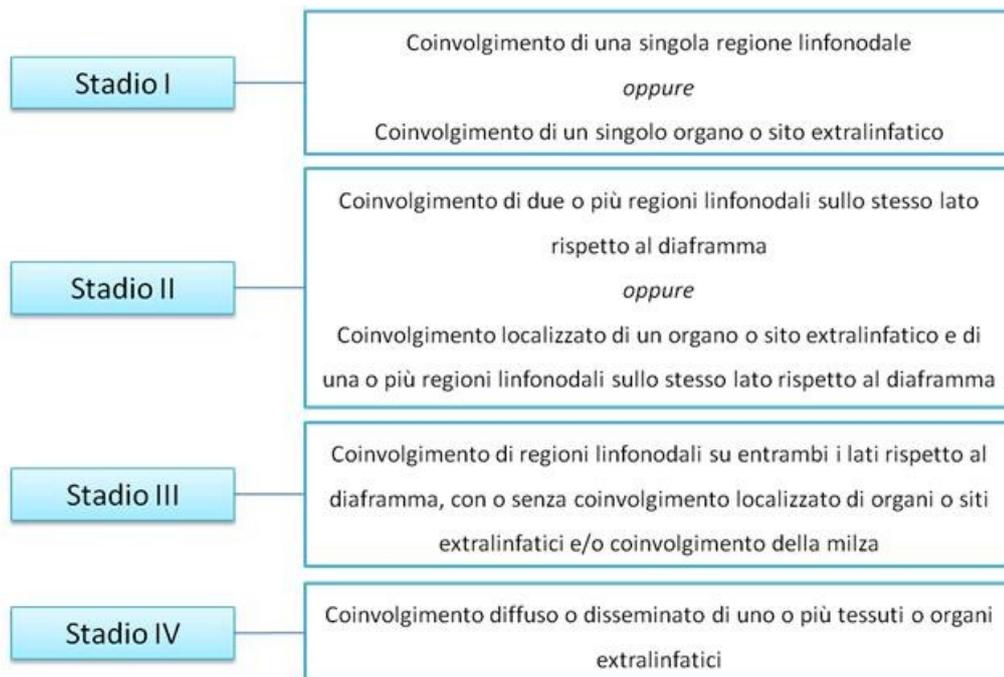


Figura 1.10 Stadi di un NHL secondo la classificazione di Ann Arbor (da Carbone et al., 1971)

Poiché la classificazione di Ann Arbor non risultava efficace nella predizione della prognosi dei NHL, nel 1993 è stato sviluppato l'Indice IPI (International Prognostic Index) all'interno dell'International non-Hodgkin's Lymphomas Prognostic Factors Project. L'indice IPI considera cinque fattori indipendenti come indicatori di una prognosi sfavorevole nei NHL aggressivi (Tabella 1.4).

Fattori indicanti una prognosi sfavorevole	
Età	>60 anni
Stadio Ann Arbor	III o IV
Livelli di LDH nel siero	Sopra il normale
Numero di siti extranodali coinvolti	≥2
ECOG PS	≥2 (o equivalente)

Tabella 1.4 Fattori considerati nell'indice IPI

LDH: lattato deidrogenasi; ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status

I diversi sottotipi di NHL possono essere differenziati anche a seconda dei vari antigeni di superficie esposti dalle cellule tumorali (ovvero il loro immunofenotipo), che aiuta a completare la loro classificazione (Harris et al., 1994). L'immunofenotipo dei linfomi ha anche importanza terapeutica, considerato che molte terapie esistenti o in fase di sviluppo - come gli anticorpi monoclonali (MAbs) e la radioimmunoterapia - sono dirette contro specifici antigeni presenti sulla superficie delle cellule linfomatose (Tabella 1.5).

Linfomi a cellule B	Immunofenotipo caratteristico **
Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL)	CD19, CD20, CD22, CD79A
Linfoma follicolare (FL)	Ig (IgM +/- IgD > IgG > IgG)*, CD19, CD20, CD22, CD79A
Mantle cell lymphoma (MCL)	IgM*, IgD*, CD5, CD19, CD20, CD22, CD43, CD79A
Leucemia linfatica cronica	CD5, CD19, CD20, CD23, CD43, CD79A
Linfoma della zona marginale extranodale (MALT)	CD19, CD20, CD22, CD79A
Linfoma di Burkitt	IgM*, CD10, CD19, CD20, CD22, CD79A
Linfoma linfoblastico dei precursori B	CD19, CD20, CD22, CD79A
Linfoma mediastinico a grandi cellule B	CD19, CD20, CD22, CD79A
Macroglobulinemia di Waldenström	IgM*, CD19, CD20, CD22, CD79A
Linfoma a cellule B della zona marginale	CD19, CD20, CD22, CD79A

Tabella 1.5 Immunofenotipi caratteristici delle principali tipologie di NHL

**** antigeni espressi nel >90% dei casi; * immunoglobulina di superficie (da Harris et al., 1994)**

Anche le anomalie genetiche aiutano nella classificazione dei NHL e giocano un ruolo principale nella patogenesi molecolare della malattia. Queste anomalie includono le traslocazioni cromosomiche, in cui vi è trasferimento di informazione genetica da un cromosoma a un altro (Harris et al., 1994).

1.2.2 TERAPIA CONTRO I NHL

Una terapia anti-tumorale contro i NHL può perseguire due obiettivi: eradicare o contenere la malattia. L'eradicazione della malattia è preferibile nei NHL ad alto grado di aggressività, poiché, sulla base di dati retrospettivi, è sicuramente possibile guarire in maniera definitiva il 50-60% dei pazienti (Armitage, 1993). Al contrario il concetto di contenimento è applicabile soprattutto alle forme di linfoma a basso grado di aggressività, per le quali più difficilmente si raggiunge una completa guarigione (non superiore al 30-40%), nonostante vi siano buone speranze di una sopravvivenza longeva anche con residui di malattia permanenti (Armitage, 1993).

C'è un vasto repertorio di opzioni terapeutiche per il trattamento dei NHL, che riflette l'eterogeneità di questo gruppo di tumori. Oltre ai farmaci citotossici per i NHL sono state approvate diverse terapie specifiche, come gli anticorpi monoclonali e la radioimmunoterapia. Anche altre classi di farmaci giocano un ruolo fondamentale nella terapia dei NHL, ad esempio gli agenti immunostimolatori come corticosteroidi e citochine (National comprehensive cancer network, 2010).

In alcuni linfomi indolenti localizzati la radioterapia può essere impiegata come unica soluzione. Nella maggior parte dei casi, però, essa è utilizzata in combinazione con la terapia farmacologica. La chemioterapia basata su agenti citotossici è stata tradizionalmente l'approccio terapeutico principale ai NHL anche dopo l'introduzione di diverse terapie specifiche. Le terapie citotossiche sono talvolta utilizzate singolarmente nei NHL, ma sono più spesso impiegate come parte di regimi combinati, che contengono almeno due agenti citotossici con o senza altri agenti come i corticosteroidi (Armitage, 1993; Macmillan Cancer Support, 2010).

Attualmente la terapia di prima linea per tali tipologie di linfoma prevede l'utilizzo di un anticorpo monoclonale (Rituximab) in associazione a un regime chemioterapico (Kosits e Callaghan, 2000) (Figura 1.11). Il Rituximab è un anticorpo monoclonale chimerico, combinante domini umani e murini, che riconosce l'antigene cellulare CD20 presente sulla superficie dei linfociti B. Questa molecola ha tre principali meccanismi d'azione: citotossicità complemento-dipendente, citotossicità cellulare anticorpo-mediata e induzione di apoptosi (Cartron et al., 2004).

L'efficacia del Rituximab in combinazione con la chemioterapia è stata per la prima volta dimostrata dal gruppo francese GELA nell'ambito di uno studio randomizzato condotto su un'ampia casistica di pazienti con età maggiore di 60 anni. Il trattamento combinato si è confermato statisticamente superiore in termini di risposta alla malattia e prospettive di sopravvivenza globale. Per la sua scarsa tossicità e per la complementarità del meccanismo d'azione, il Rituximab costituisce un reale progresso nel trattamento dei linfomi B aggressivi in qualunque fascia di età. Anche nei linfomi a basso grado di aggressività l'anticorpo monoclonale anti-CD20 (Rituximab) ha mostrato un'elevata attività antitumorale anche quando utilizzato in monoterapia (AIMAC, 2010; Hiddeman et al., 2005).

Al fine di valutare l'efficacia dell'aggiunta del Rituximab alla chemioterapia di prima linea, sono stati recentemente condotti diversi studi che hanno dimostrato come l'associazione di chemio- e

immunoterapia (o agenti biologici) sia in grado di aumentare il tasso di risposte globali e di ottenere una sopravvivenza significativamente più lunga rispetto alla sola chemioterapia (Lee et al., 2007b).

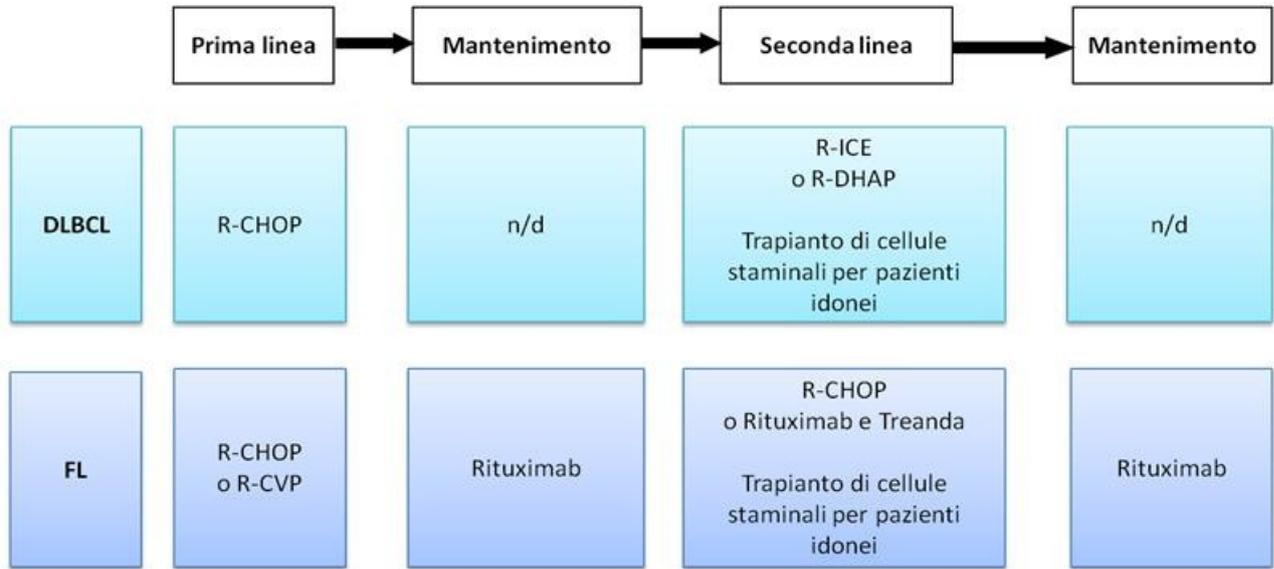


Figura 1.11 Regimi terapeutici attualmente impiegati per le principali tipologie di NHL
DLBCL: Linfoma diffuso a grandi cellule B; **FL:** linfoma follicolare; **R-CHOP:** Rituximab, ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina, prednisone; **R-CVP:** Rituximab, ciclofosfamide, vincristina, prednisone; **R-DHAP:** Rituximab, desametasone, cisplatino, citarabina, **R-ICE:** Rituximab, ifosfamide, carboplatino, etoposide (da Coiffier, 2005; Hiddemann et al., 2005; Datamonitor, 2009)

1.2.3 VACCINI IDIOTIPO-SPECIFICI

La terapia mediata da anticorpi monoclonali come il Rituximab viene definita immunoterapia di tipo passivo, poiché agisce contro il tumore senza provocare o necessitare una risposta specifica e attiva del sistema immunitario del paziente. Somministrare una molecola (come un vaccino) che stimoli il sistema immunitario dell'ospite a riconoscere e reagire contro il tumore rappresenta invece un'immunoterapia di tipo attivo (Cel Sci, 2011).

L'immunoterapia attiva può indurre una risposta antitumorale anticorpo-mediata (umorale) assieme a risposte cellulari mediate da cellule T CD4+ e CD8+ (Park e Neelapu, 2008). Risposte immuni indotte da una molecola-vaccino sono policlonali, ovvero dirette contro epitopi diversi di un antigene tumorale, e vengono preservate dai meccanismi della memoria immunologica (Bendandi, 2009). Poiché il crearsi di una risposta immunitaria di tipo policlonale può limitare l'emergenza di mutanti refrattari alle terapie standard e quindi diminuire il rischio di recidive (che tutt'ora rappresentano la principale minaccia per la sopravvivenza di pazienti affetti da NHL di tipo indolente), l'immunoterapia attiva, al contrario degli anticorpi monoclonali, supporta lo sviluppo di strategie di vaccinazione terapeutica (Park e Neelapu, 2008).

I vaccini antitumorali finora testati in trials clinici presentano tre componenti principali: un antigene specifico o associato al tumore, un carrier e un adiuvante. L'antigene tumorale è solitamente una proteina o peptide derivato dalle cellule tumorali che viene espresso selettivamente o sovraespresso dalle cellule tumorali rispetto ai tessuti sani (Bendandi, 2009; Park e Neelapu, 2008).

Il carrier, o trasportatore, è necessario per il riconoscimento dell'antigene da parte delle cellule presentanti l'antigene (antigen presenting cells, APC) come le cellule dendritiche, indispensabili per l'induzione di una risposta immunitaria. Un carrier può essere una proteina esogena, come la KHL (Keyhole-limpet hemocyanin), o un veicolo inerte come i liposomi. La KLH è una proteina portatrice di ossigeno derivata da un mollusco marino, *Magathura crenulata*. Data la sua natura altamente immunogenica, la KLH è stata studiata come stimolante non-specifico del sistema immunitario per diminuire il rischio di recidive in diversi tumori umani (Harris e Markl, 2000).

La terza componente di un vaccino antitumorale, l'adiuvante, è di solito rappresentata da una citochina che facilita ed esalta l'induzione di una risposta immunitaria contro l'antigene tumorale. La molecola più utilizzata è il fattore di stimolazione della crescita di colonie di granulociti-macrofagi (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), il cui meccanismo di azione si basa sul reclutamento e l'induzione alla maturazione di APC come le cellule dendritiche e sviluppa una risposta specifica data da cellule T CD8+ (Kwak et al., 1996; Eager e Nemunaitis, 2005).

Un antigene tumorale ideale dev'essere espresso selettivamente nel tumore, presente universalmente in tutti i pazienti, essenziale per la sopravvivenza cellulare del tumore, e deve indurre una risposta umorale policlonale assieme a una risposta immunitaria cellulo-mediata (Bendandi, 2009). L'idiotipo (Id) (Figura 1.12), l'antigene tumorale più comunemente utilizzato negli studi di vaccinazione terapeutica anti-tumorale nei NHL a cellule B, presenta molte di queste caratteristiche.

L'idiotipo consiste nella sequenza amminoacidica presente all'interno delle regioni di complementarità (CDR) delle sequenze variabili delle catene pesanti e leggere dell'immunoglobulina di superficie espressa sulle cellule B. Si tratta di una sequenza unica per ogni singolo linfocita, derivata dal riarrangiamento genico che avviene in modo casuale per ogni cellula B (Park e Neelapu, 2008).

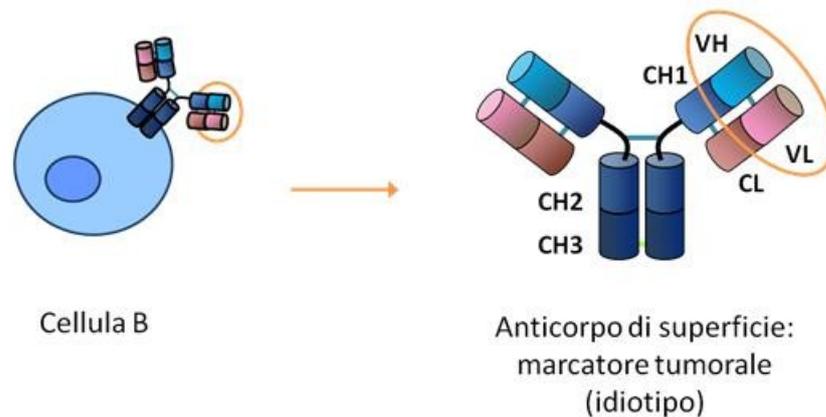


Figura 1.12 Rappresentazione di un'immunoglobulina di superficie presente sulle cellule B. Le catene pesanti sono rappresentate in blu, quelle leggere in rosa. C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}: regioni costanti della catena pesante; C_L: regione costante della catena leggera; V_L, V_H: regioni variabili della catena leggera e pesante. La zona cerchiata rappresenta la porzione variabile, dove si trova la regione idiotipica

Poiché i tumori derivati dalle cellule B sono clonali, l'idiotipo dell'immunoglobulina (Ig) tumorale è distinto da quelli delle immunoglobuline espresse sulla superficie delle cellule B sane. L'Id può essere quindi considerato un antigene specifico per il tumore, e impiegato nei NHL a cellule B che esprimono immunoglobuline di superficie (Tabella 1.5). Considerato che la regione variabile dell'Ig

tumorale varia da paziente a paziente, l'idiotipo rappresenta un antigene paziente-specifico non universale (Park e Neelapu, 2008). Per questo motivo, l'impiego dell'Id come vaccino tumorale richiede la generazione di un prodotto diversificato per ogni paziente. L'Id sembra inoltre essere essenziale per la sopravvivenza tumorale, poiché varianti in cui vi è una perdita dell'Ig di superficie sono state descritte molto raramente (Kaleem et al., 2000; Li et al., 2007). Ciò sembra essere dovuto al fatto che le Ig di superficie svolgono la funzione di recettore cellulare, e possono trasmettere segnali proliferativi e anti-apoptotici, necessari per la crescita tumorale (Küppers, 2005). Infine, le vaccinazioni mediante Id sono state associate all'induzione di risposte umorali policlonali che possono minimizzare l'emergenza di varianti tumorali in grado di sfuggire alla terapia (Bendandi et al., 1999; Baskar et al., 2004).

Tradizionalmente, l'Ig di superficie veniva prodotta con una tecnica di ibridazione sviluppata presso il laboratorio di Ronald Levy all'Università di Stanford. In questo metodo, cellule tumorali ottenute dalla biopsia di un linfonodo vengono fuse a un eteroibridoma K6H6/B5 sensibile all'ipoxantina-aminoptericina-timidina per produrre un ibridoma secernente l'Ig tumorale (Warnke e Levy, 1980; Carroll et al., 1986) (Figura 1.13).

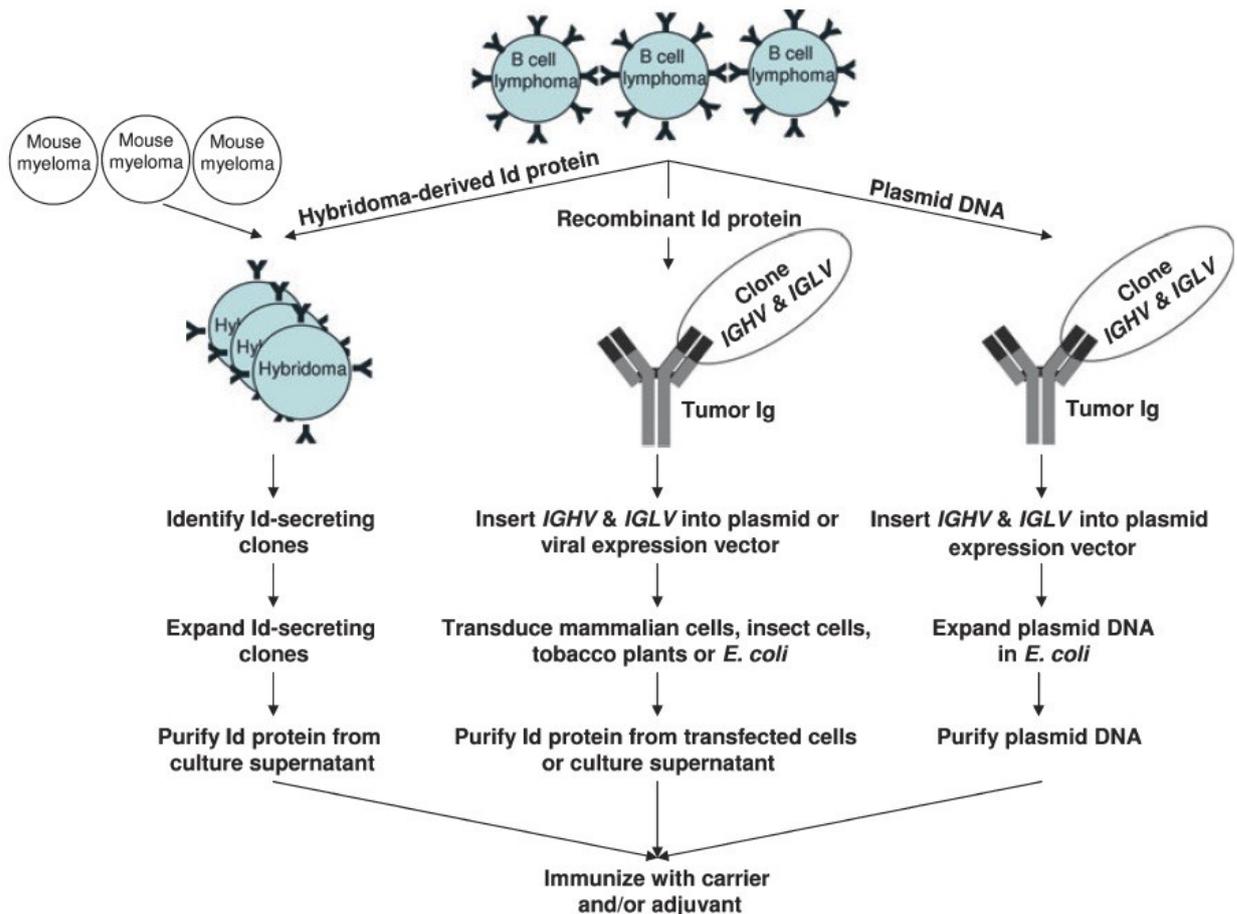


Figura 1.13 Strategie di produzione di vaccini idiotipo-specifici
IGHV e IGLV: regioni variabili delle catene pesanti (H) e leggere (L) dell'Ig di superficie
(da Park e Neelapu, 2008)

Gli ibridomi che secernono le immunoglobuline con l'Id di interesse sono identificati comparando la sequenza della regione variabile sulla catena pesante dell'Ig con quella del tumore del paziente. I cloni selezionati vengono espansi e la proteina secreta viene purificata dal substrato di coltura (Lee et al., 2007a). Sebbene questa tecnica sia generalmente efficace, è lunga e laboriosa, richiedendo fino a 6 mesi per la produzione di un vaccino paziente-specifico.

Recentemente è stata utilizzata la tecnologia del DNA ricombinante per produrre vaccini portanti l'Id con l'obiettivo di accorciare i tempi di produzione. In questo tipo di approccio, le regioni variabili delle catene leggere e pesanti delle Ig di superficie del tumore vengono clonate tramite PCR (polymerase chain reaction) ed inserite in vettori di espressione per la produzione in sistemi eterologhi come cellule mammarie o di insetto, piante di tabacco, o *Escherichia coli* (McCormick et al., 1999; Hurvitz e Timmerman, 2005; Kanter et al., 2007).

Un'alternativa all'impiego della proteina-idiotipo come vaccino è l'utilizzo di vaccini a DNA, per diminuire ulteriormente i tempi di produzione. In questo approccio, i geni specifici per le Ig tumorali possono essere clonati sotto il controllo di elementi regolatori ed espressi in una singola cassetta di espressione (Hawkins et al., 1993, 1994). In questo caso l'idiotipo viene espresso attraverso un polipeptide consistente unicamente dei singoli frammenti variabili delle catene pesanti e leggere dell'Ig di superficie, uniti assieme da una regione linker; questo polipeptide prende il nome di scFv (single-chain fragment variable) (Benvenuti et al., 2002). Il vaccino a DNA viene poi iniettato per via intradermica o intramuscolare, o somministrato tramite bombardamento con micro-particelle di oro su cui viene adsorbito il DNA di interesse (Gene gun), e il vaccino viene espresso dai miociti o cheratinociti della zona di somministrazione (Sakamaki et al., 2011). Studi preliminari indicano che l'scFv è debolmente immunogenico, con conseguenti modeste risposte immuni antitumorali nella maggior parte dei casi (Timmerman et al., 2002).

1.2.4 ANTICORPI E MOLECOLE SIMIL-ANTICORPALI

Una molecola immunoglobulinica o anticorpo è generalmente composta da subunità formate da due catene pesanti (H, heavy) e due leggere (L, light) identiche fra loro. Le Ig possono essere divise in classi e sottoclassi in base a differenze nella struttura delle regioni costanti delle catene H (C_H) (Figura 1.14).

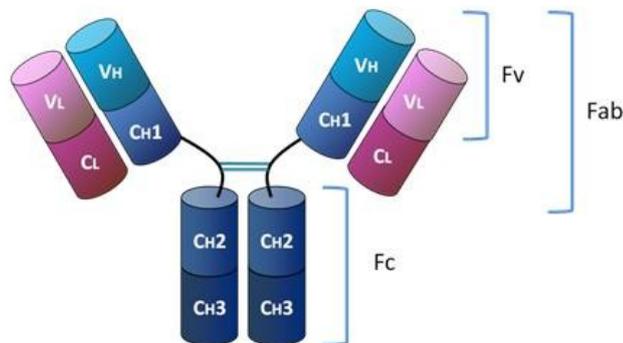


Figura 1.14 Struttura di un'immunoglobulina. In rosa le regioni variabile e costante della catena leggera (V_L , C_L); in blu quelle della catena pesante (V_H , C_H1 , C_H2 , C_H3); Fv: frammento variabile, V_L+V_H ; Fab: frammento legante l'antigene (Fragment, antigen binding), C_H1+V_H e C_L+V_L ; Fc: frammento costante con tendenza a formare aggregati (Fragment, crystalizable), $C_H2 + C_H3$

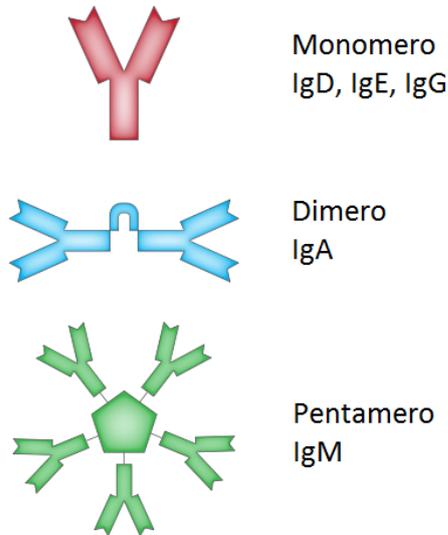


Figura 1.15 Rappresentazione grafica della struttura dei diversi sottotipi di Ig

Anticorpo	Catena pesante	Numero di domini C _H	Concentrazione nel siero (µg/mL)	Emivita sierica (giorni)	Forma secretoria	PM (kD)	Funzioni
IgA 1/2	α1/2	3	3/0.5	6	Monomero, dimero, trimero	150 / 300 / 400	Immunità a livello mucosale, immunità passiva del neonato
IgD	δ	3	Tracce	3	Nessuna (proteina di membrana)	180	Recettore antigenico sui linfociti B "vergini"
IgE	ε	4	0.05	2	Monomero	190	Ipersensibilità immediata
IgG 1/2/3/4	γ1/2/3/4	3	9/3/1/0.5	23	Monomero	150	Opsonizzazione, attivazione del complemento, citotossicità cellulare anticorpo-dipendente, immunità neonatale, immunità passiva, feedback inibitorio dei linfociti B
IgM	μ	4	1.5	5	Pentamero	950	Recettore antigenico sui linfociti B "vergini", attivazione del complemento

Tabella 1.6 Isotipi degli anticorpi umani, caratteristiche e funzioni (da Abbas et al., 2002)

Queste classi, chiamate isotipi, sono denominate IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e presentano catene pesanti rispettivamente di tipo α, δ, γ, ε e μ. Nell'uomo gli isotipi IgA e IgG possono essere ulteriormente divisi in sottoclassi (IgA 1 e 2, IgG 1, 2, 3 e 4); nel topo, l'isotipo IgG viene suddiviso nei

sottotipi IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Di tutte le classi anticorpali, le IgG sono le forme secretorie più comuni e stabili, e sono presenti nel siero in forme solubili monomeriche (Abbas et al., 2002) (Figura 1.15; Tabella 1.6). Esistono inoltre due classi o isotipi di catena leggera, denominati κ e λ , che si differenziano per le regioni C-terminali. Ogni molecola anticorpale possiede due catene leggere κ o due λ , ma mai due di diverso isotipo. Nell'uomo circa il 60% delle molecole anticorpali possiede catene leggere κ e il restante 40% contiene catene leggere λ , mentre nel topo gli anticorpi contenenti catene leggere κ sono 10 volte più rappresentati nel siero rispetto a quelli con catene leggere λ . Diversamente dagli isotipi delle catene pesanti, non sono note differenze funzionali negli anticorpi legate all'isotipo della catena leggera (Abbas et al., 2002).

Gli anticorpi monoclonali (Mab) rappresentano oltre il 30% dei biofarmaci presenti nei trial clinici, e circa il 60-70% di tutte le proteine ricombinanti a uso farmaceutico attualmente prodotte nelle cellule mammifere (Li et al., 2007). I Mab sono prodotti generalmente nella forma solubile di IgG.

Nella produzione di IgG, entrambe le catene raggiungono il reticolo endoplasmico come polipeptidi non strutturati, e vengono poi modificate ed assemblate nella loro forma finale, adatta alla secrezione. Catene H singole non vengono secrete (Morrison e Scharff, 1975) a meno che non siano prima combinate con le catene L per formare una molecola anticorpale completa (Sonenshein et al., 1978; Leitzgen et al., 1997). Al contrario, la maggior parte delle catene L possono essere secrete come monomeri o omodimeri (Shapiro et al., 1966; Skvortsov e Gurvich, 1968). Anche in questo caso, però, la secrezione di alcune catene L dipende dall'associazione con catene H (Oi et al., 1983). Nelle cellule B, le catene L vengono sintetizzate il 15–25% più rapidamente rispetto alle H (Bergman et al., 1981) e l'isotipo della catena L può influenzare la cinetica dell'assemblamento della IgG a livello intracellulare (Montano e Morrison, 2002). Ne deriva che la produzione di IgG ricombinanti in sistemi ospiti necessita di una fine regolazione dell'espressione di entrambe le catene (Li et al., 2007).

Tutti i Mab attualmente in commercio sono composti da catene proteiche derivate da fonti umane o murine, o da una combinazione di entrambe. I Mab che derivano esclusivamente da sequenze di topo sono definiti murini. Mab chimerici sono formati da regioni variabili derivate da fonte murina e regioni costanti da fonte umana. Nei Mab umanizzati, solamente le regioni variabili che effettivamente legano l'antigene (chiamate regioni di complementarità, o CDR) hanno derivazione murina, mentre la restante parte variabile e la regione costante hanno derivazione umana. Il nome generico di un Mab rivela queste caratteristiche; il suffisso -mab, comune a tutti, è preceduto da una o due lettere che indicano l'origine genetica della molecola: o = murina, xi = chimerica, zu = umanizzata, u = umana. Ad esempio, il tositumomab è murino, il rituximab è chimerico, il bevacizumab è umanizzato e il panitumumab è umano. In generale, l'immunogenicità di un Mab diminuisce in base all'aumentare della porzione di sequenza proteica di derivazione umana (Landes Bioscience, 2011; Abbas et al., 2002).

Grazie alle tecniche di ingegneria genetica, i domini delle catene leggere e pesanti di un anticorpo possono essere combinati in diversi modi per formare frammenti in grado di legare l'antigene (Figura 1.16). Il frammento Fab (fragment, antigen binding), isolato per le prime volte dalla digestione di un anticorpo intero mediante papaina, è formato dall'insieme delle regioni variabili della catena leggera (V_L) e pesante (V_H) assieme a regioni costanti delle due catene (C_L , C_{H1}). Gli scFv (single chain fragment variable) (cfr. § 1.2.3) sono invece prodotti mediante unione dei domini V_L e V_H tramite un peptide linker. Gli scFv possono dimerizzare tramite interazioni "a cerniera" (zipper), ma possono anche formare dimeri (diabodies) quando vengono utilizzati linkers corti. Inoltre, gli scFv possono

essere combinati con altri frammenti anticorpali, come le regioni C_H e i frammenti cristallizzabili (Fc). Questi derivati differiscono dalla molecola IgG intera originale per affinità verso l'antigene, immunogenicità ed emivita in circolazione (Landes Bioscience, 2011; Abbas et al., 2002). Ad esempio, la sostituzione di un Mab di impiego farmaceutico con i relativi frammenti Fab o scFv riduce il peso molecolare della proteina di 3 o 6 volte, permettendo una diffusione tissutale migliore e minor ritenzione in organi come il fegato. Non vi sono generalmente perdite significative nell'affinità o nella specificità per l'antigene. La differenza più importante è a livello di proprietà farmacocinetiche e di eliminazione corporea: Fab e scFv hanno un'emivita sierica inferiore a un giorno (circa 0.5 – 21 ore) invece di circa 3 settimane come una IgG normale. Questo è dovuto alla piccola dimensione dei frammenti, che permette una rapida eliminazione renale attraverso la filtrazione glomerulare (Peterson et al., 2006).

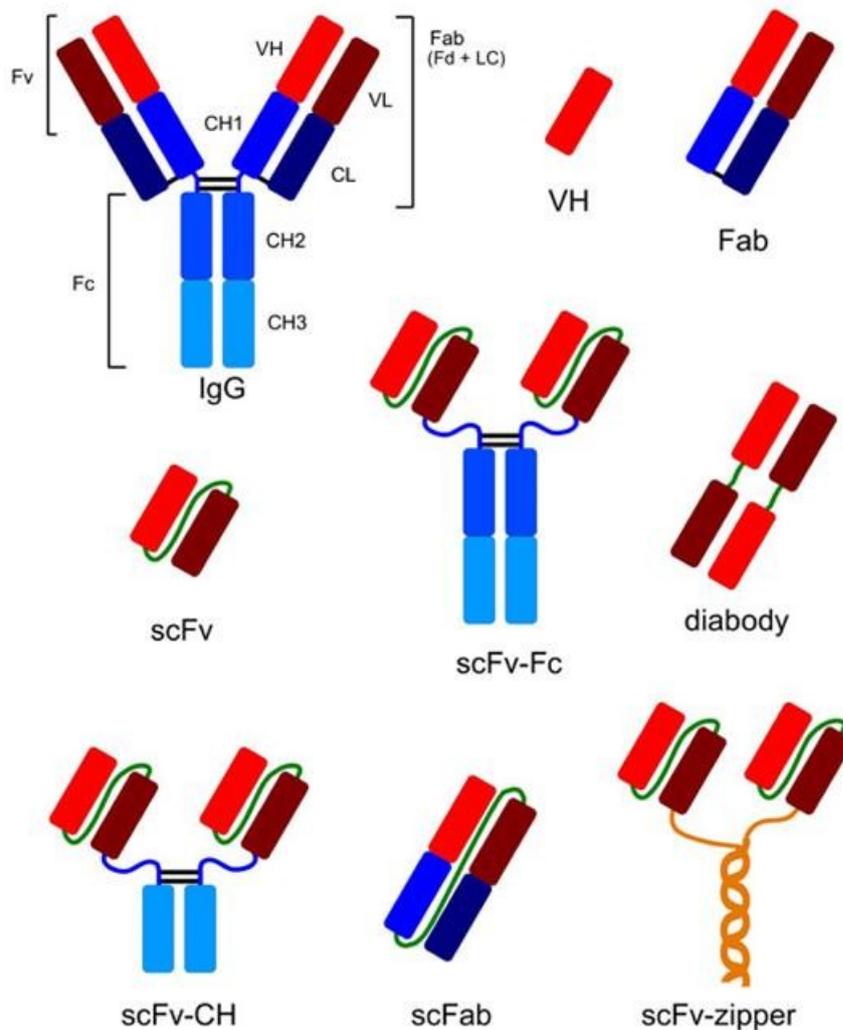


Figura 1.16 Mab e frammenti derivati
(da Landes Bioscience, 2011; Michael Hust, Technical University of Braunschweig)

I frammenti anticorpali trovano diversi utilizzi, sia nella ricerca, sia a livello diagnostico o clinico. Gli scFv, ad esempio, sono stati sviluppati e utilizzati in primis nell'ambito della ricerca, per sostituire gli anticorpi interi in una tecnica di laboratorio chiamata phage display library, che studia interazioni proteina-proteina, dov'è più conveniente esprimere il dominio di legame all'antigene come singolo peptide (Nissim et al., 1996). Molecole di fusione scFv+Fc, sotto forma di minianticorpi, sono state

impiegate per scopi simili in studi sui disordini autoimmuni *in vivo* su modelli animali (Di Niro et al., 2007). Molecole simil-anticorpali hanno anche ampie applicazioni nella medicina veterinaria; ad esempio un derivato anticorpale composto da un scFv specifico per il coronavirus porcino fuso al dominio ϵ -C_H4 derivato da una IgE umana è stato dimostrato immunizzare passivamente i maiali contro il virus della gastroenterite (Monger et al., 2006). Nelle tecniche diagnostiche di imaging tumorale, l'uso di Mab interi è sconsigliabile proprio a causa dell'alta emivita e della difficile diffusione nei tessuti caratteristiche di queste molecole; gli scFv d'altra parte non vengono ben assorbiti dal tumore a causa della loro elevata clearance renale. Per ovviare a questo problema sono state sviluppate molecole di dimensione intermedia, come i diabody (Hudson e Kortt, 1999) (Figura 1.16). Un diabody specifico per l'antigene carcinoembriogenico (CEA) è stato prodotto con successo anche in foglia di tabacco (Vaquero et al., 2002). Gli scFv o altri frammenti anticorpali possono essere inoltre fusi a immunotossine ed enzimi per scopi diagnostici o terapeutici (Pastan et al., 1996; Senter et al., 1988).

Nell'ambito dei vaccini idiotipo-specifici, molti studi preliminari su modelli murini hanno saggiato l'efficacia e le potenzialità dell'impiego di IgG e scFv di derivazione tumorale nella terapia dei NHL (McCormick et al., 2008; Park e Neelapu, 2008). Sebbene questi studi abbiano dimostrato la potenziale efficacia della vaccinazione anti-idiotipica in modelli di linfoma, mieloma e leucemia, le risposte immunitarie e l'effettiva protezione dal tumore riscontrate si sono dimostrate deboli quando veniva impiegata la proteina-idiotipo come tale (Stevenson e Stevenson, 1975; Freedman et al., 1976; Stevenson et al., 1977; Kaminski et al., 1987; Kwak et al., 1990). Kaminski e coll. (1987) osservarono che la reazione immunitaria antitumorale veniva indotta in modo ottimale se l'idiotipo veniva coniugato a una proteina carrier fortemente immunogenica, come il KLH (cfr. § 1.2.3). Gli approcci clinici di maggior successo nella vaccinazione anti idiotipica vedono proprio l'uso di scFv derivati dal tumore coniugati al carrier KLH, tanto che l'impiego in terapia delle IgG tumorali o di loro frammenti tal quali non è più stato considerato (Park e Neelapu, 2008).

1.2.5 NUOVA MOLECOLA: IL MINIBODY

Il gruppo di ricerca presso cui è stato svolto questo lavoro ha ideato e sviluppato una molecola chimerica simil-anticorpale da impiegarsi come vaccino nella terapia dei linfomi non-Hodgkin a cellule B, un minibody.

I minibody sono molecole proteiche simil-anticorpali che nella struttura ricordano un piccolo anticorpo. Uniscono tipicamente una porzione scFv a un dominio C_H3, grazie al quale possono dimerizzare (Hu et al., 1996; Cesco-Gaspere et al., 2008). Solitamente i minibody vengono marcati con sonde isotopiche e impiegati come strumenti per l'imaging e la diagnostica molecolare oppure utilizzati per saggi *in vitro* (Olafsen et al., 2009), ma diversi studi recenti stanno rivalutando il loro impiego in ambito terapeutico (Zauli et al., 2010; Gagnon et al., 2010).

Il minibody qui proposto nasce specificamente come molecola terapeutica per i NHL; come tale, riunisce in sé tutte e tre le componenti tipiche della formulazione di un vaccino: un marcatore tumorale, un carrier e un adiuvante (cfr. § 1.2.3) (Figura 1.17).

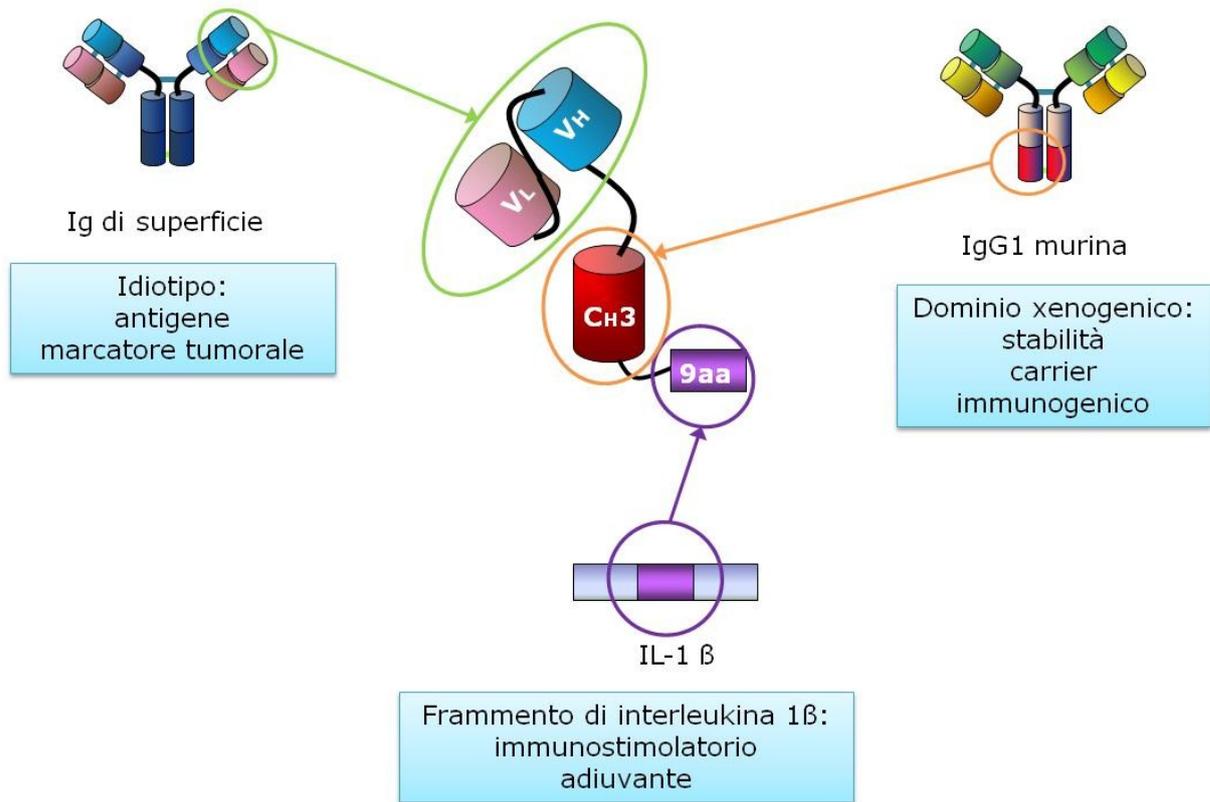


Figura 1.17 Struttura del minibody

Il marcatore scelto è l'idiotipo tumorale, antigene di superficie specifico per il NHL e diverso per ogni paziente (cfr. § 1.2.3). Nel minibody qui presentato, l'idiotipo tumorale è presente sotto forma di scFv: le due regioni anticorpali V_L e V_H sono collegate da una sequenza peptidica artificiale (linker). Il linker qui utilizzato è una sequenza di 18 amminoacidi che garantisce un folding ottimale della molecola, conferendo proprietà di ridotta aggregazione e maggior resistenza alla proteolisi *in vitro* (Whitlow et al., 1993).

L'idiotipo è a sua volta unito a una molecola carrier che, diversamente da quanto accade per la KLH, non è unita a posteriori per legame chimico, ma viene sintetizzata in un'unica catena polipeptidica assieme al marcatore. Il carrier scelto consiste nel dominio C_{H3} di una molecola di IgG1 murina. La presenza di un dominio C_{H3} garantisce una buona stabilità della molecola e un aumento della sua emivita, rendendo possibile la dimerizzazione delle singole molecole di minibody (Cesco-Gaspere et al., 2008) (Figura 1.18). Il dominio C_{H3} xenogenico, ovvero derivato da una specie diversa rispetto all'organismo di destinazione (murino vs. umano), svolge un ruolo immunogeno e garantisce il riconoscimento dell'antigene da parte del sistema immunitario dell'ospite. Diversi gruppi hanno dimostrato l'efficacia dell'uso di domini xenogenici in modelli murini (tramite l'utilizzo di domini anticorpali umani) (Syrengelas et al., 1996; Li et al., 1997; Benvenuti e Burrone, 2001).

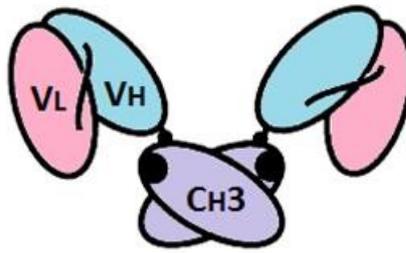


Figura 1.18 Dimerizzazione di un minibody (da Hu et al., 1996)

L'adiuvante è solitamente presente in formulazione separata rispetto al vaccino, come accade per il comunemente utilizzato GM-CSF (cfr. § 1.2.3). La molecola qui proposta prevede invece l'impiego di una sequenza polipeptidica unita alla molecola-vaccino e sintetizzata assieme ad essa. Si tratta di un frammento di interleuchina 1 β (IL1 β), una citochina umana dalle proprietà immunostimolatorie. Il nonapeptide impiegato, consistente nei residui 163-171 (VQGEESNDK), riproduce le proprietà immunostimolatorie e adjuvanti della citochina senza possedere gli effetti pro-infiammatori, vasoattivatori e pro-proliferativi della molecola IL1 β intera (Boraschi e Tagliabue, 1999). Questo frammento è stato dimostrato essere un adjuvante funzionale per molecole debolmente immunogeniche sia somministrato assieme all'antigene che separatamente da esso; può essere utilizzato sia come peptide a sè stante che collegato alla molecola vaccino (Beckers et al., 1993; Boraschi e Tagliabue, 1999).

Il minibody risultante deriva quindi dall'unione di un antigene tumorale ideale (Id), un carrier xenogenico (C_H3 murino) e un adjuvante immunostimolatore (nonapeptide IL1 β). Questi tre domini sono collegati assieme e costituiscono una sequenza polipeptidica unica; la sintesi della molecola può avvenire quindi in modo più semplice e diretto rispetto a quanto accade per gli anticorpi interi (che prevedono l'espressione e il successivo assemblaggio di due catene separate) (cfr. §1.2.4) o domini scFv coniugati a carrier esterni (che devono essere assemblati mediante processamento chimico a valle della sintesi) (cfr. § 1.2.3).

In questa tesi sono state considerate quattro diverse varianti di minibody, che differiscono per il tipo di regione C_H3 utilizzata (derivata da IgG1 murina o IgG1 umana) e per la presenza o assenza del nonapeptide IL1 β . Queste varianti base, chiamate Va, Vb, Vc e Vd (dove V sta per vaccino) (Figura 1.19), sono state progettate in previsione di una sperimentazione pre-clinica, in modo da garantire lo studio dell'efficacia delle singole componenti del vaccino. Nel modello animale il dominio C_H3 murino verrebbe riconosciuto come self, mentre il C_H3 umano risulterebbe xenogenico.

La sequenza idiotipo (V_L-V_H) utilizzata nei minibody presenti non è derivata da biopsie umane ma dalla linea cellulare tumorale murina linfoblastoide BCL1 (BCL sta per B-cell lymphoma), originata da un linfoma spontaneo ottenuto da un topo femmina BALB/c. La linea BCL1 esprime in superficie per lo più IgM monomeriche, poiché deriva da precursori di linfociti B (il passaggio dall'espressione di IgM a IgG avviene durante la maturazione dei linfociti B a cellule della memoria o plasmacellule; in questa transizione l'isotipo della catena pesante viene cambiato da μ a γ , mentre la regione antigene-specifica dell'Ig rimane invariata) (Chen et al., 1986; Cesco-Gaspere et al., 2008). L'idiotipo tumorale

BCL1 qui utilizzato come prototipo è adatto a una possibile indagine su modelli animali (Benvenuti e Burrone, 2001).

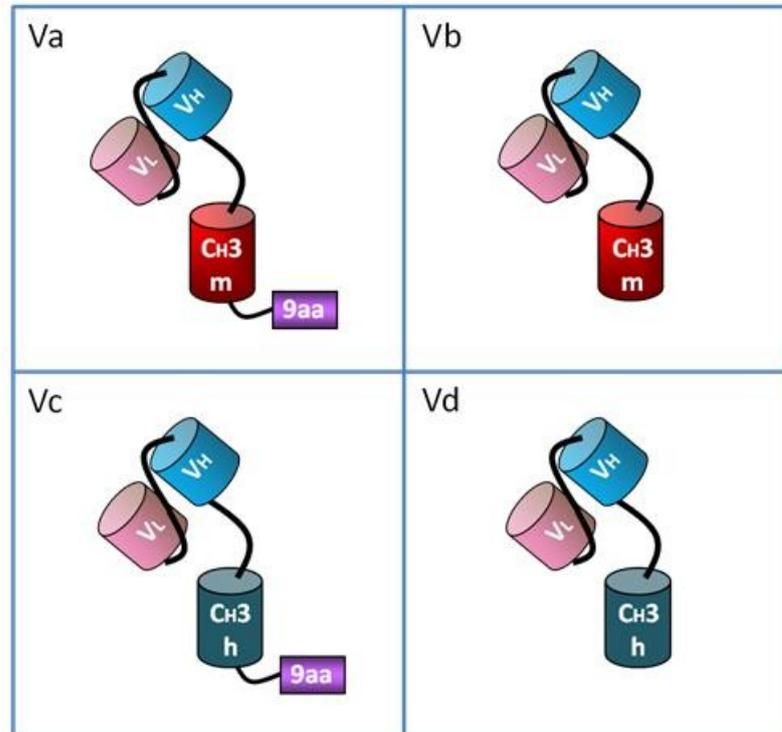


Figura 1.19 Quattro varianti base del minibody; m: murino, h: umano

2. SCOPO DELLA TESI

Il progetto di ricerca esposto in questa tesi ha lo scopo di saggiare la fattibilità e ottimizzare il procedimento di produzione di molecole simil-immunoglobuliniche in pianta, utilizzando le varianti di minibody come prototipo base e sfruttando il tabacco, specie modello per le dicotiledoni, come piattaforma produttiva.

Il conseguimento di questo obiettivo ha richiesto uno svolgimento di ricerche indirizzate alla comprensione e al miglioramento del sistema di espressione su più livelli. Di seguito sono elencati i punti fondamentali di questo lavoro.

- Analisi delle caratteristiche teoriche della molecola minibody, sfruttando le risorse bioinformatiche a disposizione, al fine di approfondire la conoscenza sulla proteina e predire il suo comportamento *in vitro*.
- Valutazione del sistema vettoriale attuale e ideazione di modifiche da saggiare per ottimizzarne la qualità e i livelli di espressione, in specifico:
 - valutazione ed eventuale sostituzione della sequenza peptide segnale;
 - indirizzamento della molecola a un diverso compartimento cellulare (confronto fra localizzazione in apoplasto e in reticolo endoplasmico);
 - sostituzione degli elementi regolatori della cassetta di espressione (promotore 35S_{LLTCK}, terminatore nos) con altri potenzialmente più vantaggiosi (promotore tessuto-specifico e luce-inducibile "RuBisCO" e relativo terminatore);
 - valutazione del backbone vettoriale (pSTART) e confronto con un sistema vettoriale diverso (pCAMBIA).
- Effettuazione di trasformazioni stabili di *N. tabacum* per verificare la corretta espressione delle forme base di minibody e porre a confronto le potenziali migliorie introdotte.
- Elaborazione dei dati ottenuti e relativa analisi statistica per valutare la significatività delle eventuali differenze riscontrate.
- Studi preliminari sulle caratteristiche biochimiche della molecola *in vivo* (conferma della sua integrità) e su strategie di purificazione specifiche impiegabili (cromatografia di affinità).
- Prove di trasformazione transitoria (agroinfiltrazione) con lo scopo di mettere a punto un sistema di espressione rapido per la futura valutazione di nuovi sistemi vettoriali.

Per quanto riguarda la progettazione e il confronto di diversi elementi regolatori all'interno della cassetta di espressione per il transgene (promotore, terminatore), si è deciso di non impiegare vettori portanti la sequenza codificante per il minibody, sostituendola con un gene reporter conosciuto e largamente utilizzato: la β -glucuronidasi (GUS). Questo cambiamento è stato introdotto col duplice scopo di poter sfruttare un sistema di rilevazione e di analisi dei livelli di espressione già noto (GUS è utilizzato universalmente come uno dei geni reporter di elezione per la valutazione dei livelli di espressione dei trasformati) e di poter comparare più facilmente i risultati ottenuti con altri lavori effettuati da gruppi di ricerca esterni. GUS permette inoltre di effettuare saggi di tipo qualitativo (istochimici, allestibili anche su tessuti *in vivo*) oltre a quelli di tipo quantitativo (fluorimetrici).

3. MATERIALI E METODI

3.1 STRUMENTI DI ANALISI BIOINFORMATICA

In questo lavoro sono state impiegate diverse applicazioni per l'analisi bioinformatica di sequenze nucleotidiche e proteiche. Si tratta di servizi e software disponibili on-line, a libero accesso e universalmente utilizzati per scopi di ricerca.

3.1.1 ENTREZ - NCBI WEBSITE

L'Entrez Global Query Cross-Database Search System è un sistema di ricerca integrato tra banche dati biomediche contenenti informazioni di tipo differente. È coordinato dal National Center for Biotechnology Information (NCBI) statunitense, parte della National Library of Medicine (NLM), essa stessa parte dei National Institutes of Health (NIH). Entrez è un potente motore di ricerca che permette un'indagine contemporanea su differenti database biomedici. I database utilizzati in questo lavoro sono Protein (sequenze amminoacidiche), Nucleotide (sequenze nucleotidiche, Genbank) e Pubmed (citazioni).

PubMed è un database che comprende più di 21 milioni di citazioni di letteratura di ambito biomedico derivate da MEDLINE, riviste specifiche e libri. Le citazioni e gli abstracts in PubMed coprono i campi della biomedicina e della salute, includendo ambiti come scienze della vita, comportamentali, chimiche e bioingegneristiche. PubMed fornisce inoltre collegamenti diretti a altri siti e risorse rilevanti.

Il sito dell'NCBI (Figura 3.1) fornisce inoltre accesso diretto alla risorsa BLAST. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) è un software che ricerca regioni di similarità locale fra sequenze. Il programma mette a confronto sequenze nucleotidiche o amminoacidiche fra loro o rispetto a un database e calcola la significatività statistica delle corrispondenze. In questa tesi l'uso di BLAST nella versione BLASTn (per sequenze nucleotidiche) è stato impiegato principalmente nell'analisi di corrispondenza fra sequenze plasmidiche teoriche (derivate da banca dati) e reali (ottenute tramite sequenziamento). Blastp (per sequenze amminoacidiche) è stato invece impiegato nell'analisi della struttura primaria del minibody.

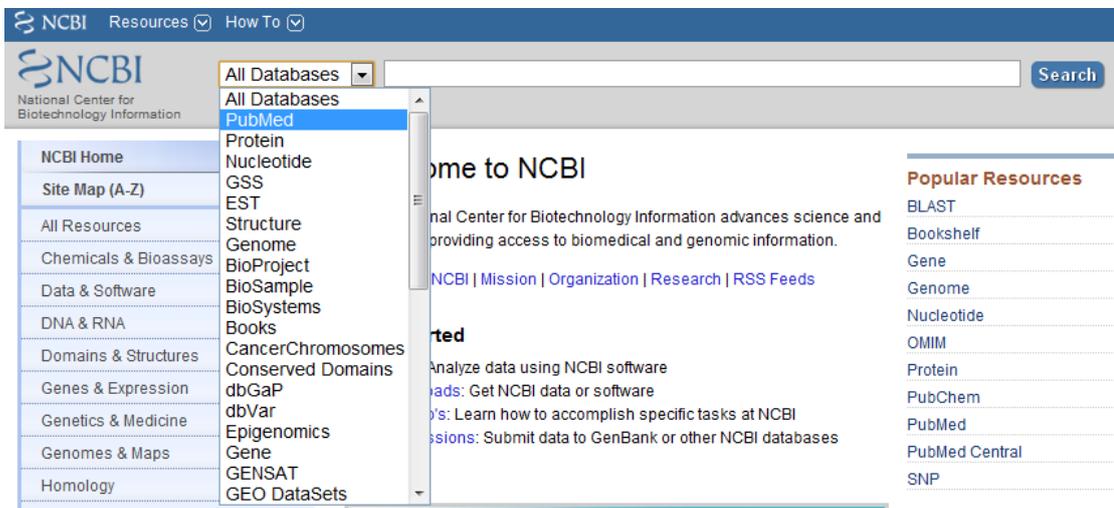


Figura 3.1 NCBI website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

3.1.2 THE SEQUENCE MANIPULATION SUITE 2 (SMS2)

Sequence Manipulation Suite è una raccolta di programmi JavaScript per la generazione, formattazione e analisi di brevi sequenze nucleotidiche e proteiche (Stothard, 2000). In questo lavoro è stata utilizzata principalmente per la previsione di frammenti nucleotidici derivati da digestione enzimatica (cfr. § 3.2.3), analisi di primer e previsione di amplificati da PCR (cfr. § 3.2.6), traduzione di sequenze nucleotidiche in peptidiche, manipolazione di sequenze da un formato standard a un altro più conveniente.

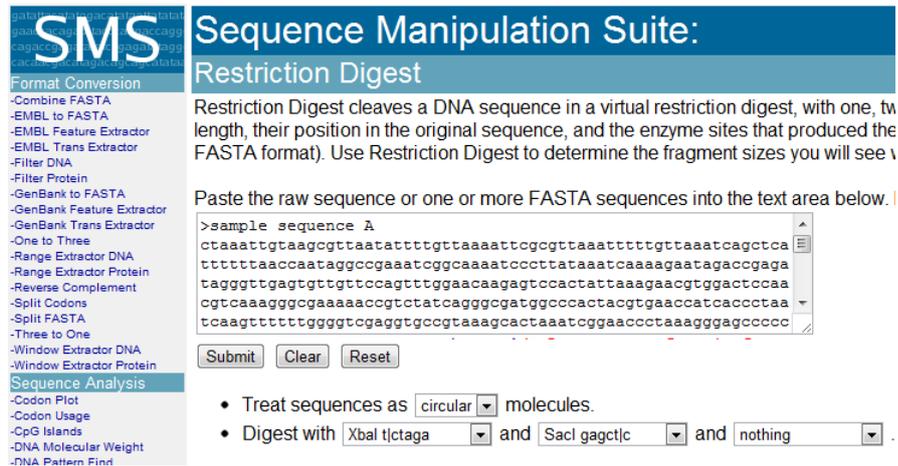


Figura 3.2 The Sequence Manipulation Suite website <http://www.bioinformatics.org/sms2/>

3.1.3 EXPASY

ExpASY (Expert Protein Analysis System) è un portale di risorse bioinformatiche del SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) che permette accesso a specifici database scientifici e software utili in diversi campi delle scienze della vita, inclusi proteomica, genomica, trascrittomica, biologia dei sistemi e genetica di popolazione. Molto utile per studi preliminari di sequenze proteiche, è stata utilizzata per la predizione delle caratteristiche e del comportamento delle proteine qui studiate (Gasteiger et al., 2005).

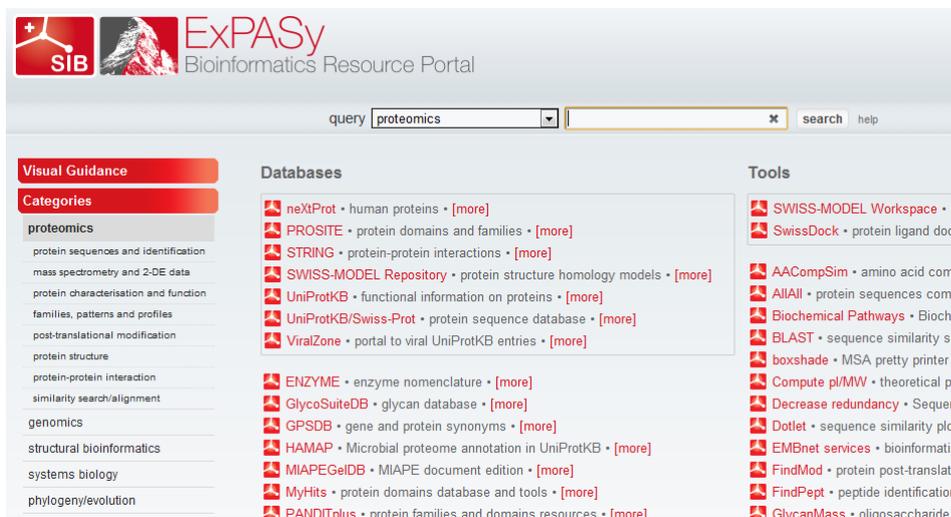


Figura 3.3 ExpASY website <http://www.expasy.org/>

3.1.4 CBS PREDICTION SERVERS

Il sito del CBS (Center for Biological Sequence Analysis, Department of Systems Biology, Technical University of Denmark) mette a disposizione diversi strumenti di analisi per sequenze nucleotidiche e peptidiche. In questo lavoro sono stati utilizzati in particolare i software per la previsione dell'indirizzamento subcellulare di polipeptidi: TargetP e SignalP (Nielsen et al., 1997; Emanuelsson et al., 2007).

SignalP prevede la presenza e localizzazione dei siti di taglio di peptidi segnale in sequenze amminoacidiche provenienti da diversi organismi: procarioti Gram-positivi, procarioti Gram-negativi o eucarioti. Il software incorpora una previsione dei siti di taglio e degli eventuali peptidi segnale basandosi sulla combinazione di diverse reti neurali artificiali. Il modello utilizzato sfrutta due algoritmi statistici, uno basato su reti neurali (NN, Neural Networks) e l'altro su Hidden Markov Models (HMM).

TargetP prevede la localizzazione subcellulare di proteine eucariotiche. L'assegnazione di localizzazione è basata sulla presenza di particolari peptidi segnale all'N-terminale della sequenza, come peptidi di transito al cloroplasto (cTP), peptidi di indirizzamento al mitocondrio (mTP) o peptidi di indirizzamento alla via secretoria (SP).

Di seguito è illustrata l'interfaccia grafica dei due software e un risultato esemplificativo con relativa spiegazione didascalica.

SignalP 4.0 Server
SUBMISSION

Paste a single amino acid sequence or several sequences in **FASTA** format into the field below:

Submit a file in **FASTA** format directly from your local disk:
 Nessun file selezionato

Organism group

- Eukaryotes
- Gram-negative bacteria
- Gram-positive bacteria

Method

- Input sequences may include TM regions
- Input sequences do not include TM regions

Graphics

- No graphics
- PNG (inline)
- PNG (inline) and EPS (as links)

Output format

- Standard
- Short (no graphics)
- Long
- All - SignalP-noTM and SignalP-TM output (no graphics)

Optional - User defined D-cutoff values (default *scores*)

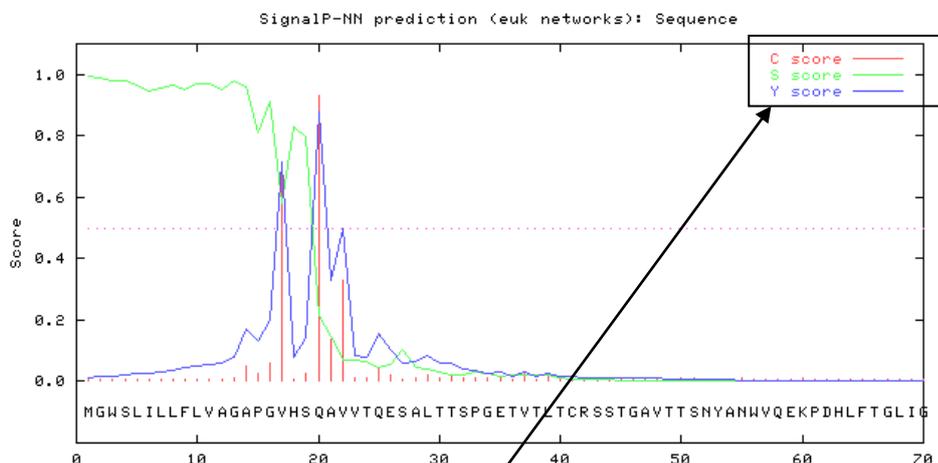
D-cutoff for SignalP-noTM networks

D-cutoff for SignalP-TM networks

Truncate sequence

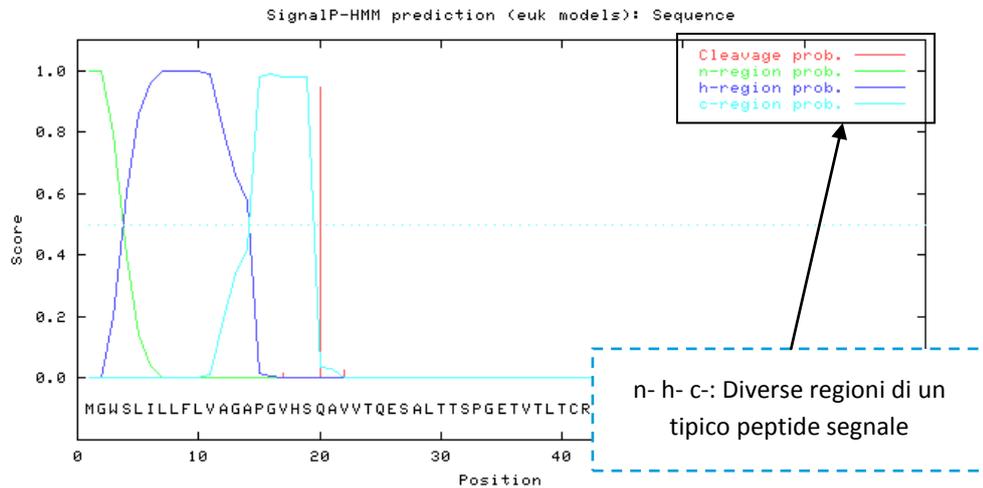
Default: Truncate sequence to a length of 70 aa
 - 0 means no truncation

SignalP:



C: esprime la probabilità che l'a.a. sia il primo della proteina matura
 S: esprime la probabilità che l'a.a. sia parte del peptide segnale
 Y: la migliore stima del sito di taglio del peptide segnale

```
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 20 0.933 0.32 YES
max. Y 20 0.880 0.33 YES
max. S 1 0.992 0.87 YES
mean S 1-19 0.920 0.48 YES
D 1-19 0.900 0.43 YES
# Most likely cleavage site between pos. 19 and 20: VHS-QA
```



```
>Sequence
Prediction: Signal peptide
Signal peptide probability: 1.000
Signal anchor probability: 0.000
Max cleavage site probability: 0.946 between pos. 19 and 20
```

ProP (compreso in SignalP)

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 19 and 20: VHS-QA

TargetP 1.1 Server

TargetP uses [ChloroP](#) and [SignalP](#) to predict cleavage sites for cTP and SP, respectively.

SUBMISSION

Paste a single sequence or several sequences in [FASTA](#) format into the field below:

Submit a file in [FASTA](#) format directly from your local disk:

Nessun file selezionato

Organism group

Non-plant

Plant

Prediction scope

Perform cleavage site predictions

Cutoffs

no cutoffs; winner-takes-all (default)

specificity >0.95 (predefined set of cutoffs that yielded this specificity on the TargetP test sets)

specificity >0.90 (predefined set of cutoffs that yielded this specificity on the TargetP test sets)

define your own cutoffs (0.00 - 1.00): cTP: mTP: SP: other:

TargetP 1.1 server:

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	387	0.151	0.062	0.586	0.047	S	3	19
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			

Lunghezza della sequenza immessa
 Punteggi di predizione (non esattamente probabilità) per sequenze di targeting per cloroplasti (cTP), mitocondri (mTP) o peptide segnale (SP)
 Predizione di Localizzazione (S: secreted)
 RC: Reliability Class - Punteggio di affidabilità del risultato; si basa sulla distanza del punteggio della predizione "vincente" rispetto alla seconda in classifica. Da 1 (miglior predizione) a 5 (peggiore predizione)
 Lunghezza predetta della sequenza segnale

Questa analisi esemplificativa condotta in concerto con entrambi i software è stata effettuata selezionando i parametri più vicini all'organismo di destinazione, ovvero *N. tabacum* (eucariota – pianta), e mostra come risultato la presenza di una sequenza SP, peptide segnale che indirizza la proteina alla via secretoria, con una lunghezza di 19 amminoacidi.

<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

3.1.5 SIG-PRED

Sig-Pred è un software sviluppato e messo a disposizione dalla Leeds Bioinformatics Research. Similmente agli strumenti precedenti, prevede il sito di taglio più probabile per un eventuale peptide segnale. Di seguito sono riportate l'interfaccia grafica del programma e un risultato esemplificativo.

SIG-Pred: Signal Peptide Prediction

Weight matrix choice

- Eukaryote
- Gram-negative bacteria
- Gram-positive bacteria
- SPECIAL CASE: *Escherichia coli*

Name of sequence
(One word, no spaces)

Sequenza_Esempio

Input sequence file...

Scegli file Nessun file selezionato

...or paste sequence here

```

ATGGGTTGGTCCCTGATTCTGCTGTTCCCTTGTGCTGGCGCGCCCTGGTGTACATTCCCAA
GCTGTTGTGACTCAAGAATCAGCTCTGACCACTTCTCCTGGTGAGACTGTGACTCTGACT
TGCAGGTCCTCCACTGGTGTGCTGACCACTTCCAACTATGCTAACTGGGTTCAAGAGAAG
CCTGATCACCTGTTACAGGCCTGATTGGTGGAAACCAACAACAGAGCACCTGGTGTTCCT
GCTAGGTTCTCAGGTTCCCTGATTGGTGACAAGGCTGCTCTGACCATCACTGGTGTCTCAG
CCTGGTGTTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGGTTTCAGGTTACACTTTCAGTATTATGCT
ATGCATTGGGTGAAGCAGTCCCATGCTAAGTCCCTTGAATGGATTGGTGTGATTCCACT
    
```

Start Clear

SIG-PRED:

Sequence origin

Eukaryote

Possible cleavage positions

Position	Site	Score
13 14	MGWSLILLFLVAG AP	7.2
16 17	SLILLFLVAGAPG VH	10.4
19 20	LLFLVAGAPGVHS QA	12.3

Punteggi di predizione (non esattamente probabilità) per il sito di taglio

Most likely signal peptide and its passenger peptide

```

1  MGWSLILLFLV 11  AGAPGVHSQLA 21  VVTQESALTT 31  SPGETVTLTC 41  RSSTGAVTTS 51  NYANWVQEKP
61  DHLFTGLIGG 71  TNNRAPGVPA 81  RFGSLIGDK 91  AALTITGAQT 101  EDEAIYFCAL 111  WYSNHFIFGS
121  GTKVTVLGGS 131  TSGSGKPGSG 141  EGSTKGEVQL 151  QQSGPEVVRP 161  GSVKISCKG 171  SGYTFDYAM
181  HWVKQSHAKS 191  LEWIGVISTY 201  NGNTNYNQKF 211  KGKATMTVDK 221  SSSTAYMELA 231  RLTSSEDAIY
241  YCARYYGNFY 251  DYWGQGTTLT 261  VSSGGSGGRP 271  KAPQVYTIPP 281  PKEQMAKDKV 291  SLTCMITDFF
301  PEDITVEWQW 311  NGQPAENYKN 321  TQPIMDTDGS 331  YFVYSKLVNQ 341  KSNWEAGNTF 351  TCSVLHEGLH
361  NHHTEKSLSH 371  SPGKGGSVQG 381  EESNDK
    
```

http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html

3.1.6 PRIMER3 PLUS

Per disegnare i primer migliori (cfr. § 3.2.6) per le operazioni di biologia molecolare eseguite in questa tesi è stato utilizzato il software Primer3 plus, disponibile sul Wageningen Bioinformatics Webportal. Questo software ottimizza la scelta dei primer utilizzando algoritmi diversi a seconda dello scopo del loro utilizzo (clonazione, sequenziamento, rivelazione di mutazioni, ecc.) (Untergasser et al., 2007).

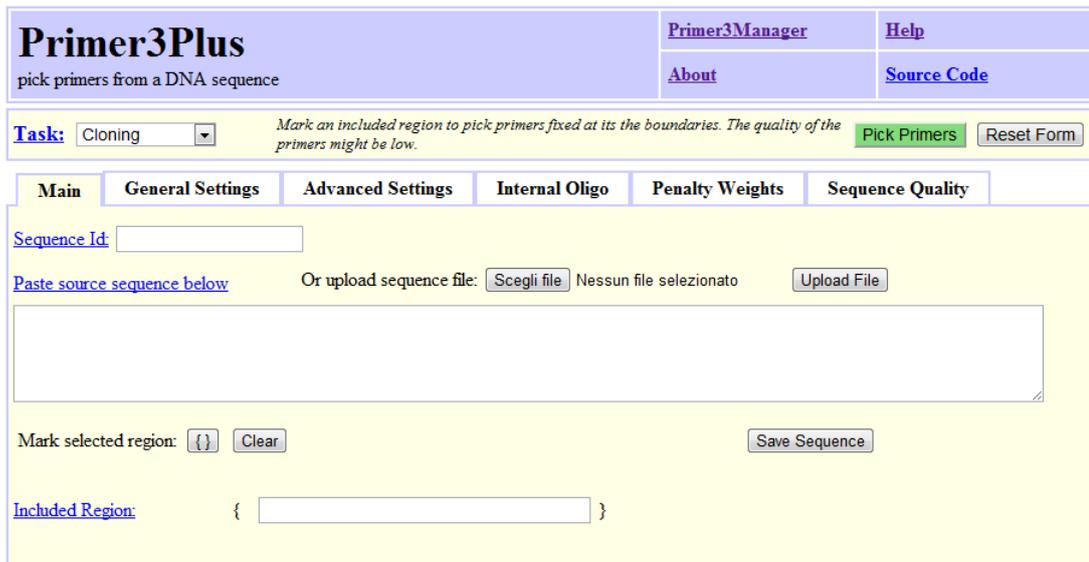


Figura 3.4 Interfaccia grafica di Primer3Plus

<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

3.2 METODOLOGIE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

3.2.1 MINIPREP PER L'ESTRAZIONE DI DNA PLASMIDICO

Per la purificazione in piccola scala di DNA plasmidico (miniprep), sono stati utilizzati il protocollo e i reagenti previsti per il kit commerciale QIAprep® spin miniprep Kit (Qiagen) oppure il kit commerciale Wizard® SV gel and PCR clean-up system (Promega). Entrambi i kit si basano sul legame di DNA a resine in ambiente idrofobico ed eluizione della molecola con una soluzione acquosa tramite centrifugazioni successive.

Per ottenere le miniprep sono stati utilizzati da 2 a 6 mL di sospensione batterica ottenuta dalla crescita over/night (O/N) di un inoculo della colonia batterica desiderata in 6-7 mL di substrato liquido (LB-broth) addizionato dell'antibiotico opportuno (kanamicina: 50 µg/mL, ampicillina: 100 µg/mL).

Ogni miniprep è stata purificata da eventuali tracce di etanolo residuo (presente nelle soluzioni dei kit) e concentrata con trattamento in stufa a 60°C per 15'.

3.2.2 QUANTIFICAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE E DEL GRADO DI PUREZZA DEL DNA

La concentrazione e la purezza del DNA estratto tramite miniprep sono state stimate mediante determinazione dell'assorbanza a 260, 280 e 320 nm utilizzando lo spettrofotometro da banco Nanodrop® (Thermo Scientific). La purezza del DNA è stata calcolata automaticamente dal software in dotazione al dispositivo, secondo la seguente formula standard:

$$[\text{Purezza}] = (\text{Abs}260 - \text{Abs}320) / (\text{Abs}280 - \text{Abs}320)$$

Il grado di purezza ottenuto è stato valutato come accettabile se compreso fra 1.8 e 2.0.

3.2.3 DIGESTIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI CON ENZIMI DI RESTRIZIONE

Per il taglio in siti specifici del DNA di interesse si è fatto uso di endonucleasi specifiche (enzimi di restrizione) e di tamponi di reazione (buffer) adeguati.

Le componenti utilizzate sono state le seguenti:

Buffer opportuno	1.0 µL
Enzimi di restrizione (uno o più)	0.3 µL ciascuno
DNA da digerire	secondo necessità (da 100 a 500 ng)
BSA	1.0 µL da stock 1 µg/µL
H ₂ O	a volume
Volume finale	10.0 µL

Le reazioni sono state lasciate in incubazione a 37°C per tempi variabili, da 2 a 14 ore (O/N) a seconda della quantità di DNA da digerire, dell'efficienza dell'enzima e del rischio di star activity. Per digestioni prolungate e in presenza di enzimi che presentano star activity (come *EcoRI*), alla reazione è stata aggiunta albumina di siero bovino (BSA, bovin serum albumin) (NEB). Gli enzimi di restrizione e i tamponi di reazione utilizzati sono stati forniti da New England Biolabs (NEB).

3.2.4 TRATTAMENTO CON FOSFATASI ALCALINA DEI VETTORI DIGESTI

Quando opportuno i vettori digesti sono stati trattati con fosfatasi alcalina per evitare una richiusura degli stessi in fase di saldatura. Il risultato della precipitazione è stato addizionato a fosfatasi alcalina CIP (calf intestinal phosphatase) 10000 U/mL (NEB) e incubato per 1h a 37°C.

DNA digerito	10.0 µL
NEBuffer 3	5.0 µL
CIP (diluizione 100 U/mL)	2.0 µL
H ₂ O mQ	33.0 µL
Volume finale	50.0 µL

3.2.5 SALDATURA DI FRAMMENTI DI DNA

Per unire frammenti di DNA precedentemente digeriti sono state allestite reazioni di saldatura (ligation). Le reazioni di ligation sono state effettuate mediante l'enzima T4 ligasi (Promega). I quantitativi di inserto e vettore necessari per ciascuna reazione sono stati calcolati secondo la seguente formula:

considerando per ogni reazione una quantità di 25 ng di vettore, e un rapporto inserto/vettore di 3/1. A seconda delle esigenze sono state allestite reazioni di ligation rapida o lenta.

Ligation "rapida":

Vettore	~25.0 ng
Inserto	ng calcolati
Ligasi buffer 2x (Promega)	5.0 µL
T4 ligasi	1.0 µL
Volume finale	10.0 µL

Incubazione a RT, minimo 1h

Ligation "lenta":

Vettore	~25.0 ng
Inserto	ng calcolati
Ligasi buffer 10x (Promega)	1.0 µL
T4 ligasi	1.0 µL
Volume finale	10.0 µL

Incubazione a 4°C O/N

3.2.6 PCR, REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI

La reazione a catena mediata dalla DNA polimerasi (PCR, polymerase chain reaction) consente l'amplificazione selettiva di una regione di DNA delimitata da due sequenze specifiche, chiamate oligonucleotidi d'innescio (primer). Le PCR sono state realizzate con il termociclatore MyCycler™

Thermal cycler (Bio-Rad) o con il termociclatore PCR Sprint® (Hybrid). Di seguito sono descritti i componenti della miscela di reazione.

DNA POLIMERASI

Per la maggioranza delle reazioni è stato utilizzato l'enzima AmpliTaq Gold® with Gene Amp (Applied Biosystems), qui più semplicemente chiamata Taq Gold. Si tratta di una DNA polimerasi di *Thermus aquaticus* prodotta per via ricombinante in *E. coli*, che presenta attività adenosil-transferasica: aggiunge infatti un singolo residuo di adenosina sporgente al terminale 3'-OH di ciascun filamento di DNA amplificato. In reazioni dove era richiesta un'alta qualità del DNA amplificato, è stato utilizzato l'enzima AccuTaq (Sigma-Aldrich), una polimerasi ad alta fedeltà, con attività di proofreading ma senza attività adenosil-transferasica. Per reazioni di screening, dove non era richiesta un'alta qualità dell'amplificato, sono state usate Taq altamente processive ma di fedeltà minore, come la EUROTaq (Euroclone) per DNA batterico o la GOTaq (Promega) per DNA genomico vegetale.

DNTP MIX

E' stata preparata una soluzione stock aggiungendo a 360 µL di acqua Milli-Q (Millipore) 10 µL dATP, dTTP, dGTP, dCTP 100 mM (Promega), in modo da ottenere una concentrazione di 2.5 mM per ciascun nucleotide. Il dNTP mix è stato aggiunto alla miscela di reazione in modo da avere una concentrazione finale di 200 µM per ciascun nucleotide.

PRIMER

Gli oligonucleotidi sintetici utilizzati, di lunghezza variabile dalle 15 alle 30 basi, sono stati disegnati in modo da delimitare la sequenza di DNA da amplificare. Sono stati distinti in primer forward (FOR, che riproduce la sequenza iniziale in posizione 5' del DNA stampo) e primer reverse (REV, complementare alla sequenza in 3'). I primer utilizzati sono stati sintetizzati dalla ditta SIGMA-Aldrich. I primer creati in questa tesi hanno una temperatura di melting fra i 55 e i 62°C; primer disegnati per essere utilizzati in coppia hanno una variazione di Tm l'uno rispetto l'altro di non più di 2.5°C.

TAMPONE DI REAZIONE

È stato utilizzato il tampone specifico per la DNA polimerasi utilizzata, fornito con la polimerasi stessa.

DNA STAMPO

In questo lavoro, la molecola contenente il tratto di interesse da amplificare è risultata essere per lo più DNA plasmidico. Nel caso di DNA plasmidico (miniprep) o genomico, è stato utilizzato 1 µL di soluzione contenente al massimo 50 ng di DNA; quando è stata invece utilizzata una sospensione acquosa di cellule batteriche ottenuta dalla crescita di una colonia contenente il DNA plasmidico di interesse (PCR su colonia), sono stati addizionati alla reazione 2 µL di sospensione batterica. Per ottenere la sospensione batterica è stato creato un inoculo della colonia scelta in 100 µL di substrato LB-broth in presenza dell'antibiotico opportuno (kanamicina: 50 µg/mL, ampicillina: 100 µg/mL). Dopo un'incubazione per 2h a 37°C, la sospensione batterica è stata centrifugata a 8000 g per 4 min, e il pellet risospeso in 10 µL di H₂O sterile.

Buffer opportuno	1.0 μ L (10x) o 2.0 μ L (5x)
dNTP mix	0.8 μ L
Primer for	0.2 μ L
Primer rev	0.2 μ L
Taq	0.08 μ L
DNA stampo	variabile, massimo 50 ng
H ₂ O (sterile)	a volume
Volume finale	10.0 μ L

Le temperature e i tempi delle tre fasi di un tipico ciclo di amplificazione (denaturazione, appaiamento ed estensione) sono stati scelti di volta in volta in base alla temperatura di fusione (T_m) dei primer utilizzati e alla lunghezza del tratto da amplificare. Tipicamente è stato scelto un tempo di estensione pari a 1 minuto per chilobase di amplificato atteso, da un minimo di 30 secondi a un massimo di 2 minuti.

Denaturazione iniziale	95° per 5'
Cicli di amplificazione (30-45)	Denaturazione 95° per 30-45"
	Appaiamento T_m del primer più instabile meno 1°C (55-60°)
	Estensione 72° per 30"-2'
Estensione finale	72°C per 7'
Holding	4° ∞

3.2.7 ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI IN GEL DI AGAROSIO E LORO VISUALIZZAZIONE

Per la preparazione dei gel di agarosio è stato impiegato agarose D-1 low EEO (Pronadisa, lab. Conda).

La percentuale di agarosio utilizzata nei vari gel è stata pari a:

- 2% per risolvere frammenti di DNA inferiori a 100 bp;
- 1% per risolvere frammenti di DNA compresi fra 100 e 5000 bp;
- 0.7% per risolvere frammenti di DNA superiori a 5000 bp.

Sia per formare il gel che per effettuare la corsa elettroforetica in immersione è stato utilizzato il tampone TBE (Tris-borato-EDTA).

TBE buffer (stock 10x)

Trizma	108 g
Acido Borico	55 g
EDTA	40 mL da stock 0.5 M
H ₂ O mQ	a volume
Volume finale	1 L

Per la visualizzazione degli acidi nucleici, al gel è stato addizionato l'agente intercalante GelRED® (Biotium) in proporzione 1:20.000 (solitamente, 4 µL di GelRED® per 80 mL di gel). GelRED® presenta una minor tossicità rispetto ad altri intercalanti come l'etidio bromuro. Tuttavia l'utilizzo di GelRED® porta spesso alla formazione di artefatti in fase di corsa elettroforetica: la problematica più comune riscontrata è la deformazione delle bande derivate da amplificati PCR, con un abbassamento del peso molecolare apparente nella parte centrale della banda e la creazione di un tipico profilo a bande curve ("smile"). Questo problema è generalmente dovuto all'eccessiva quantità di DNA presente nel gel, ed è più frequente nella visualizzazione delle reazioni di PCR e di DNA plasmidico derivato da *A. tumefaciens* (di qualità generalmente inferiore rispetto a quello estratto da *E. coli*). Una soluzione applicabile è la diminuzione delle quantità di DNA visualizzate; tuttavia le esigenze di manipolazione di frammenti di DNA non permettono sempre di lavorare in condizioni ottimali per la loro visualizzazione.

Come riferimento per i pesi molecolari apparenti dei frammenti visualizzati, sono stati utilizzati i marcatori di peso molecolare 1kb e 100bp (Figura 3.5) (NEB, New England Biolabs).

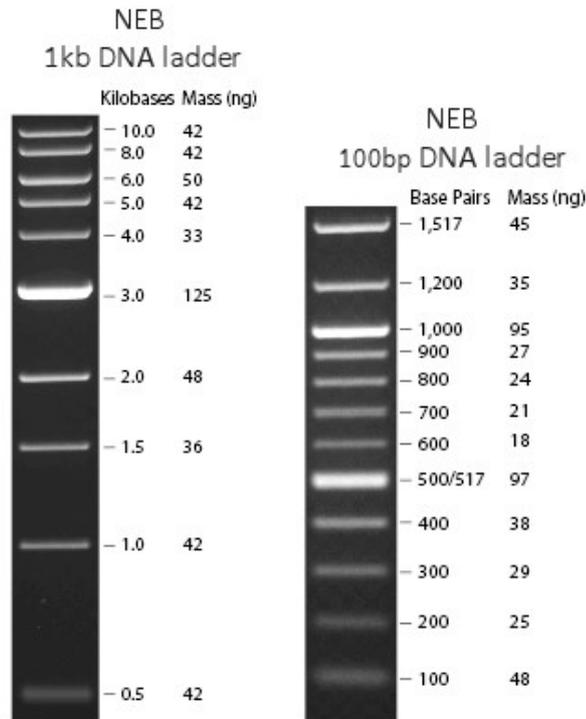


Figura 3.5 Marcatori di peso molecolare (NEB) utilizzati

Dopo la corsa elettroforetica, i gel sono stati visualizzati al transilluminatore Spectroline (TVR-312).

3.2.8 ELABORAZIONE DI IMMAGINI DA GEL DI AGAROSIO

Le immagini dei frammenti di DNA visualizzati in gel tramite intercalante GelRED® sono state acquisite mediante fotocamera Nikon. È stata necessaria una successiva elaborazione al computer mediante comuni programmi di grafica al fine di rendere più visibili e facilmente gestibili le immagini. I marcatori di peso molecolare sono stati sostituiti da barre indicanti i rispettivi frammenti, sono stati mantenuti i pesi molecolari significativi per ciascuna immagine.

La Figura 3.6 mostra i semplici passaggi che hanno portato alle immagini dei gel di agarosio come riprodotte in questa tesi.

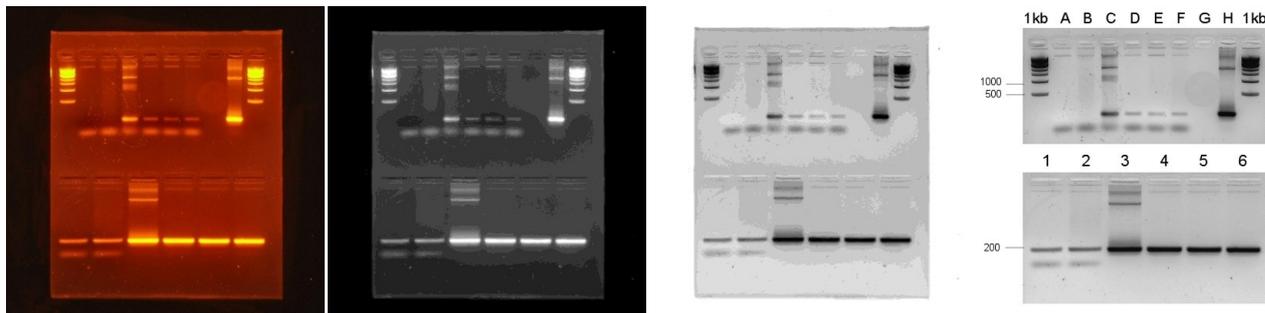


Figura 3.6 Elaborazione delle immagini acquisite dei gel di agarosio; da sinistra a destra: immagine tal quale, in scala di grigi, immagine negativa, elaborazione finale

3.2.9 RECUPERO DI FRAMMENTI DI DNA DA GEL

Il recupero da gel di amplificati PCR e frammenti digesti è stato realizzato mediante il kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega).

Il sistema è finalizzato all'estrazione e alla purificazione di frammenti di DNA lunghi da 100 bp a 10-15 Kb, separati in gel di agarosio. Il kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System si basa sulla capacità del DNA di fissarsi su una resina silicea in presenza di sali. Il prodotto finale è una soluzione di DNA in H₂O sterile.

3.2.10 REAZIONE DI A-TAILING

Per garantire la presenza di un singolo residuo di deossi-adenosina (A) al terminale 3'-OH di ogni filamento di DNA, sono state allestite reazioni di A-tailing ("aggiungere una coda di A"). Questa operazione è stata effettuata sui frammenti di DNA recuperati da gel che dovevano essere successivamente impiegati come inserti per la clonazione in vettori T, ovvero plasmidi linearizzati portanti singoli residui di timidina (T) sporgenti a ciascun terminale 3'-OH.

Le reazioni di A-tailing sono state così allestite:

DNA (recupero da gel)	7.0 µL	
dATP 100mM	1.0 µL	
Buffer Gold 10x	1.0 µL	
Taq Gold	1.0 µL	
Volume finale	10.0 µL	Incubazione a 72°C per 30 min

3.2.11 ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO DA TESSUTO FOGLIARE

Per l'estrazione di DNA genomico da tessuto fogliare derivato da piante putativamente trasformate è stato utilizzato lo strumento automatizzato Maxwell® 16 con relativo kit commerciale per l'estrazione di DNA (Promega), che garantisce un'alta resa e un'elevata qualità del DNA purificato.

3.2.12 PREPARAZIONE DI CELLULE COMPETENTI DI *E. COLI* JM101

Per introdurre DNA esogeno in cellule batteriche è necessario rendere le loro pareti permeabili alle macromolecole. Tale procedura è stata eseguita secondo il protocollo di Sambrook e coll. (1989) che prevede il trattamento con CaCl₂ delle cellule di *E. coli*. La procedura viene effettuata in condizioni di sterilità.

LB-broth (1L)

Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	a volume
Portare il pH a 7.0, autoclavare.	

CaCl₂ 1 M (100 mL)

CaCl ₂	14.702 g
H ₂ O	a volume
Sterilizzare per filtrazione.	

E. coli K12 JM101 (qui chiamato semplicemente JM101) è un ceppo non patogenico, end A⁺, caratterizzato da un'ottima velocità di crescita su substrato LB.

Si è partiti da una pre-coltura di JM101, inoculando una colonia del batterio in 5 mL di LB-broth e mantenendo in agitazione a 37°C O/N. 500 µL della precoltura sono stati poi trasferiti in 50 mL di LB, e mantenuti in agitazione vigorosa a 37°C fino al raggiungimento di una densità ottica a 600 nm (O.D.₆₀₀) compreso tra 0.2 e 0.3. Il controllo della densità ottica è stato effettuato tramite misurazioni allo spettrofotometro di 1 mL di coltura batterica, utilizzando come riferimento 1 mL di substrato LB-broth. La coltura batterica è stata trasferita in tubi da 50 mL (25 mL ciascuno) sterili e freddi. Dopo aver lasciato raffreddare la coltura in ghiaccio per 10 min, si è proceduto centrifugando le cellule a 8000 g per 10 min a 6°C; il surnatante è stato eliminato e il pellet risospeso in 5 mL di CaCl₂ 0.1M sterile e freddo, lasciando quindi il tutto in ghiaccio per 15 min. Le cellule sono state nuovamente centrifugate a 8000 g per 10 min a 6°C, il surnatante nuovamente eliminato e il pellet risospeso in 1 mL di CaCl₂ 0.1M sterile e freddo. Le cellule così preparate sono state conservate in ghiaccio a +4°C. Le cellule sono state solitamente utilizzate per la trasformazione dopo un minimo di 2h dal trattamento con CaCl₂ e fino a un massimo di 48h dopo.

3.2.13 TRASFORMAZIONE DI CELLULE COMPETENTI DI *E. COLI* JM101

Dopo aver reso competenti le cellule di *E. coli* JM101, si è proceduto alla loro trasformazione, cioè all'introduzione di DNA esogeno nella cellula batterica. La procedura è stata effettuata in condizioni di sterilità.

■ Adsorbimento del DNA sulla superficie cellulare. In tubi da 1.5 mL sono stati trasferiti 200 µL di sospensione di cellule competenti, quindi sono stati addizionati 10 µL di sospensione plasmidica

3.2.14 PREPARAZIONE DI CELLULE COMPETENTI DI *A. TUMEFACIENS*

Dalla coltura su substrato solido di una colonia di *A. tumefaciens* ceppo EHA105 è stato effettuato un inoculo in 200 mL di LB-broth, quindi lasciato in agitazione forte a 28°C fino al raggiungimento della densità ottica O.D. 0.5, controllata tramite misurazioni allo spettrofotometro. 30 mL di coltura sono stati quindi trasferiti in tubi da 50 mL freddi e sterili, ed il tutto è stato incubato in ghiaccio per alcuni minuti. Quindi i tubi sono stati centrifugati a 3000 g per 10 min a 4°C, il surnatante eliminato e il pellet risospeso in 10 mL di glicerolo 10% sterile e freddo. Quindi il volume è stato portato a 30 mL con glicerolo 10%. Questo step è stato ripetuto per altre due volte (centrifugazione – eliminazione del surnatante – risospensione del pellet); infine il pellet derivante dalla terza centrifugazione è stato risospeso in 200 µL di sorbitolo 1M sterile.

Le cellule sono state utilizzate subito per l'elettroporazione oppure conservate a -80°C.

3.2.15 TRASFORMAZIONE DI CELLULE COMPETENTI DI *A. TUMEFACIENS*

La trasformazione di cellule competenti di agrobatterio è stata effettuata mediante elettroporazione.

30 µL di cellule competenti di agrobatterio sono stati addizionati a 2 µL di una diluizione 1:1000 della miniprep opportuna. Per tutte le trasformazioni è stato utilizzato l'elettroporatore Micro Pulser™ (Bio-Rad). Il risultato dell'elettroporazione è stato piastrato su LB-agar contenente rifampicina (cui *Agrobacterium* è naturalmente resistente) e l'antibiotico opportuno (in genere Kanamicina). La crescita delle colonie è avvenuta in 36 h in incubazione a 28-30°C.

3.2.16 GLYCEROL STOCK DELLE COLONIE DI INTERESSE

Per conservare nel tempo le colonie batteriche di interesse, sono stati eseguiti stock con glicerolo (glycerol stock).

La procedura è stata effettuata in condizioni di sterilità; 850 µL di coltura batterica derivati dalla crescita O/N di un inoculo in LB-broth (in presenza di una adeguata concentrazione dell'antibiotico opportuno) sono stati addizionati a 200 µL di glicerolo 100%. Il tutto è stato mescolato mediante vortex e conservato a -80°C.

3.2.17 VETTORI PLASMIDICI UTILIZZATI

In questa tesi sono state utilizzate diverse tipologie di vettori per soddisfare le varie esigenze di manipolazione delle cassette di espressione e di trasformazione dei tessuti vegetali.

pGA

Per pGA si intende la famiglia di vettori plasmidici utilizzati come plasmidi di clonazione per sequenze la cui sintesi è stata eseguita dalla ditta GeneArt (da dicembre 2010, GeneArt è stata acquisita da Invitrogen). Si tratta di vettori di piccole dimensioni (tra le 2500 e le 4000 bp), high-copy number, adatti alla clonazione in *E. coli* e portanti geni per la selezione batterica che conferiscono resistenza agli antibiotici comunemente utilizzati nelle pratiche di laboratorio (generalmente ampicillina o kanamicina). In questa tesi i plasmidi pGA sono stati utilizzati solamente come vettori delle sequenze ordinate presso GeneArt.

(<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cloning/gene-synthesis.html>)

pGEM®-T

Nel corso di questa tesi per la clonazione dei prodotti di PCR è stato utilizzato il vettore commerciale pGEM®-T (Promega).

Il vettore pGEM®-T è un plasmide high-copy number derivato da pUC18 e viene fornito in forma linearizzata, con un singolo residuo di timidina aggiunto al terminale 3'-OH di ciascun filamento (Figura 3.7). Questi residui aumentano di molto l'efficienza di clonazione prevenendo la ricircularizzazione del vettore e fornendo un aggancio preferenziale di prodotti di PCR ottenuti con polimerasi (fra cui la Taq Gold) che aggiungono un residuo di deossi-adenosina al terminale 3'-OH degli amplificati.

Il vettore pGEM®-T contiene i promotori T7 e SP6 nella regione fiancheggiante il sito di clonazione multiplo (MCS, multiple cloning site), che si trova all'interno della regione codificante per il frammento α dell'enzima β -galattosidasi. L'inattivazione inserzionale permette ai cloni ricombinanti di essere identificati direttamente tramite α -complementazione: grazie alla presenza di un substrato cromogeno per la β -galattosidasi (selezione IPTG – X-Gal), le colonie che non presentano l'inserito appariranno blu, mentre quelle correttamente trasformate non saranno colorate.

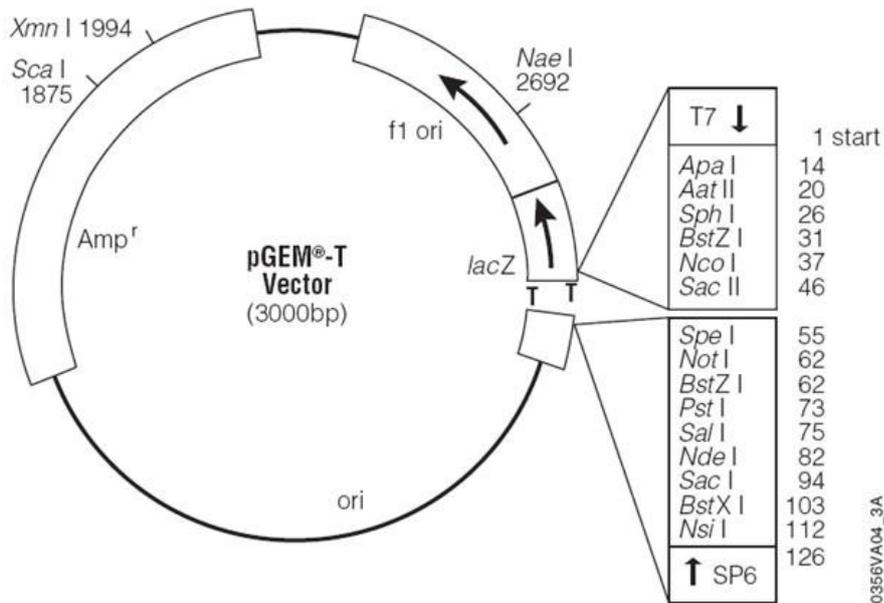


Figura 3.7 Struttura del vettore pGEM®-T

Il vettore pGEM®-T presenta ai lati del MCS i siti di legame per diversi primer, fra cui M13 forward e reverse, utilizzabili per l'amplificazione o il sequenziamento di inserti (www.promega.com).

pUC18

In questo lavoro il vettore pUC18 è stato utilizzato nella manipolazione delle cassette di espressione.

pUC18 è un plasmide di *E. coli* ad alto numero di copie. Porta il gene per la resistenza all'ampicilina e come pGEM[®]-T presenta un MCS all'interno della regione codificante per il frammento α della beta-galattosidasi, rendendo possibile lo screening secondo colore delle colonie trasformate (Figura 3.8). Il suo MCS è stato utilizzato nella formazione di molti altri vettori di espressione (fra cui ad esempio pCAMBIA2300 e pCAMBIA2301).

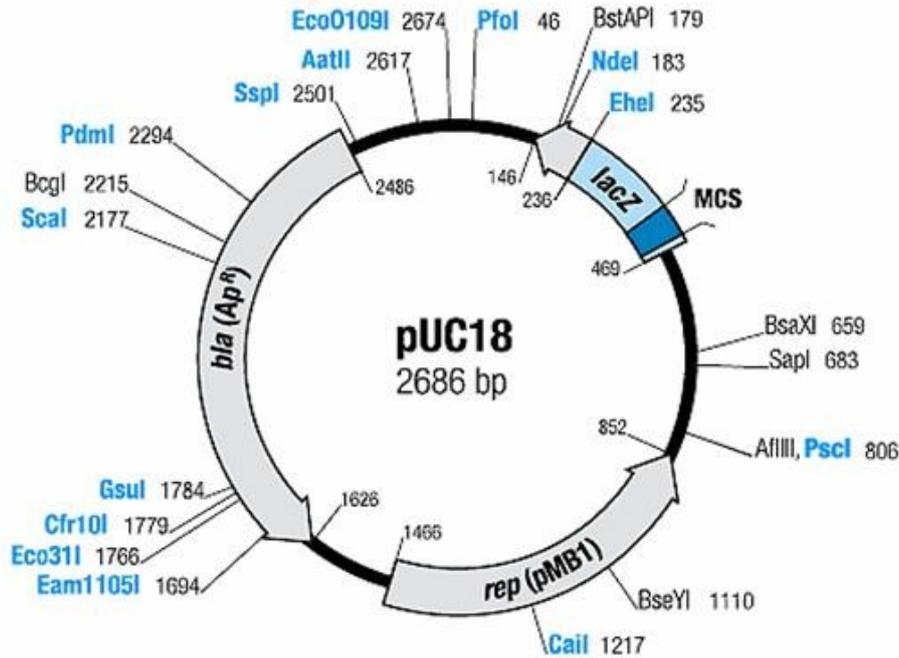


Figura 3.8 Struttura del vettore pUC18 (www.fermentas.com)

pSTART

Come base per i vettori di espressione in tabacco è stato utilizzato un derivato del vettore commerciale pBI121 (Clontech Laboratories, USA), vettore non più disponibile commercialmente ma ancora oggi utilizzato da diversi gruppi di ricerca nella trasformazione di tessuti vegetali (Chen et al., 2003). Il vettore pSTART è stato sviluppato dal gruppo di ricerca presso cui è stata svolta questa tesi (De Amicis et al., 2007). Esso vede la sostituzione della sequenza 5'-UTR o leader del promotore 35S di CaMV, che dirige l'espressione del gene reporter, con una sequenza sintetica denominata leader LLTK. Questa sostituzione permette di aumentare i livelli di espressione diretti dal promotore 35S fino a 12 volte (brevetto WO 2008/080954; titolare: Università degli Studi di Udine).

Il vettore pSTART presenta le caratteristiche del suo progenitore, è quindi un vettore binario poiché porta due cassette di espressione distinte all'interno della regione del T-DNA (delimitata da left- e right border repeats, LBR e RBR): una cassetta codificante un gene marcatore (nptII, neomicina fosfotransferasi II, che conferisce al tessuto vegetale trasformato la resistenza agli antibiotici

amminoglicosidici, come kanamicina, neomicina e G418), e una cassetta codificante un gene di interesse (nel vettore non modificato si tratta del gene reporter per la β -glucuronidasi *gusA*). È un vettore a bassa frequenza di replicazione (low copy number) sia in *E. coli* sia in *A. tumefaciens* (Figura 3.9).

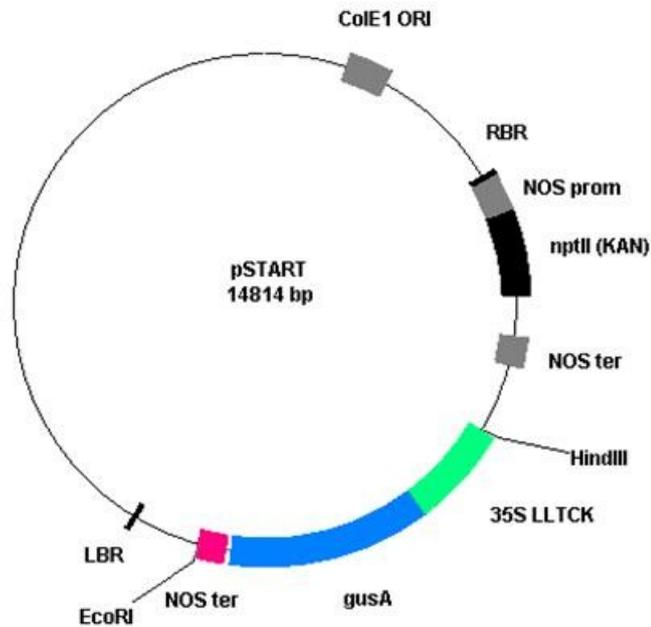


Figura 3.9 Struttura del vettore pSTART

pCAMBIA

Vettori di espressione indicati per la trasformazione di tessuti vegetali, la serie pCAMBIA è stata sviluppata dall'istituto CAMBIA (Camberra) (www.cambia.org). Lo scheletro dei vettori pCAMBIA è derivato dai vettori tipo pPZP (Hajdukiewicz et al., 1994). Questi vettori sono stati costruiti in modo da presentare una serie di caratteristiche che vanno a risolvere i principali problemi presentati dai vettori di vecchia generazione (come il sopra citato pBI121). I pCAMBIA sono high copy number in *E. coli*, il che permette di ottenere rese di estrazione superiori e offre una maggior facilità di manipolazione; portano il replicone di pVS1 che conferisce un'alta stabilità in *Agrobacterium tumefaciens*; presentano una dimensione ridotta, che varia da 7 a 12 kb per ogni diverso plasmide; portano siti di restrizione disegnati ad hoc per modificazioni modulari dei vettori e piccoli ma flessibili poly-linker per rendere più agevoli le operazioni di modificazione del DNA.

In questa tesi sono stati presi in considerazione i vettori pCAMBIA2300 (Figura 3.10) e pCAMBIA2301 (Figura 3.11), che portano il gene per la resistenza alla kanamicina per il batterio e per il tessuto vegetale trasformato. pCAMBIA2301 presenta la cassetta di espressione per un gene reporter di tipo GUS, che manca in pCAMBIA2300.

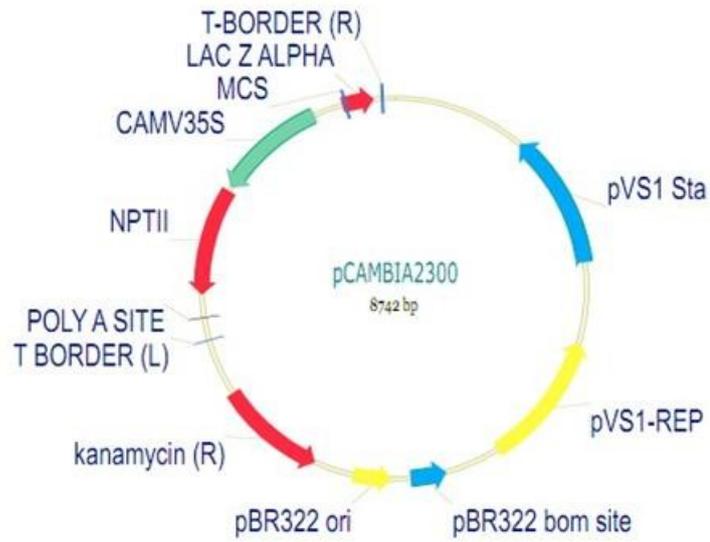


Figura 3.10 Struttura del vettore pCAMBIA2300

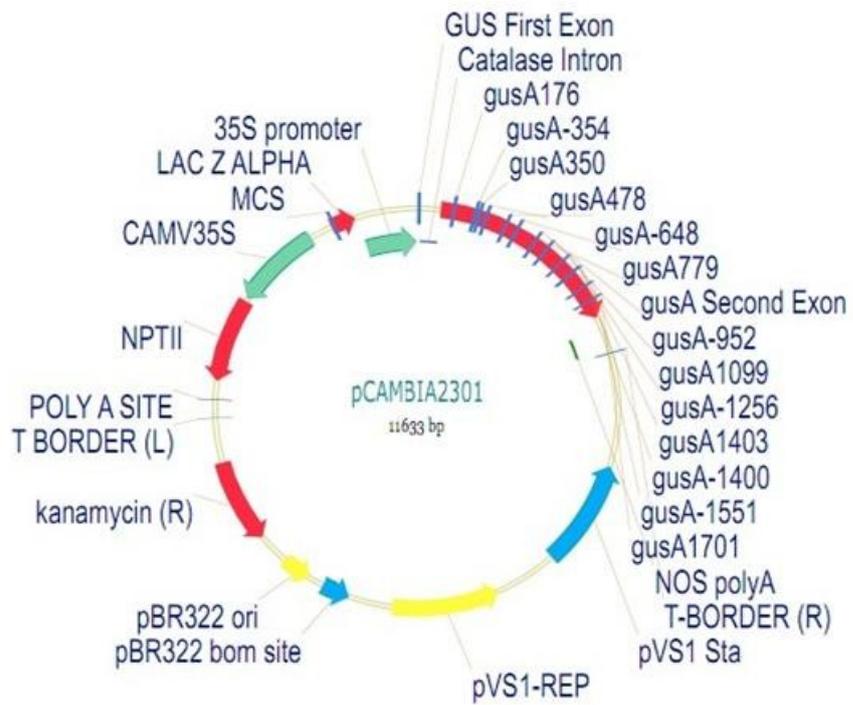


Figura 3.11 Struttura del vettore pCAMBIA2301

3.3 TRASFORMAZIONE E RIGENERAZIONE DI *NICOTIANA TABACUM*

3.3.1 SUBSTRATI

Nella presente tesi, per permettere l'integrazione del transgene nel genoma della pianta è stato utilizzato il protocollo di trasformazione mediata da *A. tumefaciens* di Horsch e coll. (1985). La fase di coltivazione *in vitro* ha richiesto i substrati elencati di seguito.

- Murashige e Skoog medium (1962) (MS10) composto come nella tabella sottostante (Tabella 3.1). Il pH viene regolato a 5.8 tramite l'utilizzo di KOH 1 M. Prima della autoclavazione a 121°C per 20 minuti si aggiungono 8 g/L di Difco Bacto Agar. Dopo aver raffreddato il substrato a 60°C, si aggiungono gli ormoni le cui soluzioni vengono rese sterili tramite ultrafiltrazione (Tabella 3.2).

Componenti	Quantità per litro di soluzione
Soluzione salina di MS10 (Tabella 3.6)	100 mL
Glicina	1 mL
Acido nicotinico	0.5 mL
Piridossina	0.5 mL
Tiamina	10 µL
Inositolo	100 mg
Saccarosio	30 g

Tabella 3.1 Composizione del substrato MS10 per litro di soluzione senza la presenza di ormoni

Componenti	Quantità per litro di soluzione
BAP (Benzilaminopurina)	1 mg
NAA (Acido Naftalenacetico)	100 µL

Tabella 3.2 Ormoni presenti nel substrato MS10

- Substrato MS10 Cefotaxime composto da MS10 completo con aggiunta per ultrafiltrazione dell'antibiotico in tabella sottostante (Tabella 3.3).

Componenti	Quantità per litro di soluzione
Cefotaxime	500 mg disciolti in 4 mL di acqua Milli-Q

Tabella 3.3 Antibiotico presente nella composizione MS10 Cefotaxime

- Substrato MS10 Cefotaxime-Kanamicina composto da MS10 con aggiunta dopo l'autoclavazione degli antibiotici in soluzioni ultrafiltrate (Tabella 3.4).

Componenti	Quantità per litro di soluzione
Cefotaxime	500 mg sciolti in 4 mL di Acqua Milli-Q
Kanamicina (50 µg/mL)	4 mL

Tabella 3.4 Antibiotici presenti nel substrato MS10 Cef-Kana

- Substrato MS0 Cefotaxime-Kanamicina-IBA privo di auxine e citochinine ma dotato di un ormone radicale, IBA (acido indolbutirrico) 2 mL/L prelevati da una soluzione avente concentrazione di 10mg/10mL.
- Substrato MS “mezza forza”, povero di nutrienti per mantenere le piantine *in vitro*. Questo substrato non presenta né ormoni, né antibiotici (Tabella 3.5).

Componenti	Quantità per litro di soluzione
Soluzione salina di MS10	50 mL
Glicina	1 mL
Acido nicotinico	0.5 mL
Piridossina	0.5 mL
Tiamina	10 µL
Inositolo	100 mg
Saccarosio	30 g

Tabella 3.5 Composizione substrato “mezza forza”

Componenti	Quantità per 30 L
MnSO ₄	0.507 g
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.00075 g
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.258 g
CaCl ₂ * H ₂ O	13.20 g
KH ₂ PO ₄	5.1 g
KI	0.0249 g
NH ₄ NO ₃	49.50 g
KNO ₃	57 g
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.0075 g
EDTA + FeNa	1.2 g
H ₃ BO ₃	0.186 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	11.1 g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.00075 g
Acqua Milli-Q	A volume finale

Tabella 3.6 Soluzione salina Murashige e Skoog

3.3.2 DISINFEZIONE DI SEMI DI TABACCO

Per la preparazione di semi di tabacco da utilizzare nella trasformazione, è stata innanzitutto eseguita una disinfezione secondo il seguente protocollo.

- In una provetta sterile da 2 mL mettere un piccolo quantitativo di seme.
- Aggiungere circa 1 mL di etanolo 95%. Tenere 2 min e agitare vigorosamente. Eliminare l'etanolo aiutandosi con una pipetta.

- Aggiungere 1 mL di Ipoclorito 2 %. Lasciare in incubazione per 20 ', agitare, eliminare e aggiungere 1 mL di acqua sterile, risciacquare così i semi per cinque volte. Lasciare nella provetta l'acqua dell'ultimo risciaquo.
- Prelevare una certa quantità di seme e acqua, utilizzando un puntale a cui sia stata asportata la punta in condizioni di sterilità, e disporla su substrato in piastra o in *baby jar*.
- Servendosi di un'ansa per batteriologia oppure di una pipetta Pasteur piegata a L, distribuire delicatamente i semi.
- Porre le piastre a germinare alla luce in cella climatica a 28°C.

Il substrato utilizzato per le piastre è MS soluzione salina.

Il substrato utilizzato per le *baby jar* è MS con vitamine e saccarosio (100 mL) aggiunti dopo autoclavazione.

Soluzioni di disinfezione utilizzate:

- Etanolo 95% (5 mL = 4.75 più 250 µL H₂O sterile)
- Ipoclorito di sodio 2%, diluito 1:7 in acqua sterile più 10 µL di Tween 80

3.3.3 TRASFORMAZIONE DI *N. TABACUM* CON *A. TUMEFACIENS*

La trasformazione di materiale fogliare di *N. tabacum* mediante l'impiego di *A. tumefaciens* è stata svolta secondo il protocollo seguente (Tabella 3.7).

- Preparare la cappa a flusso laminare sotto cui si svolgeranno le operazioni disinfettando il piano, sterilizzando alla fiamma le pinze.
- Sotto cappa riempire 4-5 provette da 2 ml, sterili, con 1.8 mL di LB-broth sterile. Procedere all'inoculo di *A. tumefaciens* prelevando con un stuzzicadenti sterile una quantità piccola ma visibile di colonia batterica cresciuta su piastra e stemperarla in una provetta; agitare in maniera vigorosa.
- Raccogliere una foglia di tabacco dalle *baby jar* (piantine di circa un mese) e disporla sul piano sterile della cappa a flusso laminare.
- Usando un foratappi sterile, ricavare dalla lamina fogliare dischi aventi diametro di 7mm e, con l'aiuto di una pinzetta, porli su una piastra di substrato MS10; disporre 30 dischi per piastra. Per ogni ceppo batterico ottenere un totale di almeno 200 dischi.
- Preparare due piastre di controllo dove porre dischetti che non verranno infettati e che resteranno sempre su MS10.
- Procedere con l'infezione con Agrobatterio; versare su piastra il contenuto di una provetta inoculata poco prima con il batterio. Agitare gentilmente con movimento rotatorio, in modo da bagnare tutti i dischi e rimuovere il liquido in eccesso con una pipetta. Sistemare in modo regolare i dischi aiutandosi con le pinzette.
- Incubare le piastre per una notte a illuminazione costante a temperatura di 28°C in camera di crescita.
- I dischi fogliari che dopo 24 h manifestano un alone di crescita batterica vengono trasferiti, in numero di 14 per piastra, su substrato MS10 Cefotaxime 500 mg/L.
- Incubare le piastre per 6 giorni in condizione di illuminazione costante e temperatura di 28°C. Il Cefotaxime inattiverà l'Agrobatterio.

- Dopo 8 giorni dall'inizio della trasformazione, trasferire i dischi fogliari su substrato MS10 Cefotaxime 500 mg/L-Kanamicina 200 mg/L, disponendo 10 dischetti per piastra. Incubare alle medesime condizioni per 14 giorni. Questo passaggio serve a selezionare le cellule trasformate, infatti il gene che porta la resistenza alla Kanamicina è associato al gene di interesse. In questo periodo, i dischi fogliari si saranno ingranditi e avranno prodotto callo.
- Tagliare i germogli costituiti da almeno due foglie, non chimerici e di aspetto normale e trasferirli su substrato per la radicazione (MS 0 con Cefotaxime 500 mg/L Kanamicina 200 mg/L IBA 2mg/L) posto in contenitori Magenta (ospitano fino a 4 germogli, riutilizzabili) o Sarstedt (ospitano un solo germoglio, sterili, in polipropilene, con tappo a vite).
- Porre le piante radicate in coltura idroponica. Pulire delicatamente le radici con acqua. Per i primi periodi, cercare di mantenere una umidità elevata dell'aria. Sistemarle poi a una temperatura di 28-30°C, con fotoperiodo di 16 h luce/ 8 h di buio.

Materiale occorrente per la trasformazione
Carta bibula a 3 strati piegata a libro, almeno 5 confezioni, sterile
Foratappi n. 7 sterile
2 pinze e una pinzetta sterili
Stuzzicadenti sterili
Provetta da 2 mL, sterili
10 mL di LB-broth sterile
10 piastre circa di substrato MS10
20 piastre circa di substrato MS10 Cefotaxime

Tabella 3.7 Materiale occorrente per la trasformazione

3.3.4 TECNICA DI COLTIVAZIONE IN IDROPONICA

La tecnica idroponica è una nota metodologia di coltivazione delle piante fuori suolo, in cui il substrato minerale è sostituito da una formulazione liquida. Le normali funzioni svolte dal terreno (di protezione, di ancoraggio, trofica ed ecologica) vengono sostituite da un sistema costruito ad hoc.

- La funzione di protezione delle radici nei confronti degli agenti esterni è svolta da un substrato solido inerte e tendenzialmente asettico, che si pone fra il terreno liquido e l'atmosfera circostante.
- La funzione di ancoraggio viene surrogata da un sistema che fissa l'apparato aereo della pianta in modo da mantenerla in posizione.
- La funzione trofica del terreno è sostituita integralmente dall'apporto di una soluzione nutritiva per mezzo di un impianto di fertirrigazione, che fornisce l'acqua e i sali minerali necessari.
- La funzione ecologica del terreno non viene mantenuta: il mezzo di coltura è progettato esclusivamente per le radici delle piante allevate, ed è inadatto ad ospitare altre forme viventi come avviene invece in un terreno minerale.

Le componenti caratteristiche di un sistema idroponico comprendono vasche per il contenimento del substrato di coltura, un sostegno inerte e rigido che sorregga le piante, una soluzione nutriente (in cui si trovano immersi gli apparati radicali) e un sistema di ossigenazione dell'acqua (Figura 3.12).

Per realizzare questo tipo di coltivazione è stato utilizzato il seguente materiale:

- Vasche di legno (larghezza 1m x 1m, altezza 30 cm, capienza circa 140 L) coperte con uno strato inferiore di telo da pacciamatura nero più uno strato superiore di telo trasparente in pvc.
- Fogli di polistirene ad alta densità dallo spessore di 3 cm ritagliati a misura di ciascuna vasca, su cui vengono ricavati fori di diametro circa 6-7 cm.
- Fogli di poliuretano espanso elastico (gommapiuma) ritagliati a strisce di circa 5 x 5 cm.
- Vasi in plastica di piccola dimensione, di diametro pari a circa 6 cm, a cui viene asportato il fondo.
- Aeratore per acquario Zefiro 300 con capacità airflow 110 L/h, tubi e pietre porose per ossigenare l'acqua all'interno delle vasche.
- Strumento di misurazione di pH e conducibilità elettrica.
- Lampade EUROBAY 400 per l'illuminazione posizionate sopra le vasche per la coltivazione.
- Concime solubile in due composizioni diverse. Il primo tipo di concime (15-5-30) apporta macroelementi in composizione 15-5-30% (Tabella 3.8) più microelementi (quantitativamente in dosi molto limitate), il secondo (ME) apporta una dose maggiore di microelementi essenziali (Tabella 3.9).

Nutrienti	Concentrazioni p/p
Azoto	15 %
Nitrico	11.3 %
Ammoniacale	3.7 %
Anidride fosforica solubile	5 %
Ossido di potassio	30 %

Tabella 3.8 Composizione del concime 15-5-30

Nutrienti	Concentrazioni p/p
Boro solubile in acqua	0.6 %
Rame chelato con EDTA	0.2 %
Ferro chelato con EDTA	8.1 %
Manganese chelato con EDTA	3.0 %
Zinco chelato con EDTA	1.4 %
Molibdeno solubile in acqua	0.2 %

Tabella 3.9 Composizione del concime ME

Piantine radicate cresciute in vaso Magenta per 20 giorni (cfr. §3.3.3) sono state trasferite nelle vasche per coltivazione idroponica dopo rimozione dei residui di substrato gelificato dalle radici. Ciascuna piantina è stata sistemata in un vasetto di plastica e fissata circondando il fusto con pezzi di

poliuretano espanso. Ciascuna unità è stata quindi adagiata in uno dei fori effettuati nel supporto di polistirene, avendo cura di verificare la piena immersione dell'apparato radicale nella soluzione di coltura.

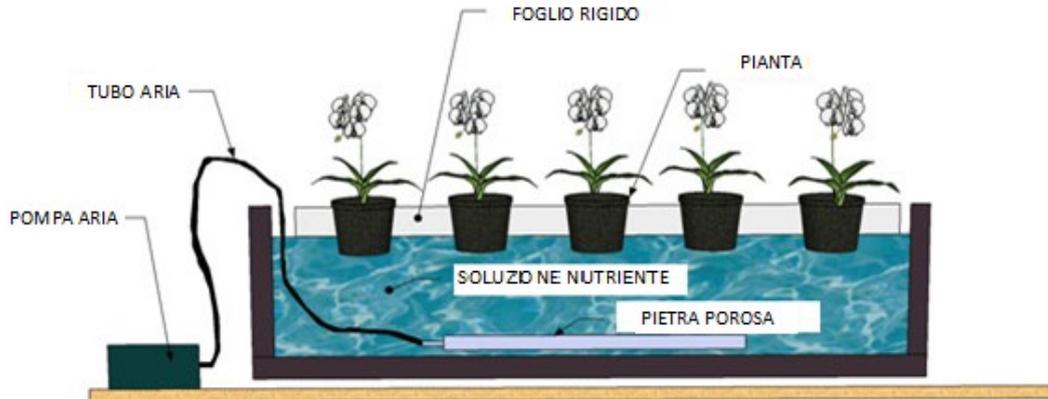


Figura 3.12 Sistema di coltivazione in idroponica

Le piante sono state allevate in idroponica per 28-30 giorni. Ogni sette giorni al substrato di coltura sono state addizionate quantità discrete di micro- e macroelementi secondo le quantità riportate in Tabella 3.10. Il pH della soluzione è stato controllato con cadenza giornaliera la prima settimana di coltivazione e ogni tre-quattro giorni nel periodo successivo. Il pH è stato mantenuto all'interno di un intervallo definito, con valori da 5.5 a 6.5 (ottimale a 5.8), mediante l'aggiunta di soluzioni di acido nitrico 90% (per spostare il pH verso valori più acidi) o idrossido di potassio 5M (per portarlo a valori più basici).

Al termine del periodo di coltivazione, corrispondente alla fioritura delle piante, la biomassa vegetale non raccolta è stata rimossa e smaltita come rifiuto biologico; le vasche sono state svuotate completamente, pulite da eventuali residui con una soluzione diluita di ipoclorito di sodio e risciacquate con abbondante acqua prima del riutilizzo.

Giorni di coltivazione	Quantità macroelementi	Quantità microelementi	Conducibilità elettrica
1	0.5 gr/L aggiunti 0.5 gr/L totali	20 mg/L aggiunti 20 mg/L totali	1.2-1.4 mS/cm
7	0.5 gr/L aggiunti 1.0 gr/L totali	20 mg/L aggiunti 40 mg/L totali	1.6-1.7 mS/cm
14	1.0 gr/L totali	10 mg/L aggiunti 50 mg/L totali	1.7-1.8 mS/cm
21	1.0 gr/L totali	50 mg/L totali	1.7-1.8 mS/cm

Tabella 3.10 Concentrazione di concime presente nel substrato di coltura e conducibilità elettrica corrispondente in relazione al tempo di coltivazione in idroponica

3.3.5 AGROINFILTRAZIONE

In questa tesi è stato messo a punto e saggiato un protocollo di trasformazione transitoria mediante infiltrazione di *Agrobacterium tumefaciens* in tessuti fogliari di tabacco (agroinfiltrazione, AI) sulla base di diverse metodologie adottate in letteratura (Kapila et al., 1997; Van der Hoorn et al., 2000; Yang et al., 2000; Marillonnet et al., 2004; Sheludko et al., 2006; Jia et al., 2007; Vaghchhipawala et al., 2011).

Materiale di partenza:

- Coltura di *A. tumefaciens* EHA105 già portante il plasmide di interesse cresciuta per 2 giorni su substrato solido addizionato dell'antibiotico opportuno (generalmente kanamicina e rifampicina).
- Piante non trasformate di *N. tabacum* L var. Xanthi fra la 4° e la 6° settimana di crescita su substrato solido (in vaso)

Protocollo di agroinfiltrazione:

- Inoculo di una colonia di *A. tumefaciens* in 10 mL di substrato di crescita (LB-broth + antibiotico) in capsula Petri Ø 9 cm.
- Incubazione a 28°C over/night in agitazione.
- Prelievo di 500 µL di coltura liquida e inoculo in 50 mL di substrato di induzione (Tabella 3.11) in beuta da 250 mL.
- Incubazione a 28°C over/night in agitazione fino al raggiungimento della densità ottica desiderata ($OD_{600}=0.8$).
- Trasferimento della coltura in un tubo tipo Falcon da 50 mL e centrifugazione a 3000 g per 15'.
- Rimozione del surnatante e risospensione del pellet nel substrato di infiltrazione (Tabella 3.12) in modo da ottenere una densità ottica pari a 1 ($OD_{600}=1$).
- Incubazione a temperatura ambiente per 1-2h.
- Utilizzando una siringa senz'ago da 1 o 2.5 mL prelevare una piccola quantità di coltura batterica.
- Esercitando una gentile pressione indurre l'ingresso della sospensione batterica all'interno del tessuto vegetale attraverso la lamina inferiore della foglia; vengono utilizzate le prime 6 foglie apicali completamente distese della pianta di tabacco.
- Incubazione in cella climatica a 23°C per 24-96 h.

Componenti	Concentrazione
MES buffer (Acido N-morpholin-Ethan-sulfonico) pH 5.5	10 mM
Antibiotico (kanamicina, rifampicina)	50 µg/mL
Acetosiringone (3,5-dimethoxy-4'-hydroxy-acetophenone)	100 µM
LB-broth (cfr. § 3.2.12)	A volume

Tabella 3.11 Composizione del substrato di induzione per AI

Componenti	Concentrazione
MgCl ₂	10 mM
MES buffer (Acido N-morpholin-Ethan-sulfonico) pH 5.5	10 mM
Acetosiringone (3,5-dimethoxy-4'-hydroxy-acetophenone)	100 μ M

Tabella 3.12 Composizione del substrato di infiltrazione per AI

3.4 TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE E QUANTIFICAZIONE PROTEICA

3.4.1 ESTRAZIONE DI PROTEINE TOTALI DA TESSUTO FOGLIARE

Per svolgere analisi immunoenzimatiche su tessuti putativamente esprimenti il minibody, è stata necessaria un'estrazione di proteine totali da foglia. Il materiale fogliare, consistente generalmente in dischetti del diametro di 1 cm, è stato sottoposto a omogeneizzazione meccanica mediante mortaio e pestello secondo il protocollo seguente.

- Da foglie distese di piante di tabacco prelevare dischetti fogliari di $\varnothing=1$ cm e porli in provette da 2 mL (conservare in ghiaccio).
- Omogeneizzare ciascun dischetto con mortaio e pestello.
- Aggiungere 1 mL di tampone di estrazione (Tabella 3.13) e omogeneizzare bene.
- Trasferire il lisato nella stessa provetta da 2 mL utilizzata per conservare il dischetto fogliare.
- Centrifugare a 4°C per 1h a 13000 g.
- Trasferire il surnatante in una provetta da 1.5 mL.
- Se necessario diluire subito i campioni 1:100 o 1:200 in tampone di diluizione per ELISA (Tabella 3.14).
- Conservare a -20° o -80°C.

Componenti	Quantità per 100mL di tampone
50 mM Tris-HCl	0.6057 g
50 mM NaCl	0.2922 g
75 mM Na-Citrato	2.2058 g
15 mM EDTA	0.5584 g oppure 3 mL da stock 0.5 M
Portare a pH	7.5
2 mM DTT	0.0309 g oppure 200 μ L da stock 1 M
PVP 2% W/V	2.0 g
Cocktail di inibitori Sigma	1 mL
0.02 % Tween-20	20 μ L t.q. oppure 200 μ L da stock 10%
Portare a volume con H ₂ O	100 mL

Tabella 3.13 Composizione del tampone di estrazione

Componenti	Quantità per 100mL di tampone
PBS	10 mL da stock 10x (Tabella 3.15)
2.5% BSA	2.5 g
0.01% Tween-20	10 μ L t.q. oppure 100 μ L da stock 10%
Portare a volume con H ₂ O	100 mL

Tabella 3.14 Composizione del tampone di diluizione per ELISA

Componenti	Quantità per 2L di stock 10x
NaCl	16.0 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄	2.88 g
KH ₂ PO ₄	0.48 g
Portare a pH	7.4
Portare a volume con H ₂ O	2 L

Tabella 3.15 Composizione del tampone PBS (Phosphate Buffer Saline)

3.4.2 DAS-ELISA

Come tecnica di rivelazione e quantificazione della presenza di molecole di minibody negli estratti proteici totali derivati da foglia di tabacco è stato utilizzato un protocollo DAS-ELISA (DAS: Double Antibody Sandwich) (Figura 3.13) precedentemente ottimizzato per la rilevazione di immunoglobuline di origine umana o murina (viene riconosciuta la porzione C_H3 della molecola).

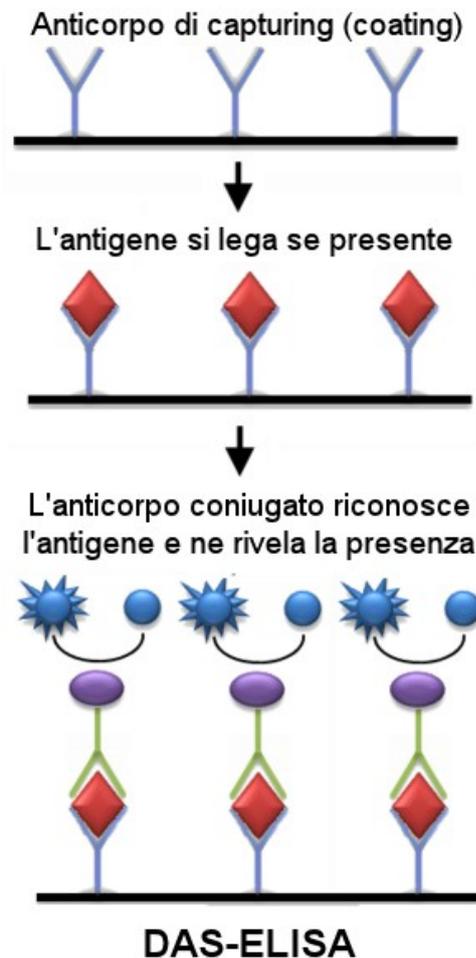


Figura 3.13 Schema di funzionamento di un saggio ELISA - Double Antibody Sandwich

- Trasferire 100 μL della soluzione di coating in ciascun pozzetto di una piastra high binding (Costar®) da 96 well.
- Incubare over/night a 4°C o 1h a temperatura ambiente.
- Rimuovere la soluzione di coating e aggiungere 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ della soluzione di blocking.
- Incubare 1h a temperatura ambiente o 30' a 37°C in agitazione.
- Rimuovere il blocking e lavare i pozzetti con soluzione di lavaggio per 3 volte, lasciando l'ultimo lavaggio in agitazione per 1'.
- Trasferire 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ di diluizioni dei campioni o della curva di riferimento.
- Incubazione a 37°C per 30' in agitazione.
- Lavare con soluzione di lavaggio per 3 volte.
- Trasferire 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ di soluzione contenente anticorpo coniugato con HRP.
- Incubazione per 30' a 37°C in agitazione.
- Lavare con soluzione di lavaggio per 3 volte.
- Trasferire 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ di TMB (SureBlue TMB -1 KPL).
- Incubazione da 1' a 5'; si sviluppa una colorazione blu.
- Fermare la reazione con 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ di HCl 1M; il colore della reazione vira a giallo.
- Lettura della piastra allo spettrofotometro a $\lambda=450\text{nm}$

Soluzione di coating (Tabella 3.16). 20 mL sono sufficienti per 2 piastre.

Anticorpo di capturing: per mC_{H3} goat anti-mouse IgG Millipore (AP-127) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in glicerolo 50%; per hC_{H3} goat anti-human IgG o FC Millipore (AP-113) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in glicerolo 50%.

Componenti	mC _{H3}	hC _{H3}
Anticorpo di capturing	2 μL da stock (1:10.000)	1 μL da stock (1:20.000)
PBS	4 mL <i>oppure</i> 400 μL da stock 10x	4 mL <i>oppure</i> 400 μL da stock 10x
Sodiazide	2 μL da stock 10%	2 μL da stock 10%
Portare a volume con H ₂ O	20 mL	20 mL

Tabella 3.16 Composizione della soluzione di coating

Soluzione di lavaggio (Tabella 3.17). 500 mL sono sufficienti per 2 piastre.

Componenti	mC _{H3} / hC _{H3}
Tween-20	500 μL <i>oppure</i> 5 mL da diluizione 10%
PBS	a volume <i>oppure</i> 50 mL da stock 10x
Portare a volume con H ₂ O	500 mL

Tabella 3.17 Composizione della soluzione di lavaggio

Soluzione di blocking (Tabella 3.18). 50 mL sono sufficienti per 2 piastre.

Componenti	mC _{H3} / hC _{H3}
BSA	1.25 g
PBS	a volume <i>oppure</i> 5 mL da stock 10x
Sodiazide	5 µL da stock 10%
Portare a volume con H ₂ O	50 mL

Tabella 3.18 Composizione della soluzione di blocking

Anticorpo coniugato (Tabella 3.19). 10 mL sono sufficienti per 2 piastre.

Anticorpo coniugato-HRP: per mC_{H3} coniugato-HRP anti-mouse IgG (AP-127P) 1 µg/µL in glicerolo 50%; per hC_{H3} coniugato-HRP anti-human IgG Millipore (AP-113P) 1 µg/µL in glicerolo 50%.

Componenti	mC _{H3}	hC _{H3}
Anticorpo coniugato	10 µL da stock (1:1.000)	5 µL da stock (1:2.000)
PBS	2 mL <i>oppure</i> 200 µL da stock 10x	2 mL <i>oppure</i> 200 µL da stock 10x
Portare a volume con H ₂ O	10 mL	10 mL

Tabella 3.19 Composizione della soluzione contenente anticorpo coniugato

Come controllo di calibrazione, accanto ai campioni in ciascun saggio ELISA sono state utilizzate IgG umane o murine diluite in tampone di diluizione in quantità decrescente da 40 a 2.5 pg/µL.

3.4.3 ELABORAZIONE DEI RISULTATI ELISA

I valori di assorbanza a $\lambda=450$ nm ottenuti mediante lettura allo spettrofotometro dei saggi ELISA effettuati con il protocollo precedente sono stati elaborati al computer per poter esser messi in relazione a una curva di calibrazione e ottenere quindi i valori di concentrazione corrispondenti.

Per ogni valore rilevato è stato dapprima sottratto il rumore di fondo (dato da un pozzetto riempito con tampone di diluizione invece di un campione); i valori così ottenuti sono quindi stati elaborati mediante il software in dotazione al lettore di piastre (chiamato Curve Fitting Data Analysis). Il programma crea in modo semplice ed intuitivo una curva di calibrazione a partire dai valori standard presenti in ciascuna piastra ed elabora automaticamente i dati relazionandoli alla curva trovata. Di seguito viene riportato un esempio di elaborazione.

I valori di assorbanza trovati, già sottratti del rumore di fondo, vengono inseriti nel programma (Figura 3.14). Il tipo di curva desiderato viene selezionato fra quelli disponibili. Nei saggi ELISA svolti in questa tesi è stato scelto sempre il tipo a quattro parametri con asse X lineare, che si è dimostrato il più accurato nel descrivere la curva standard per i vaccini.

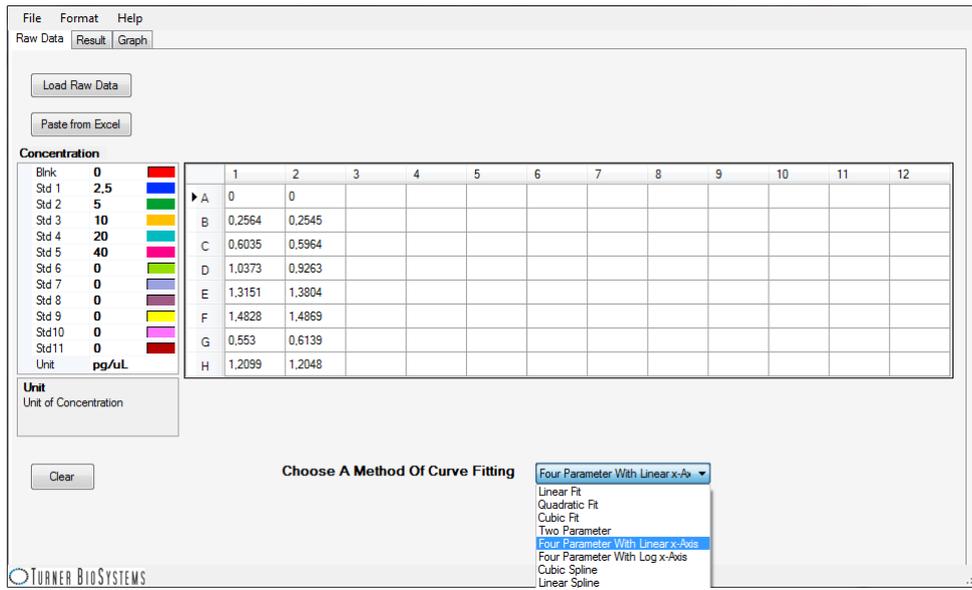


Figura 3.14 Immissione dei dati nel programma

Ad ogni valore di assorbanza della curva è stato quindi assegnato il corrispondente valore noto di concentrazione. Il programma quindi elabora autonomamente un grafico rappresentante la curva di calibrazione (Figura 3.15) e i valori in concentrazione corrispondenti ai campioni da saggiare (Figura 3.16).

Il programma fornisce inoltre un'analisi della bontà della curva di calibrazione, espressa mediante il parametro R^2 . R^2 è una frazione fra 0 e 1; valori vicini a 1 indicano che la curva combacia bene con i valori di assorbanza trovati ed è quindi affidabile; quando R^2 è vicino a zero indica che la curva trovata non è coerente con i dati più di una linea orizzontale che passi per la media di tutti i valori. Per ogni saggio ELISA effettuato in questa tesi sono state considerate attendibili analisi con R^2 non inferiori a 0.8.

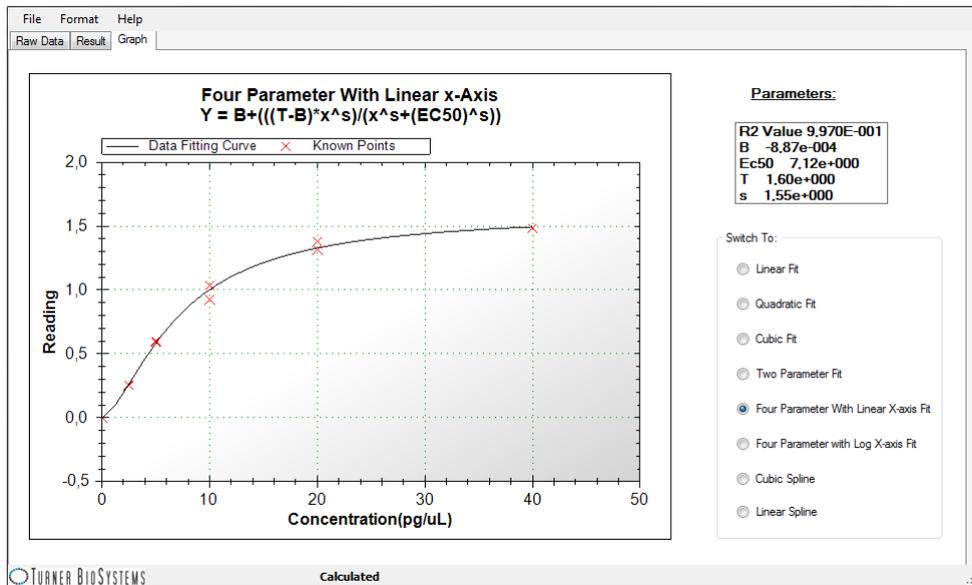


Figura 3.15 Grafico della curva di calibrazione dei campioni

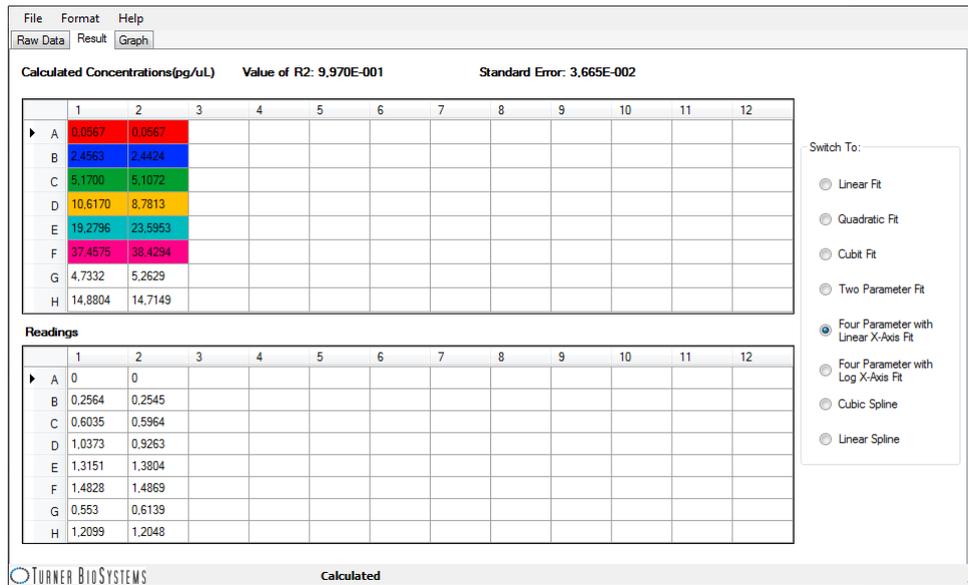


Figura 3.16 Risultati dell'elaborazione (nella metà superiore)

3.4.4 SAGGIO GUS ISTOCHEMICO

Per l'analisi qualitativa della presenza di beta-glucuronidasi (GUS) nei tessuti vegetali putativamente trasformati è stato allestito un saggio istochimico servendosi del substrato cromogeno X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide sale sodico, Sigma-Aldrich). Il protocollo di seguito utilizzato è stato messo a punto in questa tesi e non prevede passaggi di incubazione sotto vuoto come i protocolli tradizionali (Jefferson, 1987).

- Da foglie di tabacco completamente distese ricavare dischetti di \varnothing 0.7 cm o 1 cm mediante foratappi.
- Immergere immediatamente i dischetti in acqua utilizzando come supporto una piastra da 48 o 96 well (low binding, Sarstedt).
- Rimuovere l'acqua e immergere i dischetti in 250-500 μ L di soluzione X-Gluc (Tabella 3.20).
- Lasciare in incubazione a 37°C per 24-48 h.
- Rimuovere la soluzione X-Gluc e immergere i dischetti in 250-500 μ L di etanolo 1:2 in H₂O.
- Lasciare in incubazione a 37°C per 1-2 h.
- Rimuovere l'etanolo sporco di pigmenti fogliari e sostituirlo con una soluzione di etanolo 1:2 fresca.
- Lasciare in incubazione a 37°C per 24-48 h (eventuali dischetti di controllo devono aver perso interamente la colorazione verde ed apparire di un colore bianco-giallognolo).
- Con una pinzetta prelevare i dischetti e distenderli su un supporto plastico trasparente (ad es. il coperchio della stessa piastra utilizzata o un foglio di carta da lucidi).
- Versare su ogni dischetto 10 μ L di una soluzione di glicerolo 1:2 in H₂O in modo da evitare il loro disseccamento e successivo raggrinzimento.
- Acquisire un'immagine dei dischetti tramite fotocamera o scanner.
- I dischetti così trattati possono essere conservati a temperatura ambiente per almeno un mese.

Componenti	Quantità per 50 mL di soluzione
X-Gluc 2 mM (MW 521.8)	0.0186 g
DMSO 2%	1 mL
(Sciogliere completamente l'X-Gluc nel DMSO)	
Tampone fosfato 2x (Tabella 3.21)	25 mL
Na ₂ EDTA 10 mM	0.0186 g
K ₃ Fe(CN) ₆ 5 mM	0.0825 g
K ₄ Fe(CN) ₆ 5 mM	0.1055 g
Sorbitolo 400 mM	3.644 g
β-mercaptoetanolo 10 mM	35 μL
Portare a volume con H ₂ O	50 mL

Tabella 3.20 Composizione della soluzione X-Gluc

Componenti	Quantità per 200 mL
Soluzione A (NaH ₂ PO ₄ 2.76g / 100 mL H ₂ O)	39 mL
Soluzione B (Na ₂ HPO ₄ 7.16g / 100 mL H ₂ O)	61 mL
H ₂ O	100 mL

Tabella 3.21 Composizione del tampone fosfato 2x (pH 7.0)

3.4.5 ESTRAZIONE DI GUS DA TESSUTO FOGLIARE

Nell'estrazione di GUS da tabacco, per ogni trasformato sono state eseguite 3 repliche corrispondenti a 3 foglie in fase di distensione avanzata presenti nella parte apicale della pianta. Ciascuna delle foglie è stata lisata e omogeneizzata completamente tramite pressa Meku Pollähne. La procedura qui descritta permette di conservare gli estratti fogliari in modo da preservare l'attività enzimatica del GUS per molto tempo.

- In una provetta da 1.5 mL pesare 15 mg PVP (polivinilpirrolidone, MW >40000 g/mol) e aggiungervi 200 μL di tampone di estrazione (Tabella 3.22), agitare mediante vortex e lasciare in incubazione a 4°C per almeno 30'.
- Estrarre il succo delle foglie tramite pressa.
- Prelevare 100 μL di succo e addizionarlo alla miscela tampone-PVP, mantenendo il tutto in ghiaccio.
- Centrifugare per 15' a 4°C a 11500 g.
- Prelevare il surnatante (~200 μL) e trasferirlo molto rapidamente in una nuova provetta.
- Congelare immediatamente mediante azoto liquido e conservare a -80°C.

Componenti	Quantità per 100mL
NaHPO ₄ pH 7.0	5 mL da stock 1 M
DTT 5 mM	0.5 mL da stock 1M
1 mM Na ₂ EDTA	0.2 mL da stock 0.5 M
Sodium Lauryl Sarcosine 0,1%	1 mL da stock 10%
Triton X-100 0,1%	1 mL da stock 10%
A volume con H ₂ O	100 mL

Tabella 3.22 Composizione del tampone di estrazione per GUS

3.4.6 SAGGIO GUS FLUORIMETRICO

Per una valutazione quantitativa della presenza di GUS nelle piante trasformate è stato effettuato un saggio enzimatico sugli estratti proteici ottenuti con il protocollo precedente. Il substrato impiegato è il 4-Metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUG), che genera il composto fluorescente 4-metilumbelliferone (4-MU) in presenza dell'enzima GUS. Il protocollo di seguito riportato è derivato dalla procedura standard indicata da Jefferson (1987), ed è stato adattato per l'impiego su piccoli volumi in piastre da 96 well durante questa tesi.

- In una piastra da 96 pozzetti (low binding, Sarstedt) aggiungere 10 μ L di estratto GUS a 130 μ L di soluzione MUG (Tabella 3.23).
- Lasciare in incubazione per 1h a 37°.
- Prelevare 20 μ L di reazione e addizionarli rapidamente a 230 μ L di Na₂CO₃ 0.2 M (soluzione di stop) in piastra opaca da 96 pozzetti (effettuare almeno 2 ripetizioni per campione).
- Nella piastra opaca inserire lo spazio per una curva di taratura con 4-MU (1mM e diluizioni successive 1:2 per un totale di 4-5 punti).
- Leggere i risultati mediante fluorimetro a piastre.
- Elaborazione dei risultati al computer (procedura basata sul programma Curve Fitting Data Analysis del tutto simile a quanto effettuato per i saggi ELISA, cfr. § 3.4.3).

Componenti	Quantità per 100mL
MUG (MW 352.3) 1.2 mM	0.042 g
Tampone di estrazione GUS (Tabella 3.22)	100 mL

Tabella 3.23 Composizione della soluzione MUG

3.4.7 QUANTIFICAZIONE PROTEICA

Per la quantificazione della concentrazione di proteine totali presenti negli estratti fogliari chiarificati è stato utilizzato un saggio di tipo Bradford™. 5 μ L di soluzione contenente campioni ignoti o una quantità standard di BSA sono stati addizionati a 250 μ L di reagente Coomassie in una piastra da 96 well low binding (Sarstedt). La piastra è stata sottoposta a breve agitazione e quindi mantenuta a temperatura ambiente per 10'. I risultati sono stati quindi letti allo spettrofotometro a $\lambda=600$ nm, e i

valori di assorbanza ottenuti sono stati elaborati al computer come precedentemente indicato (cfr. § 3.4.3) utilizzando una curva di calibrazione di tipo lineare.

3.4.8 IMMUNOPRECIPITAZIONE

Per una verifica preliminare dell'integrità della molecola minibody prodotta in pianta è stata effettuata una prova di immunoprecipitazione su una pianta esprimente minibody con C_H3 umano (Vc). È stato utilizzato il seguente protocollo, ripetuto per una pianta di controllo ed una sicuramente trasformata (precedentemente saggiata mediante ELISA). Come ulteriore controllo è stato saggiato un anticorpo specie specifico non correlato (goat IgG).

- Omogeneizzare 0.5 g di foglia di tabacco mediante mortaio e pestello.
- Aggiungere 2 mL di tampone di lisi (Tabella 3.24) e trasferire in una provetta da 2 mL.
- Centrifugare a 4°C per 1h a 13.000 g.
- Trasferire il surnatante in una provetta da 1.5 mL.
- Misurare la concentrazione proteica totale tramite saggio Bradford™ (cfr. § 3.4.7).
- Prelevare la quantità di estratto corrispondente a 1 mg di proteina totale e porla in una nuova provetta.
- Aggiungere l'estratto a 1 µg di anticorpo goat anti-human FC (Millipore, AP113).
- Lasciare in incubazione over/night a 4°C in gentile agitazione.
- Aggiungere 20 µL di resina Sepharose G (Amersham) precedentemente risospesa in PBS.
- Lasciare in incubazione per 2 h a 4°C in gentile agitazione.
- Lavare la resina per 3 volte con tampone di lisi e una volta con PBS.
- Centrifugare a 5000 g per 5'.
- Rimuovere il surnatante ed asciugare bene il pellet aiutandosi con una siringa da 1 mL.
- Risospendere i campioni aggiungendo 20 µL di Laemmli Buffer (Tabella 3.25).

Componenti	Concentrazione
Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
Na Citrato	75 mM
Na ₂ EDTA	15 mM
DTT	1 mM
PVP	2 %
Tween-20	0.05 %

Tabella 3.24 Composizione del tampone di lisi per immunoprecipitazione

Componenti	Concentrazione
Tris-HCl pH 6.8	50 mM
β-mercaptoetanolo	100 mM
Sodio-dodecil solfato	1 %
Blu di bromofenolo	1 %

Tabella 3.25 Composizione del Laemmli Buffer

3.4.9 SDS-PAGE E ANALISI WESTERN BLOT

I campioni proteici immunoprecipitati mediante il protocollo precedente sono stati separati in elettroforesi SDS-PAGE (Laemmli, 1970) utilizzando l'apparato BioRad Mini Protean II, con uno spessore del gel di 0.75 mm. Sono stati utilizzati gel con una percentuale di acrilammide pari al 12%. Per la successiva analisi di Western blot, le proteine separate in SDS-PAGE sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Millipore) utilizzando l'apparato Trans-BLOT® SD (BioRad).

- Effettuare una corsa elettroforetica SDS-PAGE dei campioni immunoprecipitati.
- Trasferire le proteine su membrana di nitrocellulosa.
- Bloccare la membrana immergendola in una soluzione di latte scremato in polvere Oxoid 5% in PBS.
- Lasciare in incubazione per 1h a temperatura ambiente in gentile agitazione.
- Rimuovere la soluzione di blocco e aggiungere 10 mL di soluzione PBS-Tween 0.1 % addizionata di 1 µL di anticorpo secondario anti-human FC marcato con HRP (Millipore AP-113P) (in rapporto finale 1: 10000).
- Lasciare in incubazione per 1h a temperatura ambiente in gentile agitazione.
- Lavare la membrana per tre volte con una soluzione PBS + Tween-20 0.1%.
- Sviluppate la reazione mediante il sistema di rilevazione ECL Plus™ (GE Healthcare).
- Rivelare le bande risultanti mediante autoradiografia.

Per la determinazione dei pesi molecolari è stato usato il marker Precision Plus Protein standard (BioRad).

3.4.10 CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

Per le prove preliminari di purificazione del minibody mediante cromatografia di affinità è stata utilizzata una resina preimpaccata coniugata con proteina A (Hitrap Protein A FF, GE Healthcare); le prove sono state condotte mediante sistema cromatografico ÄKTAprime™ (GE Healthcare).

La proteina A è una delle proteine di origine batterica in grado di riconoscere e legare selettivamente porzioni anticorpali (altre proteine con funzione simile sono ad esempio la proteina G e M). La proteina A presenta una grande affinità per le immunoglobuline umane di classe IgG1 e IgG2 e murine IgG2a e IgG2b. Si lega con affinità moderata alle IgM, IgA e IgE umane e alle IgG3 e IgG1 murine. Non reagisce con le IgG3 o IgD umane né con le IgM, IgA o IgE murine (Figura 3.17).

Species	Subclass	Protein A binding	Protein G binding
Human	IgA	variable	-
	IgD	-	-
	IgE	-	-
	IgG ₁	++++	++++
	IgG ₂	++++	++++
	IgG ₃	-	++++
	IgG ₄	++++	++++
	IgM*	variable	-
Goat		-	++
Monkey (rhesus)		++++	++++
Mouse	IgG ₁	+	++++
	IgG _{2a}	++++	++++
	IgG _{2b}	+++	+++
	IgG ₃	++	+++
	IgM*	variable	-
Rabbit	no distinction	++++	+++
Rat	IgG ₁	-	+
	IgG _{2a}	-	++++
	IgG _{2b}	-	++
	IgG ₃	+	++

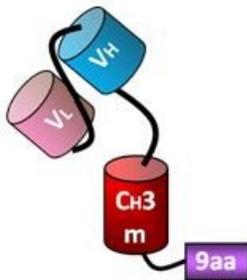
Figura 3.17 Affinità di proteina A e G per anticorpi di diversa provenienza (GE Healthcare)

4. RISULTATI

4.1 ANALISI BIOINFORMATICA DELLA PROTEINA-MINIBODY

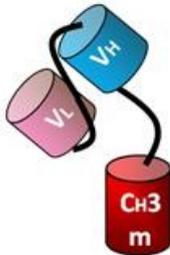
Il minibody qui descritto è una proteina di nuova ideazione, di cui è nota con certezza unicamente la struttura primaria. Al fine di predire le potenziali caratteristiche della molecola, è stata condotta un'analisi bioinformatica sfruttando gli strumenti precedentemente descritti (cfr. §3.1).

La struttura primaria (Figura 4.1) delle quattro forme prototipo di minibody, ovvero la loro sequenza amminoacidica, è stata ideata precedentemente a questa tesi. Di seguito è riportata un'analisi delle varie regioni presenti nella sequenza (peptide segnale, V_L , linker, V_H , mini-linker, C_H3 umano o murino, se previsto micro-linker e nonamero IL1 β). La corrispondenza fra illustrazione e sequenza primaria è evidenziata mediante lo stesso colore. Il peptide segnale, in verde nella sequenza amminoacidica, non è presente nella proteina matura.



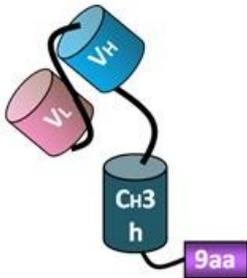
Va: (PS) V_L - V_H -m C_H3 -9aa

MGWSLILLFLVAVATGVHSQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANW
VQEKPDHLFTGLIGGTTNRPAGVVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALW
YSNHFI FGS^{peptide segnale}GTKVTVL^{peptide segnale}CGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLQQSGPEVVRPGVSVKIS
CKGSGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLEWIGVISTYNGNTNYNQKFKGKATMTVDKSSS
TAYMELARLTSEDSAIYYCARYYGNFYDWGQGTTLTVSSGGSGGRPKAPQVYTIP
PPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYS
KLN^{peptide segnale}VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGKGGSVQGEESNDK



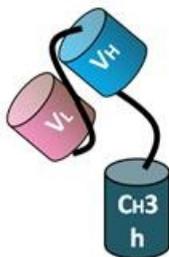
Vb: (PS) V_L - V_H -m C_H3

MGWSLILLFLVAVATGVHSQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANW
VQEKPDHLFTGLIGGTTNRPAGVVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALW
YSNHFI FGS^{peptide segnale}GTKVTVL^{peptide segnale}CGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLQQSGPEVVRPGVSVKIS
CKGSGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLEWIGVISTYNGNTNYNQKFKGKATMTVDKSSS
TAYMELARLTSEDSAIYYCARYYGNFYDWGQGTTLTVSSGGSGGRPKAPQVYTIP
PPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYS
KLN^{peptide segnale}VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK



Vc: (PS) V_L - V_H -h C_H3 -9aa

MGWSLILLFLVAVATGVHSQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANW
VQEKPDHLFTGLIGGTTNRPAGVVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALW
YSNHFI FGS^{peptide segnale}GTKVTVL^{peptide segnale}CGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLQQSGPEVVRPGVSVKIS
CKGSGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLEWIGVISTYNGNTNYNQKFKGKATMTVDKSSS
TAYMELARLTSEDSAIYYCARYYGNFYDWGQGTTLTVSSGGSGQPREPQVYTLTP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHHTYQKSLSLSPGKGGSVQGEESNDK



Vd: (PS) V_L - V_H -h C_H3

MGWSLILLFLVAVATGVHSQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANW
VQEKPDHLFTGLIGGTTNRPAGVVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALW
YSNHFI FGS^{peptide segnale}GTKVTVL^{peptide segnale}CGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLQQSGPEVVRPGVSVKIS
CKGSGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLEWIGVISTYNGNTNYNQKFKGKATMTVDKSSS
TAYMELARLTSEDSAIYYCARYYGNFYDWGQGTTLTVSSGGSGQPREPQVYTLTP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHHTYQKSLSLSPGK

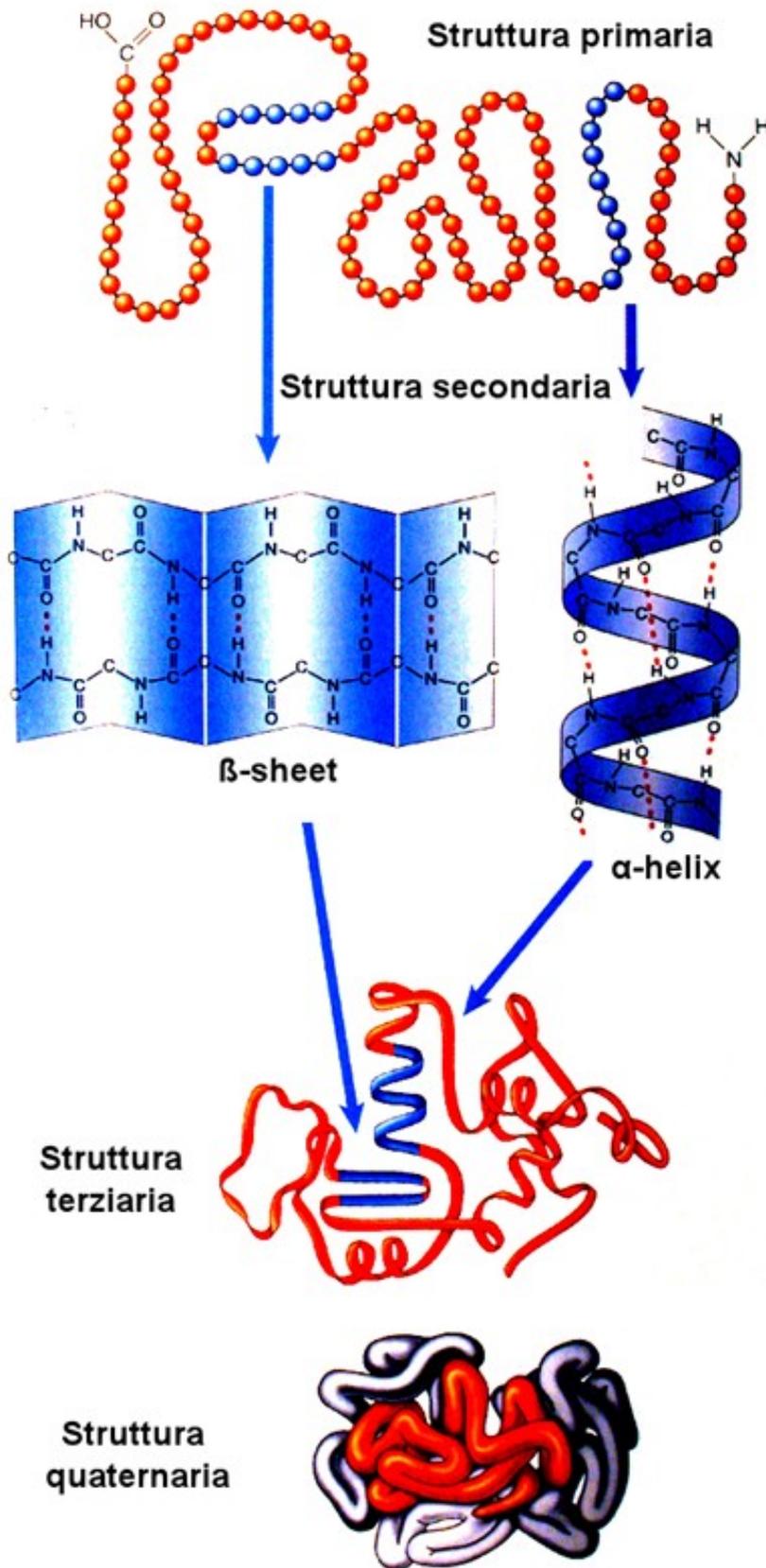


Figura 4.1 Struttura primaria, secondaria, terziaria e quaternaria delle proteine (dal servizio didattico del Brooklyn College di New York, <http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/>)

4.1.1 ANALISI DELLA SEQUENZA PRIMARIA

L'analisi della sequenza primaria è stata condotta tramite appaiamento contro un database di sequenze proteiche non ridondante (BLASTp, Non redundant protein sequences (nr), GenBank CDS translations + RefSeq Proteins + PDB + SwissProt + PIR + PRF) (cfr. § 3.1.1) al fine di verificare la correttezza della sequenza stessa e approfondire le informazioni riguardanti la sua origine.

Peptide segnale

MGWSLILLFLVAVATGVHS

Peptide segnale, 19 aa. L'analisi con BLASTp non identifica alcun dominio conservato noto (come atteso). Le sequenze che mostrano un'identità più elevata sono le seguenti:

- Immunoglobulin heavy chain variable region, precursor (*Mus musculus*); GenBank: AAB87660.1; copertura 100%, identità 84%.

```
Query  MGWSLILLFLVAVATGVHS  19
Sbjct  MGWSYIILFLVATATGVHS  19
```

- Chimeric anti-*Burkholderia pseudomallei* immunoglobulin heavy chain leader sequence [synthetic construct] GenBank: ADB20405.1; copertura 78% (I primi 15 aa), identità 100%.

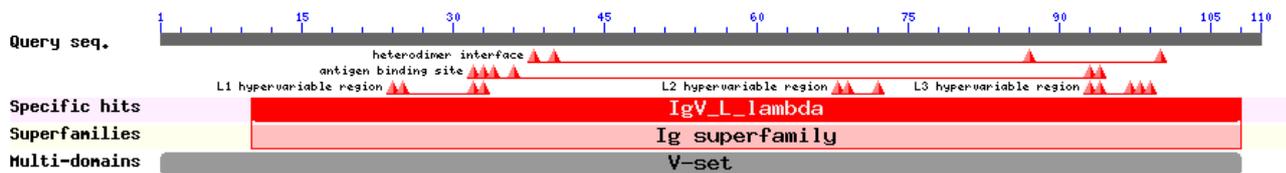
```
Query  MGWSLILLFLVAVATGVHS  19
Sbjct  MGWSLILLFLVAVAT-----  15
```

La sequenza è derivata dal peptide segnale nativo di Ig di topo, e vede la sostituzione di 3 amminoacidi (Tyr→Leu, Ile→Leu e Thr→Val). Questa sequenza è stata ricavata da un consensus di tutti i peptidi segnale noti per Ig murine, come avviene in effetti per il secondo risultato (Kim et al., 2011); è stata quindi ribattezzata PSott (ottimizzato).

V_L

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAAL
TITGAQTEDEAIYFCALWYSNHFIFGSGTKVTVLG

Dominio variabile della catena leggera (V_L), 110 aa. L'analisi con BLASTp identifica come atteso la presenza di domini conservati che identificano la sequenza come appartenente alla superfamiglia delle Ig, in particolare parte della regione variabile (V) della catena leggera (L) di isotipo λ.



Le sequenze che mostrano un'identità più elevata sono le seguenti:

- Immunoglobulin lambda chain [*Mus musculus*]; GenBank: AAO53359.1; copertura 100%, identità 100%.

- BCL1 lymphoma-derived single chain idiotype variable region [synthetic construct]; GenBank: AAF81417.1; copertura 100%, identità 100%.

Entrambi i risultati indicano come la sequenza V_L corrisponda esattamente alla parte variabile della catena leggera di Ig murina, e confermano la sua appartenenza alla linea murina linfoblastoide BCL1.

Linker

GSTSGSGKPGSGEGSTKG

Peptide di collegamento fra i domini V_L e V_H, 18 aa. L'analisi con BLASTp non identifica alcun dominio conservato noto (come atteso). Le sequenze che mostrano un'identità più elevata sono le seguenti:

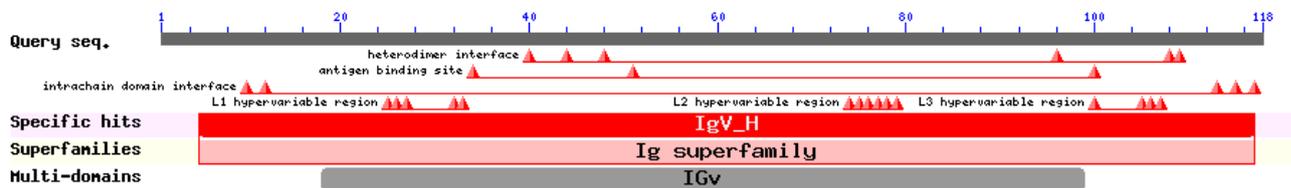
- FMC63-28Z receptor protein [synthetic construct]; GenBank: ADM64594.1 copertura 100%, identità 100%.
- Anti-human insulin ScFv antibody [synthetic construct]; GenBank: AEK48236.1, AEK48238.1, AEK48242.1, AEK48240.1; copertura 100%, identità 100%.
- Anti-death receptor DR4 ScFv antibody [synthetic construct]; GenBank: AEK48234.1, AEK48233.1; copertura 100%, identità 100%.
- Anti-Eimeria acervulina surface ScFv antibody [synthetic construct]; GenBank: AAU21208.1, AAU21209.1; copertura 100%, identità 100%.

Tutti i risultati che presentano la sequenza linker sono costrutti sintetici, in cui viene utilizzata come collegamento fra due porzioni di un scFv; ciò conferma il ruolo del peptide artificiale, già descritto in letteratura (cfr. § 1.2.5).

V_H

EVQLQQSGPEVVRPGVSVKISCKGSGYFTFDYAMHWVKQSHAKSLEWIGVISTYNGNTNYNQKFKGKATMTVDKS
SSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARYYGNYFDYWGQGTTLTV

Dominio variabile della catena pesante (V_H), 115 aa. L'analisi con BLASTp rivela come atteso la presenza di domini conservati che identificano la sequenza come appartenente alla superfamiglia delle Ig, in particolare parte della regione variabile (V) della catena pesante (H).



Le sequenze che mostrano un'identità più elevata sono le seguenti:

- BCL1 lymphoma-derived single chain idiotype variable region [synthetic construct]; GenBank: AAF81417.1; copertura 100%, identità 99%.

Query 1 EVQLQQSGPEVVRP...DYWGQGTTLTV 115
Sbjct 20 QVQLQQSGPEVVRP...DYWGQGTTLTV 134

- Immunoglobulin M heavy chain variable region [Mus musculus]; GenBank: BAD93357.1; copertura 96%, identità 99%.

Query 1 EVQLQQSGPEVVRP...GNYFDYWGQGT 111
Sbjct 14 QVQLQQSGPEVVRP...GNYFDYWGQGT 124

- Full=Ig heavy chain V region BCL1; Flags: Precursor; Swiss-Prot: P01759.1; copertura 100%, identità 95%.

Query 1 EVQLQQSGPEVVRP...SSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARYYGNYFDYWGQGTTLTV 115
Sbjct 20 QVQLQQSGPEVVRP...SSSTVHMELARLTSEDSANLYCARYYGNYFDYWGQGTTLTV 134

I risultati mostrano una corrispondenza con la regione variabile della catena pesante di Ig murina derivata da BCL1, come atteso. La classificazione come appartenente a IgM è corretta e dovuta alle caratteristiche della linea BCL1 (cfr. § 1.2.5). La sostituzione Gln (Q) → Glu (E) (da un amminoacido polare a uno con carica negativa) presente nella sequenza da noi posseduta è comune e viene ritrovata in diverse sequenze immunoglobuliniche; un'ulteriore analisi su più database rivela infatti questo tratto in sequenze come Swiss-Prot: P01756.1 (Full=Ig heavy chain V region MOPC 104E), Ig secreta da un mieloma murino di diverso tipo.

Mini-linker

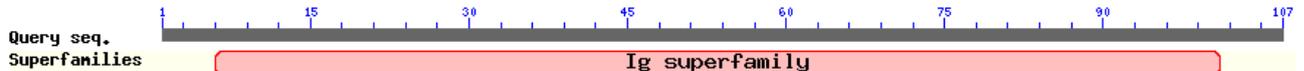
SSGGSG

L'analisi con BLAST non porta a risultati coerenti, come ci si può aspettare per un peptide di lunghezza così ristretta. Si tratta di una sequenza artificiale con l'unica funzione di collegamento fra scFv e dominio C_H3; i linker sono spesso composti da residui flessibili come Gly e Ser in modo da permettere a domini proteici adiacenti di muoversi liberamente l'uno rispetto all'altro; la presenza di Ser serve a conferire proprietà debolmente idrofile (Robinson e Sauer, 1998).

mC_H3

GRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKS
NWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

Dominio costante della catena pesante (C_H) di IgG murina, 107 aa. L'analisi con BLASTp rivela come atteso la presenza di domini conservati che identificano la sequenza come appartenente alla superfamiglia delle Ig.



Le sequenze che mostrano un'identità più elevata sono le seguenti:

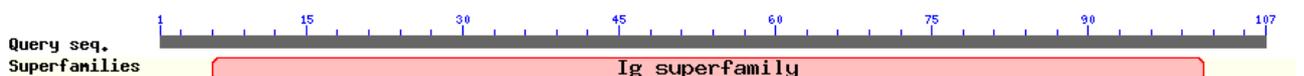
- Chain A, Murine Unglycosylated Igg Fc Fragment; PDB: 3HKF_A; copertura 100%, identità 100%.
- Ig gamma-1 chain C region (15C5) - mouse (fragment); PIR: S14236; copertura 100%, identità 98%.
- Immunoglobulin gamma 1 heavy chain [Mus musculus]; GenBank: ACO52350.1; copertura 100%, identità 99%.

I risultati confermano la sequenza come appartenente al dominio costante di una catena pesante (γ) di IgG murina, tipo 1.

hC_H3

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Dominio costante della catena pesante (C_H) di IgG umana, 107 aa. L'analisi con BLASTp rivela come atteso la presenza di domini conservati che identificano la sequenza come appartenente alla superfamiglia delle Ig.



Le sequenze che mostrano un'identità più elevata sono le seguenti:

- Immunoglobulin gamma-1 heavy chain constant region [Homo sapiens]; GenBank: AAL96263.1; copertura 100%, identità 100%.
- Immunoglobulin gamma heavy chain 3 [Homo sapiens]; GenBank: AAW65947.1; copertura 100%, identità 100%.

I risultati confermano la sequenza come appartenente al dominio costante (C_H3) di una catena pesante (γ) di IgG umana, tipo 1.

Micro-linker

GGS

Come per il mini-linker, si tratta di una corta sequenza artificiale composta da Gly e Ser con l'unico scopo di unire in modo ottimale due domini distinti.

Nonamero

VQGEESNDK

Nonapeptide derivato da IL1 β , 9aa (cfr, § 1.2.5). L'analisi con BLASTp non identifica alcun dominio conservato noto (come atteso). Le sequenze che mostrano un'identità più elevata sono le seguenti:

- Interleukin 1, beta, isoform CRA_c [Homo sapiens]; GenBank: EAW73607.1; copertura 100%, identità 100%.

Come atteso, l'analisi riconosce il nonamero come parte dell'interleuchina 1 β umana. Di seguito è riportata la sequenza dell'interleuchina (precursore: in grigio la regione rimossa con la maturazione della proteina) con in evidenza la localizzazione del nonamero.

```
1 MTAMHWMLRE ITHERSRHGE VTHFLFLTQV SEAAMAEVPE LASEMMAYYS GNEDDLFFEA
61 DGPKQMKCSF QDL DLCPLDG GIQLRISDHH YSKGFRQAAS VVAMDKLRK MLVPCPQTFQ
121 ENDLSTFFPF IFEEPIFFD TWDNEAYVHD APVRSLNCTL RDSQQKSLVM SGPYELKALH
181 LQGQDMEQQV VFSMSFVQGE ESNDKIPVAL GLKEKNLYLS CVLKDDKPTL QLESVDPKNY
241 PKKKMEKRFV FNKIEINNKL EFESAQFPNW YISTSQAENM PVFLGGTKGG QDITDFTMQF
301 VSS
```

4.1.2 PREDIZIONE DELLE CARATTERISTICHE FISICO-CHIMICHE

Utilizzando la risorsa Compute pI/Mw tool presso il server ExPASy (cfr. § 3.1.3) sono stati calcolati il peso molecolare (MW) e il punto isoelettrico (pI) teorici per ciascuna forma di minibody. Il peso molecolare è stato ricavato considerando la massa isotopica media di ciascun amminoacido. Il punto isoelettrico è ricavato utilizzando i valori delle costanti pK degli amminoacidi come descritto in letteratura (Gasteiger et al., 2005). La capacità tampone di una proteina può comunque condizionare il suo pI reale; questi dati teorici sono ovviamente da considerarsi indicativi. Per ciascun minibody è stata considerata la sequenza primaria priva di peptide segnale. L'eventuale presenza di peptide segnale (PS_{ott}) comporterebbe un aumento nel MW teorico delle forme di vaccino di 2014.46 Da.

Utilizzando inoltre la risorsa ProtParam (sempre sul server ExPASy), oltre a MW e pI (già forniti da Compute pI/Mw tool e perfettamente corrispondenti) vengono fornite altre indicazioni (Tabella 4.1).

Minibody	N° residui aa	Residui con carica – (Asp, Glu)	Residui con carica + (Arg, Lys)	pI teorico	MW teorico (Da)	Indice di instabilità
Va	368	33	30	6.33	39785.03	28.37
Vb	356	30	29	6.82	38596.86	27.88
Vc	368	32	30	6.42	39681.87	35.50
Vd	356	29	29	7.17	38493.70	35.25

Tabella 4.1 Analisi con Compute pI/Mw tool e ProtParam

L'indice di instabilità fornisce una stima della stabilità di una proteina *in vitro*. L'algoritmo che lo calcola deriva da analisi statistiche di proteine stabili e instabili, che hanno rivelato la presenza di particolari dipeptidi la cui occorrenza è significativamente diversa nelle proteine instabili. Una proteina con indice di instabilità inferiore a 40 viene predetta essere stabile, mentre un valore superiore a 40 indica una possibile instabilità (Gasteiger et al., 2005).

Dalla Tabella 4.1 si può vedere come le quattro forme di minibody differiscano in base alla presenza/assenza di nonapeptide e alla tipologia di regione C_{H3} presente. Come intuibile, a una maggior lunghezza della sequenza corrisponde un MW maggiore. Le 4 forme differiscono però per composizione amminoacidica, che si riflette in un pI diverso (leggermente spostato verso valori acidi per tutte tranne che per Vd, dove un equilibrio fra residui carichi positivamente e negativamente porta a un pI più elevato). I dati qui evidenziati sono utili per guidare successive analisi biochimiche della molecola.

4.1.3 PRESENZA DI DOMINI CONSERVATI

Grazie alla funzione Scan Prosite, accessibile presso il server ExpASY, è possibile effettuare un'analisi della presenza di domini conservati e altre caratteristiche della sequenza primaria della proteina di interesse tramite una ricerca su Prosite, database di domini proteici, famiglie e siti funzionali. Il risultato è grafico e di immediata interpretazione, ed è identico per tutte e 4 le forme di minibody (Figura 4.2). Informazioni sulla presenza di domini Ig-like vengono fornite anche da una semplice ricerca della sequenza in BLAST, come visto in precedenza (cfr. § 0) (Figura 4.3).

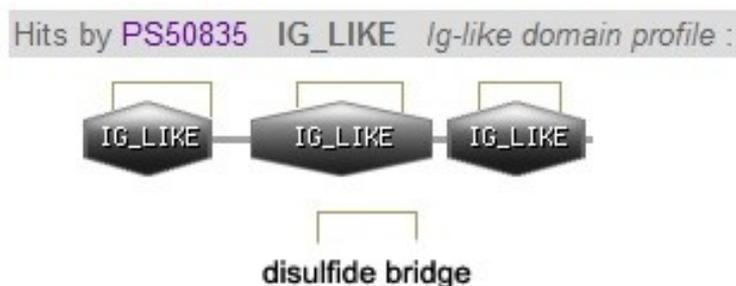


Figura 4.2 Domini conservati e funzioni specifiche secondo Scan prosite

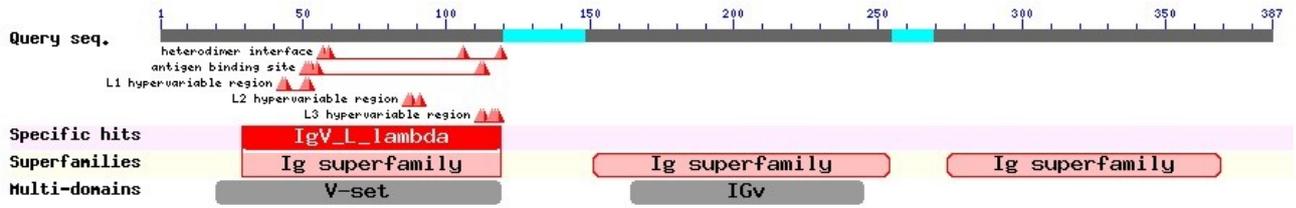


Figura 4.3 Domini conservati secondo BLASTn (NCBI Conserved Domains database)

Come si può notare, vengono riconosciuti 3 domini funzionali simil-immunoglobulinici, corrispondenti alle regioni V_L , V_H e C_H3 . Nell'analisi con Scan Prosite vengono inoltre fornite informazioni sulla presenza di 3 ponti disolfuro, sulla base della sequenza primaria (presenza di Cys) e della struttura tipica di un dominio simil-immunoglobulinico (Figura 4.4).

Un dominio Ig-like prevede da 7 a 10 β strand, distribuiti in due fogli con un caratteristico motivo "a chiave greca" (Halaby e Mornon, 1998) (Figura 4.4).

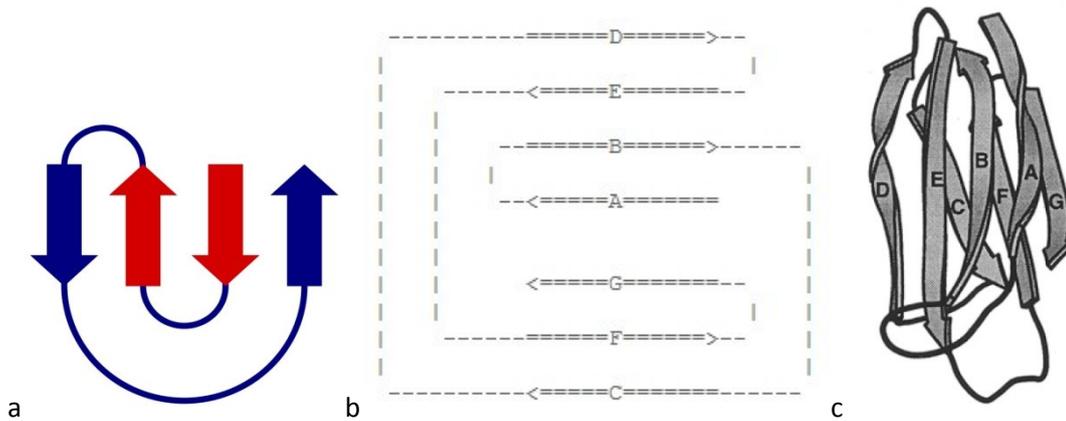


Figura 4.4 Struttura di un tipico dominio Ig-like; a) motivo a chiave greca; b) e c) rappresentazione rispettivamente in 2 e 3 dimensioni di un dominio Ig-like; le strutture β strand sono indicate con frecce, rappresentando anche la direzionalità della sequenza dall'N- al C-terminale

Per meglio evidenziare la presenza delle strutture secondarie sopra descritte, è stata effettuata un'analisi con il servizio ELM, Eukaryotic Linear Motif resource (accessibile da ExPASy), che unisce diversi tool di ricerca. Poiché il sistema ELM riconosce anche i peptidi segnale, sono state utilizzate le sequenze di minibody comprendenti PSott.

Tramite un'analisi effettuata attraverso il server SMART (Simple Modular Architecture Research Tool), ELM identifica la presenza di domini conservati. Servendosi del server GlobPlot2, ELM predice i possibili domini globulari o il disordine intrinseco nelle sequenze proteiche. Infine ELM evidenzia la presenza di strutture secondarie interfacciandosi a PDBsum, che a sua volta ricerca strutture depositate nel Protein Data Bank.

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti per le quattro sequenze di minibody assieme a una legenda per facilitare l'interpretazione dei grafici (Figura 4.5).

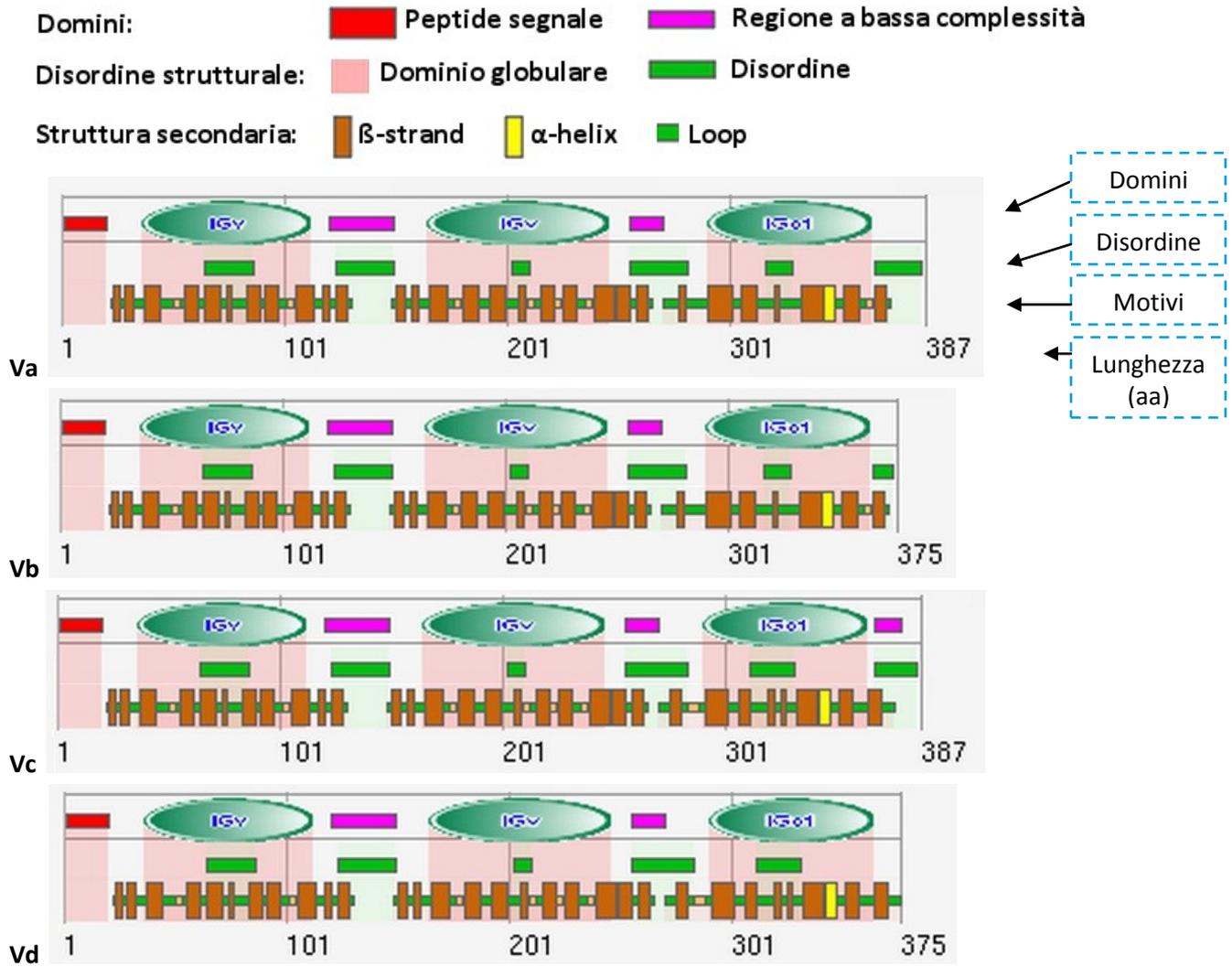


Figura 4.5 Analisi delle sequenze con ELM per Va, Vb, Vc e Vd

ELM identifica per tutte e quattro le forme di minibody la presenza di domini corrispondenti a un peptide segnale (residui 1-19), due regioni immunoglobuliniche variabili (residui 36-111 e 164-245) e una regione costante (residui 290-363), in linea con quanto messo in evidenza precedentemente. Come si può vedere, i risultati evidenziano la presenza di β -strands concentrati soprattutto a livello di domini funzionali di tipo Ig; fra un dominio e l'altro vi sono zone riconosciute come loop in cui il "disordine" intrinseco della catena è maggiore. Si noti inoltre come vi siano brevi zone di disordine anche internamente ai domini Ig; ciò conferma la presenza di una regione simil-anticorpale, in cui i β strand si dispongono a formare 2 strutture a chiave greca che si fronteggiano, prevedendo una zona di loop fra i due motivi (Figura 4.4). Si noti inoltre la diversità nella struttura secondaria fra dominio costante murino (Va, Vb) e umano (Vc, Vd), che riflette la differente composizione amminoacidica.

4.1.4 ANALISI DEL PEPTIDE SEGNALE E RICERCA DI UN NUOVO CANDIDATO

Utilizzando gli strumenti specifici a disposizione (cfr. § 3.1.4 e § 3.1.5) è stata effettuata un'analisi della bontà del peptide segnale presente nella sequenza dei minibody (PSott). Come query è stata utilizzata la sequenza PSott con a valle il primo tratto di regione V_L (51 aa), conservato in tutte e 4 le

forme. I risultati ottenuti con l'analisi effettuata dai programmi TargetP, SignalP e Sig-Pred sono riportati di seguito.

PS DI IG MURINO OTTIMIZZATO (PSOTT)

Sequenza amminoacidica: **MGWSLILLFLVAVATGVHS**

Lunghezza: 19aa

MGWSLILLFLVAVATGVHSQAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIG...

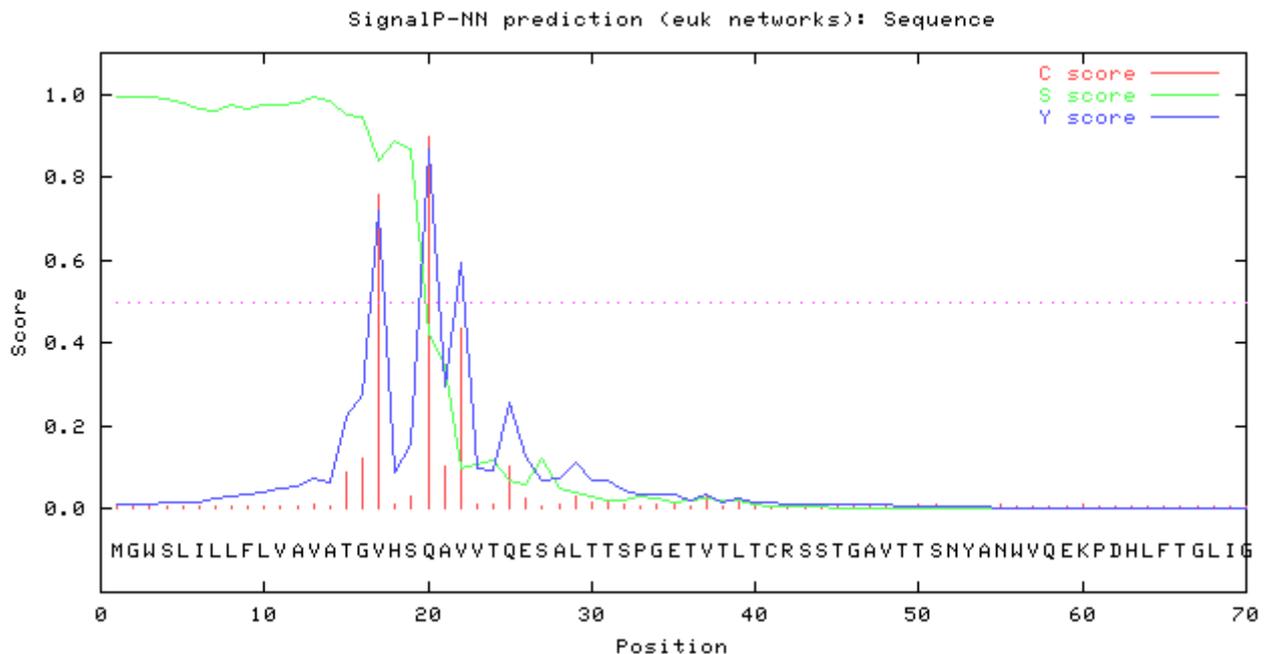
Predizione di targeting subcellulare:

TargetP

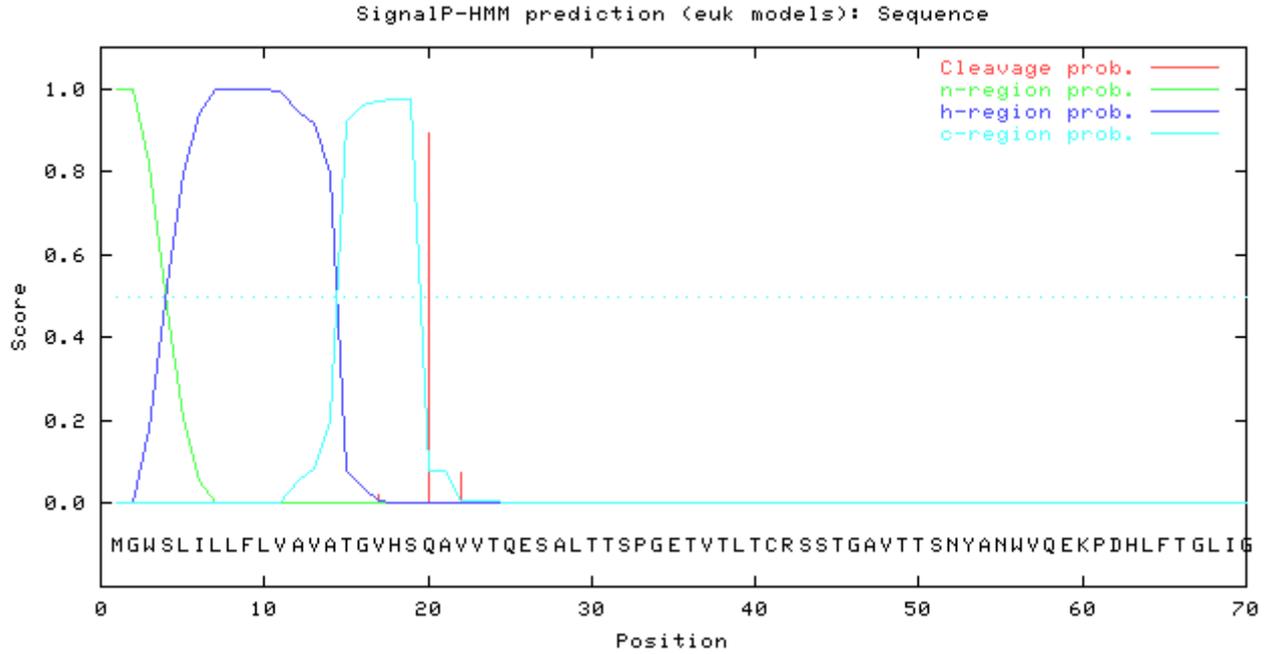
Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	387	0.075	0.034	0.851	0.029	S	2	19
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			

Predizione di taglio del PS:

SignalP



```
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 20 0.897 0.32 YES
max. Y 20 0.867 0.33 YES
max. S 2 0.996 0.87 YES
mean S 1-19 0.959 0.48 YES
D 1-19 0.913 0.43 YES
# Most likely cleavage site between pos. 19 and 20: VHS-QA
```



```
>Sequence
Prediction: Signal peptide
Signal peptide probability: 1.000
Signal anchor probability: 0.000
Max cleavage site probability: 0.893 between pos. 19 and 20
```

ProP

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 19 and 20: VHS-QA

SIG-PRED

Sequence origin

Eukaryote

Possible cleavage positions

Position	Site	Score
15 16	WSLILLFLVAVAT GV	7.5
16 17	SLILLFLVAVATG VH	10.7
19 20	LLFLVAVATGVHS QA	12.6

Most likely signal peptide and its passenger peptide

1 MGWSLILLFLV 11 AVATGVHS | QA

Come si può vedere, in teoria il peptide segnale viene riconosciuto come tale e tagliato nel sito corretto; tuttavia, una Reliability Class pari a 2 (cfr. § 3.1.4) e una predizione del sito di taglio con SignalP che vede più picchi locali (Y-score) hanno indotto a effettuare un'analisi di altre sequenze per trovare un peptide segnale con caratteristiche migliori, almeno da un punto di vista teorico.

I peptidi segnale analizzati in questa comparazione sono stati scelti secondo diversi criteri: in primo luogo sono stati considerati il PS originale (PSott) e una versione simile (PSott2), la cui elaborazione è precedente a questa tesi e di cui era fisicamente disponibile la sequenza nucleotidica. Secondariamente, è stata effettuata una ricerca di proteine alto-espresse in diverse specie vegetali, di cui fosse disponibile la sequenza nucleotidica annotata depositata in banca dati (GenBank) e che mostrassero la presenza di una regione codificante per un peptide segnale (ovvero che fossero indirizzate alla via secretoria). Le molecole considerate derivano da una lista di proteine alto-espresse

in dicotiledoni e monocotiledoni stilata precedentemente dal gruppo di ricerca presso cui è stata svolta questa tesi (De Amicis e Marchetti, 2000).

In seguito sono riportati i risultati dell'analisi effettuata con TargetP, SignalP e Sig-Pred per tutte le sequenze scelte e, alla fine, una tabella riassuntiva delle caratteristiche riscontrate per ciascuna.

PS DI IG MURINO OTTIMIZZATO MODIFICATO (PSOTT2)

Sequenza nucleotidica: ATGGGTTGGTCCCTGATTCTGCTGTTCCCTTGTTGCTGGCGCGCCTGGTGTACATTCC

Sequenza amminoacidica: **MGWSLILLFLVAGAPGVHS**

Lunghezza: 19aa

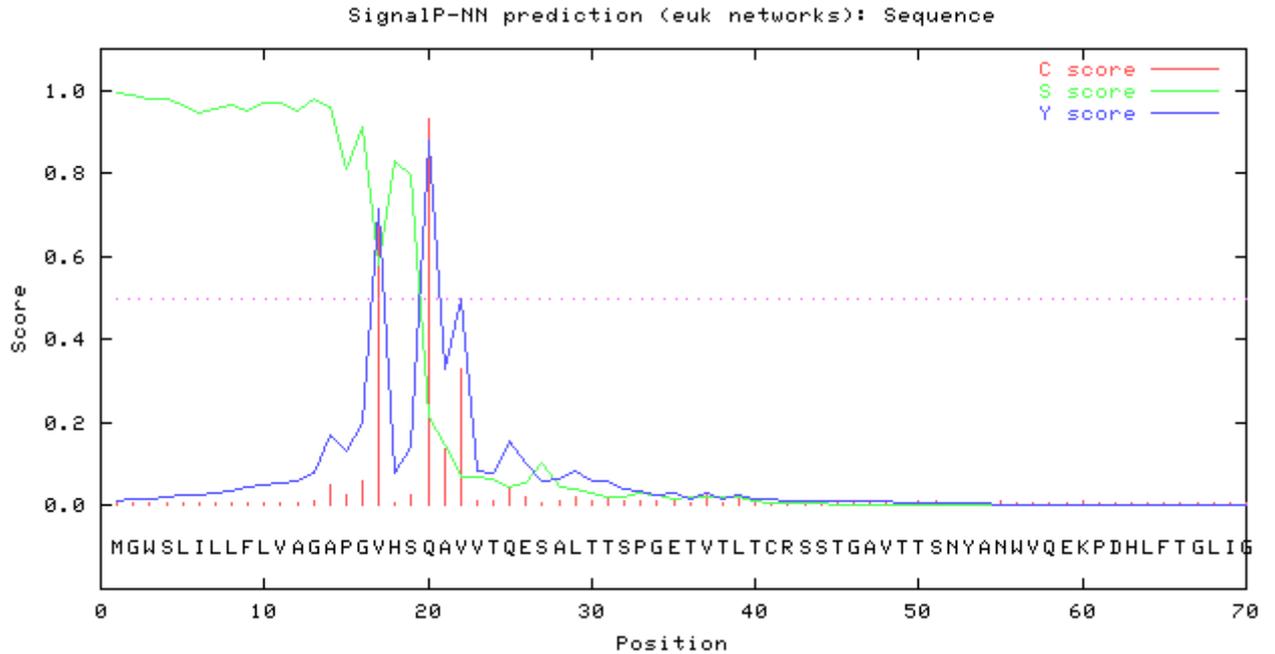
Predizione di targeting subcellulare:

TargetP

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	387	0.151	0.062	0.586	0.047	S	3	19
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			

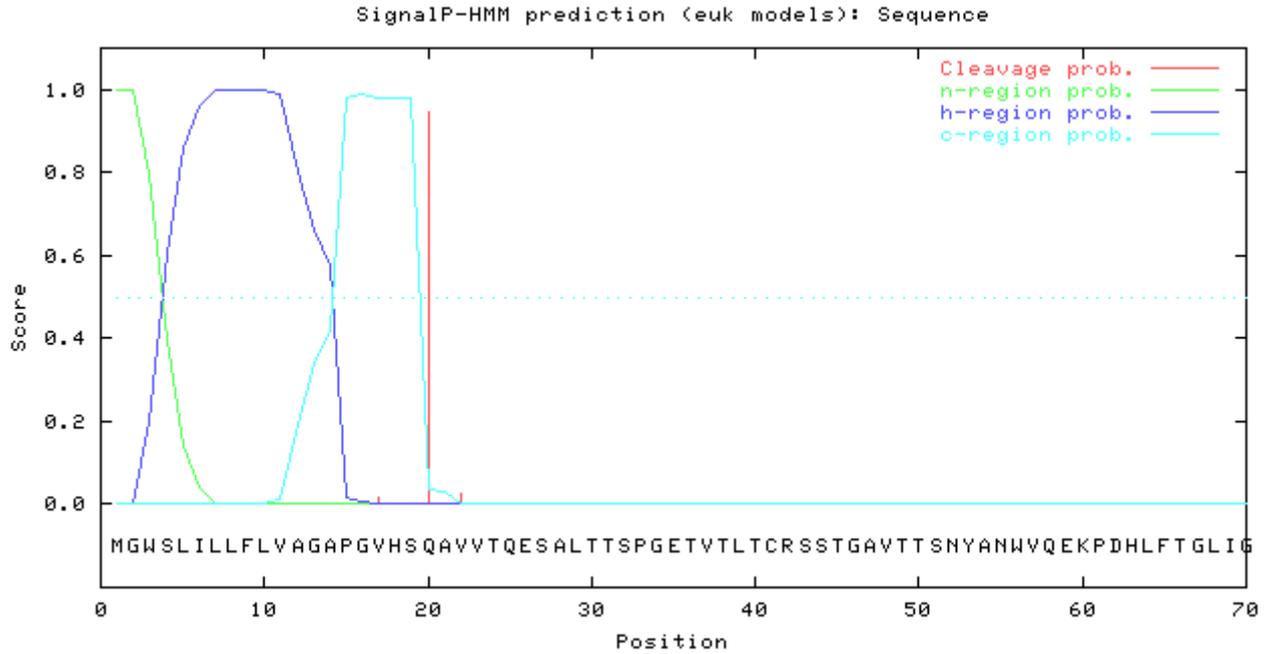
Predizione di taglio del PS:

SignalP



```
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 20 0.933 0.32 YES
max. Y 20 0.880 0.33 YES
max. S 1 0.992 0.87 YES
mean S 1-19 0.920 0.48 YES
```

D 1-19 0.900 0.43 YES
 # Most likely cleavage site **between pos. 19 and 20: VHS-QA**



>Sequence

Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 1.000

Signal anchor probability: 0.000

Max cleavage site probability: **0.946 between pos. 19 and 20**

ProP

Signal peptide cleavage site predicted: **between pos. 19 and 20: VHS-QA**

SIG-PRED

Sequence origin

Eukaryote

Possible cleavage positions

Position	Site	Score
13 14	MGWSLILLFLVAG AP	7.2
16 17	SLILLFLVAGAPG VH	10.4
19 20	LLFLVAGAPGVHS QA	12.3

Most likely **signal peptide and its passenger peptide**

1 MGWSLILLFLV 11 AGAPGVHS | QA...

PS DI PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1A (PR1A) DI *NICOTIANA TABACUM* [D90196]

Sequenza nucleotidica:

ATGGGTTTCGTTCTGTTCTCCCAGCTGCCATCCTTCCTGCTTGTTCCTCACTCTGCTGCTGTTTCCTTGTGATTTC
CATTCTGCAGAGCT

Sequenza amminoacidica: **MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLLFLVISHSCRA**

Lunghezza: 30 aa

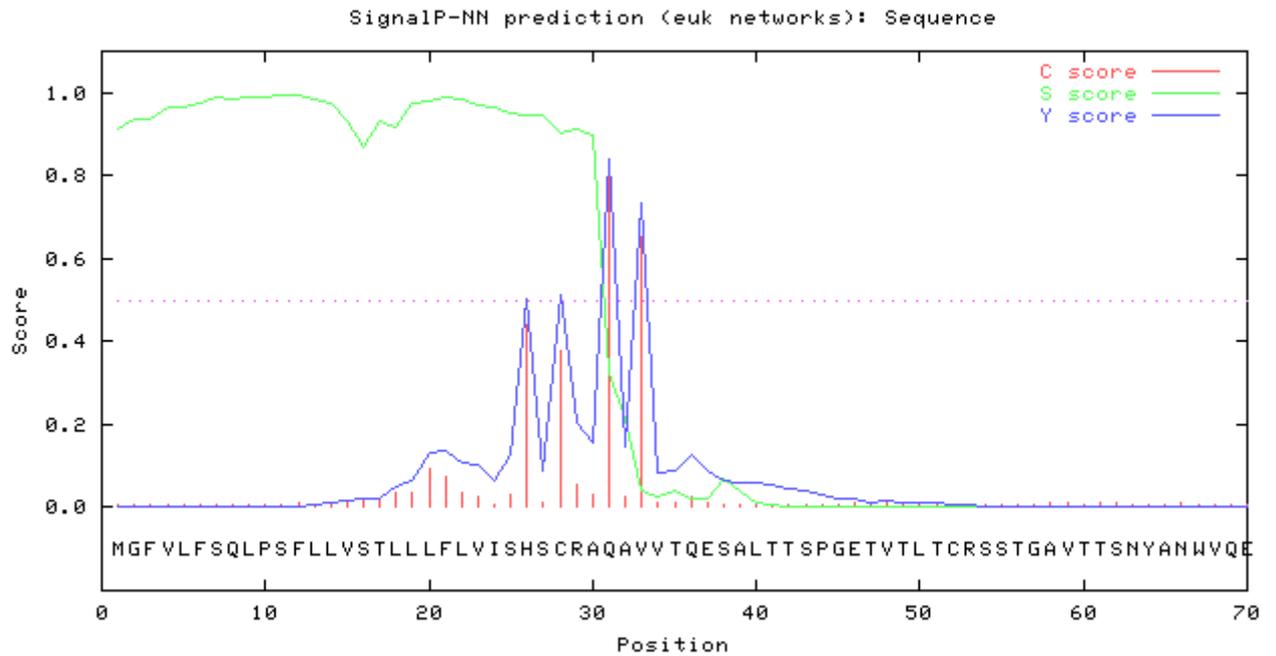
Predizione di targeting subcellulare:

TargetP

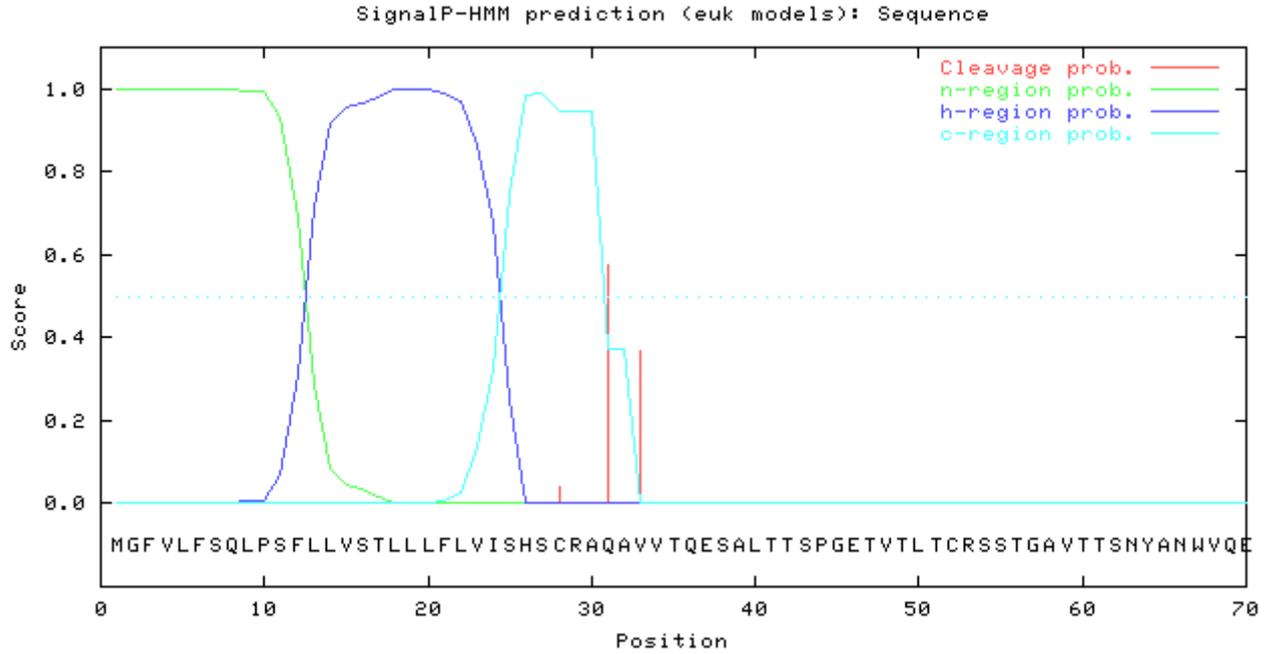
Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	398	0.006	0.099	0.959	0.005	S	1	30
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			

Predizione di taglio del PS:

SignalP



```
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 31 0.796 0.32 YES
max. Y 31 0.841 0.33 YES
max. S 12 0.995 0.87 YES
mean S 1-30 0.955 0.48 YES
D 1-30 0.898 0.43 YES
# Most likely cleavage site between pos. 30 and 31: CRA-QA
```



```
>Sequence
Prediction: Signal peptide
Signal peptide probability: 0.999
Signal anchor probability: 0.001
Max cleavage site probability: 0.574 between pos. 30 and 31
```

ProP 1.0 Server:

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 30 and 31: CRA-QA

SIG-PRED:

Sequence origin

Eukaryote

Possible cleavage positions

Position	Site	Score
25 26	LLVSTLLLFLVIS HS	7.7
27 28	VSTLLLFLVISHS CR	8.5
29 30	TLLLFLVISHSCR AQ	7.6
30 31	LLLFLVISHSCRA QA	11.8
32 33	LFLVISHSCRAQA VV	8.9

Most likely signal peptide and its passenger peptide

1 MGFVLFSQLPS 11 FLLVSTLLLFL 21 LVISHSCRA | QA

PS DI PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1B (PR1B) DI *NICOTIANA TABACUM* [D90197]

Sequenza nucleotidica:

ATGGGTTTCTTCTGTTCTCACAGATGCCATCCTTCTTCCTTGTTCCTCACTCTGCTGCTGTTTCCTGATCATTTC
CATTCTCCCATGCT

Sequenza amminoacidica: **MGFFLFSQMPSFFLVSTLLLFLIISHSHA**

Lunghezza: 30 aa

Predizione di targeting subcellulare:

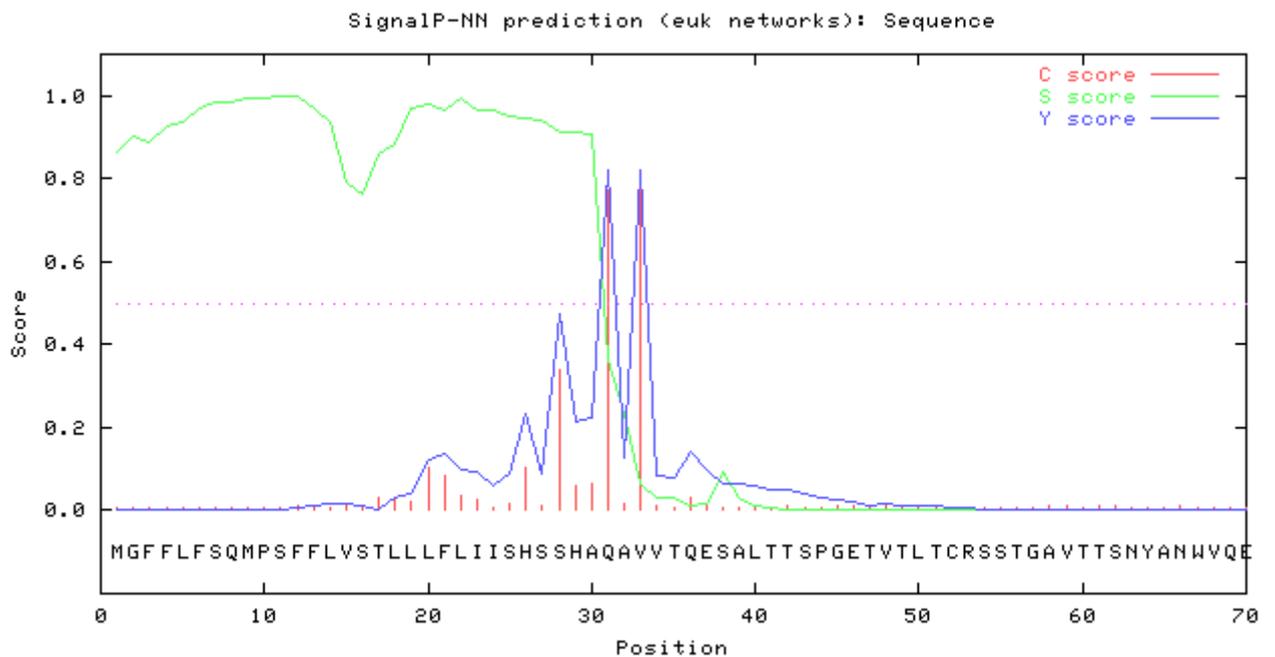
TargetP

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	398	0.015	0.044	0.955	0.006	S	1	32
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			

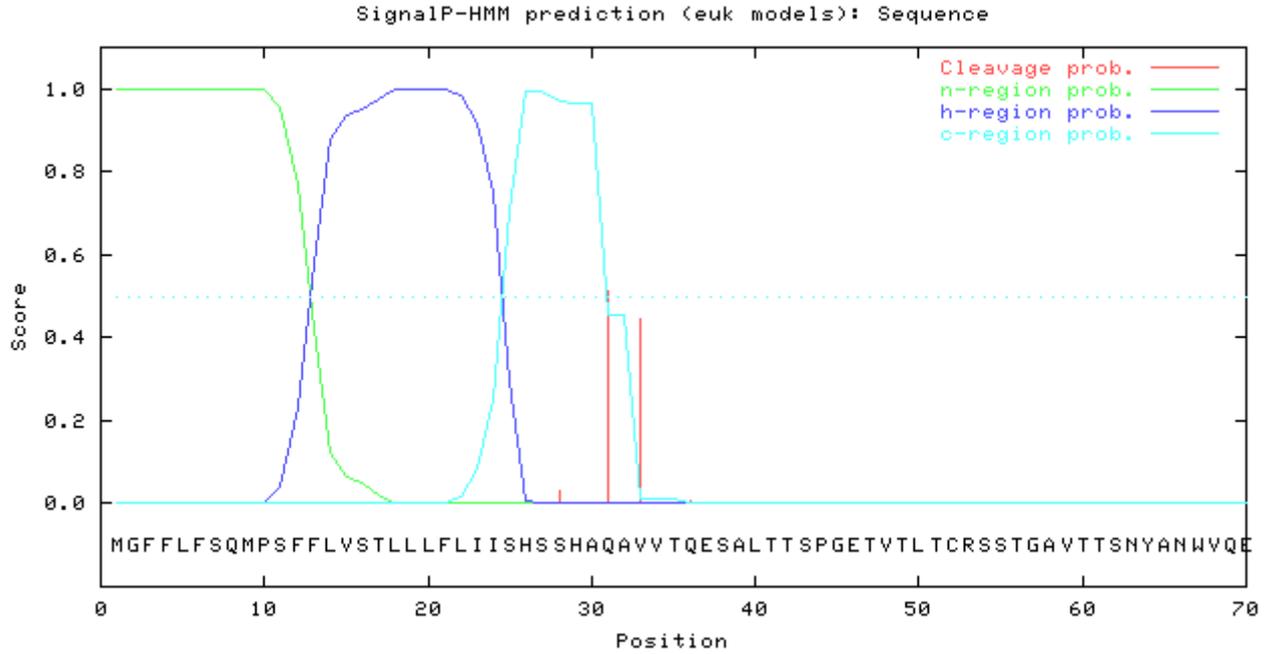


Predizione di taglio del PS:

SignalP



```
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 33 0.807 0.32 YES
max. Y 31 0.822 0.33 YES
max. S 11 0.998 0.87 YES
mean S 1-30 0.935 0.48 YES
D 1-30 0.878 0.43 YES
# Most likely cleavage site between pos. 30 and 31: SHA-QA
```



```
>Sequence
Prediction: Signal peptide
Signal peptide probability: 0.998
Signal anchor probability: 0.002
Max cleavage site probability: 0.513 between pos. 30 and 31
```

ProP 1.0 Server:

Signal peptide cleavage site predicted: **between pos. 32 and 33: AQA-VV**



SIG-PRED:

Sequence origin

Eukaryote

Possible cleavage positions

Position	Site	Score
27 28	VSTLLLFLIISHS SH	8.8
30 31	LLFLIISHSSHA QA	12.5
32 33	LFLIISHSSHAQA VV	9.0

Most likely **signal peptide and its passenger peptide**

1 MGFFLFSQMPS **11** FFLVSTLLLFL **21** LIISHSSHA | Q

PS DI LEGUMIN B DI *VICIA FABA* [X03677]

Sequenza nucleotidica:

ATGTCCAAACCTTTTCTATCTTTGCTTTCACTTTCCTTGCTTCTCTTTACAAGCACATGTTTAGCA

Sequenza amminoacidica: **MSKPFLSLLSLSLLLFTSTCLA**

Lunghezza: 22 aa

Predizione di targeting subcellulare:

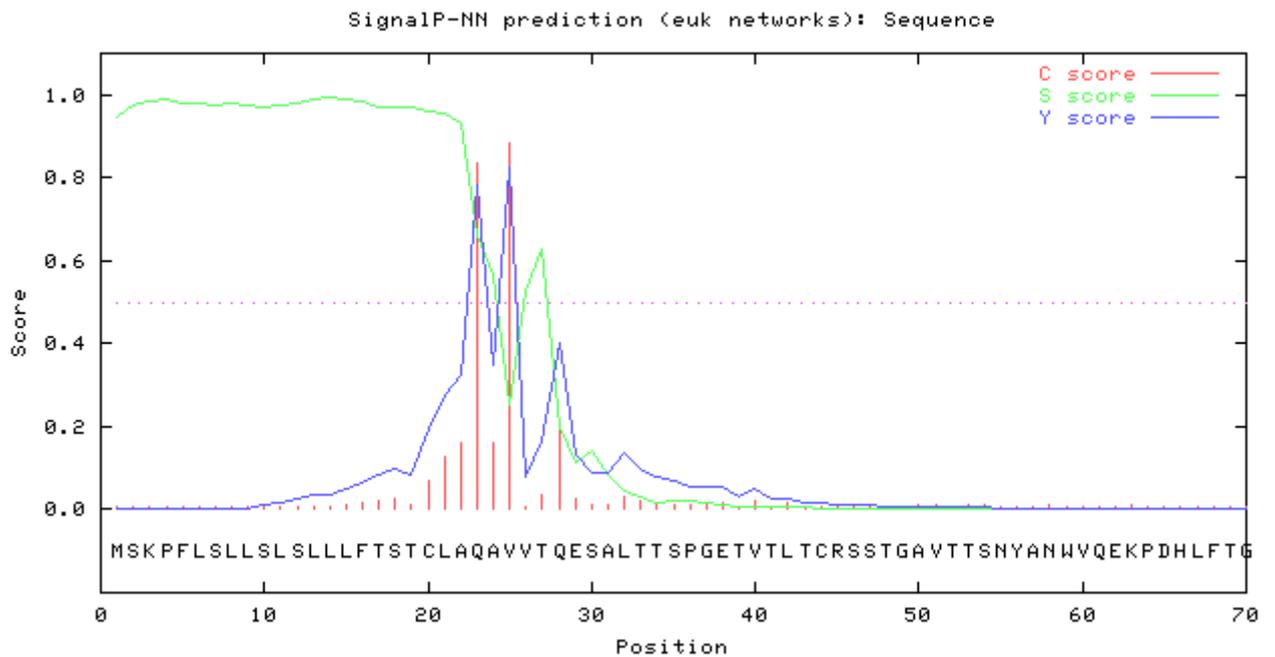
TargetP

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	390	0.055	0.018	0.978	0.007	S	1	24
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			



Predizione di taglio del PS:

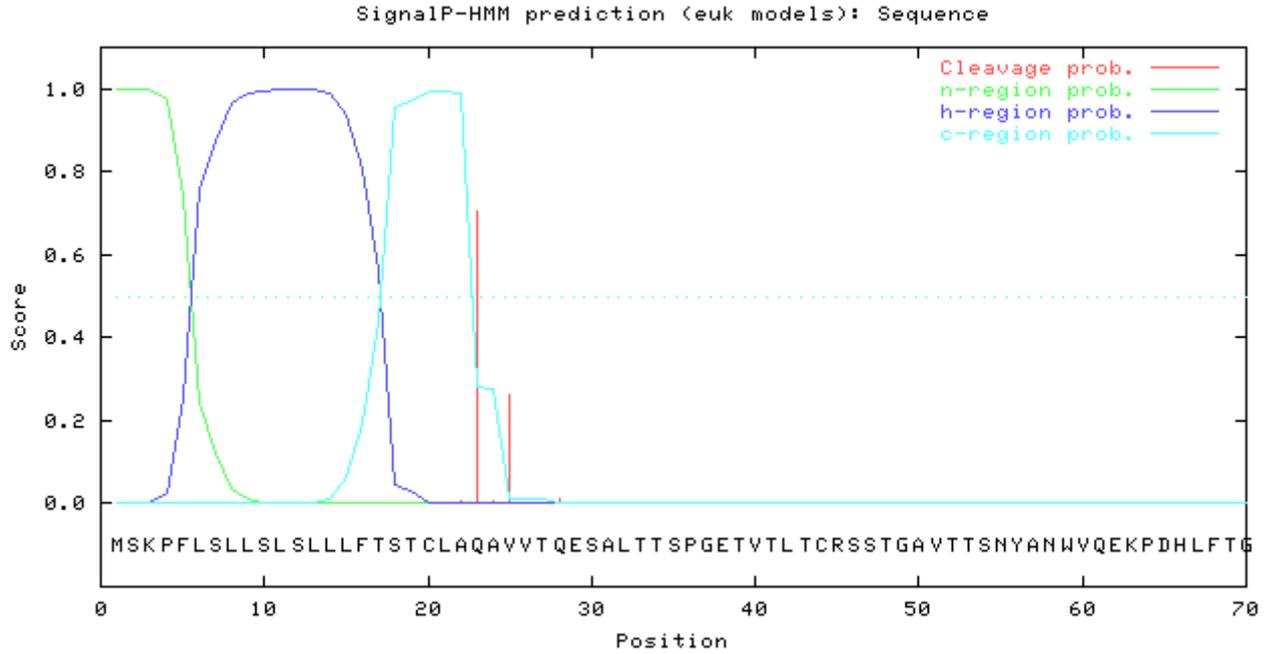
SignalP 3.0 Server:



```
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 25 0.883 0.32 YES
max. Y 25 0.825 0.33 YES
max. S 14 0.996 0.87 YES
mean S 1-24 0.944 0.48 YES
D 1-24 0.885 0.43 YES
```

Most likely cleavage site between pos. 24 and 25: AQA-VV





>Sequence

Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 1.000

Signal anchor probability: 0.000

Max cleavage site probability: 0.705 between pos. 22 and 23

ProP

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 24 and 25: AQA-VV



SIG-PRED

Sequence origin

Eukaryote

Possible cleavage positions

Position	Site	Score
22 23	SLSLLLFTSTCLA QA	10.3
24 25	SLLLFTSTCLAQA VV	8.4
27 28	LFTSTCLAQAVVT QE	7.8

Most likely signal peptide and its passenger peptide

1 MSKPFLSLLSL 11 SLLLFTSTCL 21 A | QAVVTQESA

PS DI GLUTELIN A 3 (GLUA-3) DI *ORYZA SATIVA* [X54313]

Sequenza nucleotidica:

ATGGCAACCATCAAATTCCTATAGTTTTCTTCGTCGTTTGCTTGTTCCCTCTTGTGTAATGGTTCGTTAGCC

Sequenza amminoacidica: **MATIKFPIVFFVCLFLLCNGSLA**

Lunghezza: 24 aa

Predizione di targeting subcellulare:

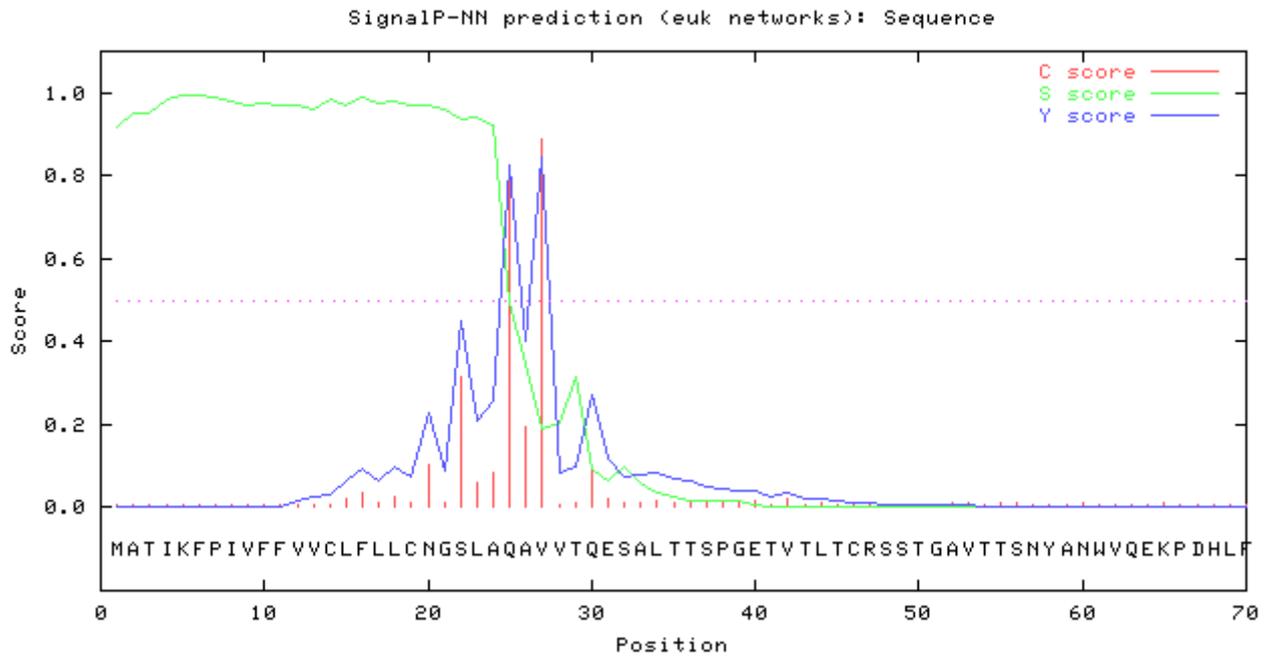
TargetP

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	392	0.009	0.026	0.988	0.009	S	1	26
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			



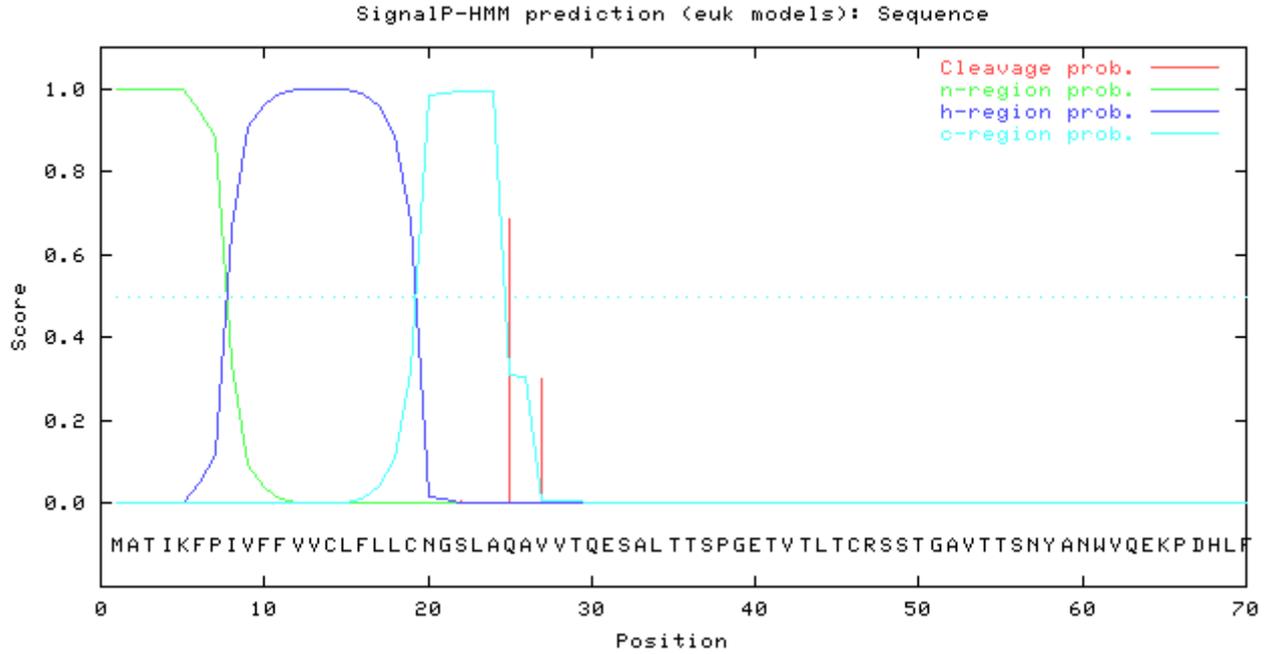
Predizione di taglio del PS:

SignalP



```
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 27 0.888 0.32 YES
max. Y 27 0.844 0.33 YES
max. S 6 0.995 0.87 YES
mean S 1-26 0.925 0.48 YES
D 1-26 0.884 0.43 YES
# Most likely cleavage site between pos. 26 and 27: AQA-VV
```





>Sequence

Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 1.000

Signal anchor probability: 0.000

Max cleavage site probability: 0.684 between pos. 24 and 25

ProP

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 26 and 27: AQA-VV



SIG-PRED

Sequence origin

Eukaryote

Possible cleavage positions

Position	Site	Score
21 22	VFFVVCFLCNG SL	8.0
24 25	VVCFLCNGSLA QA	11.1
26 27	CLCFLCNGSLAQA VV	8.7
29 30	LLCNGSLAQAVVT QE	7.6

Most likely **signal peptide** and its passenger peptide

1 MATIKFPIVFF 11 VVCFLCNG 21 SLA | QAVVTQE

PS DI GLUTELIN B 4 (GLUB-4) DI *ORYZA SATIVA* [AF537221]

Sequenza nucleotidica:

ATGGCGACCATAGCTTTCTCTCGGTTATCTATCTACTTTTGTGTTCTTCTCCTATGCCATGGCTCTATGGCC

Sequenza amminoacidica: **MATIAFSRLSIYFCVLLLCHGSMA**

Lunghezza: 24 aa

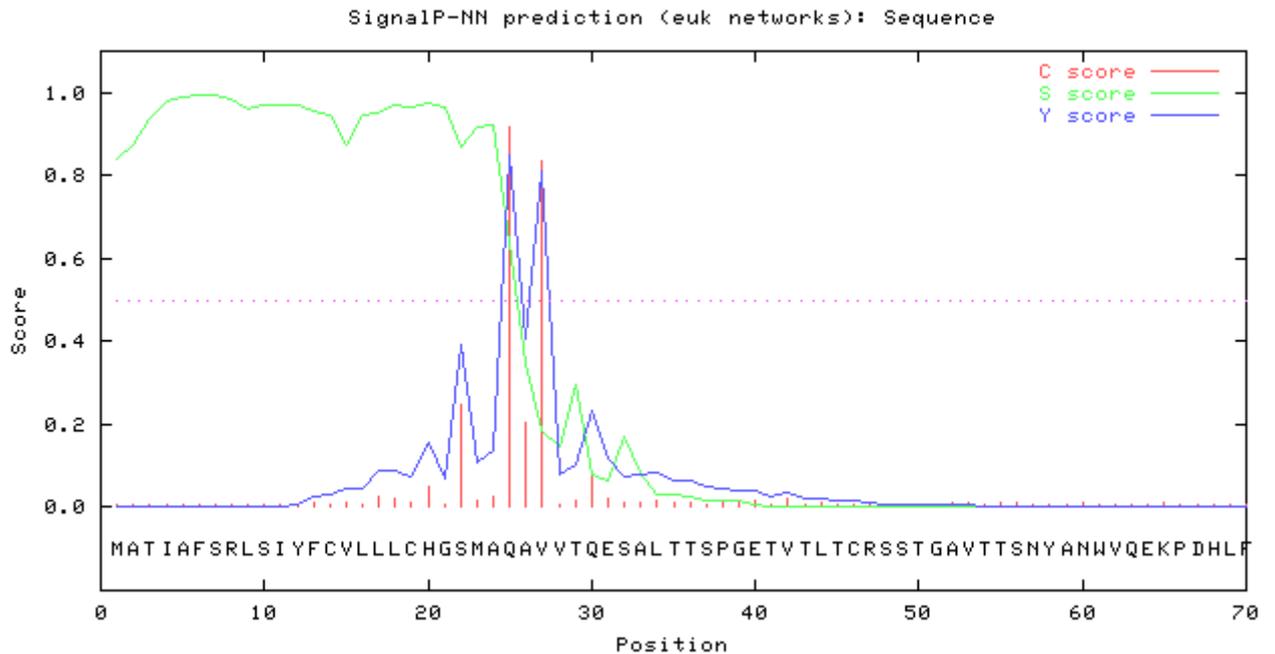
Predizione di targeting subcellulare:

TargetP

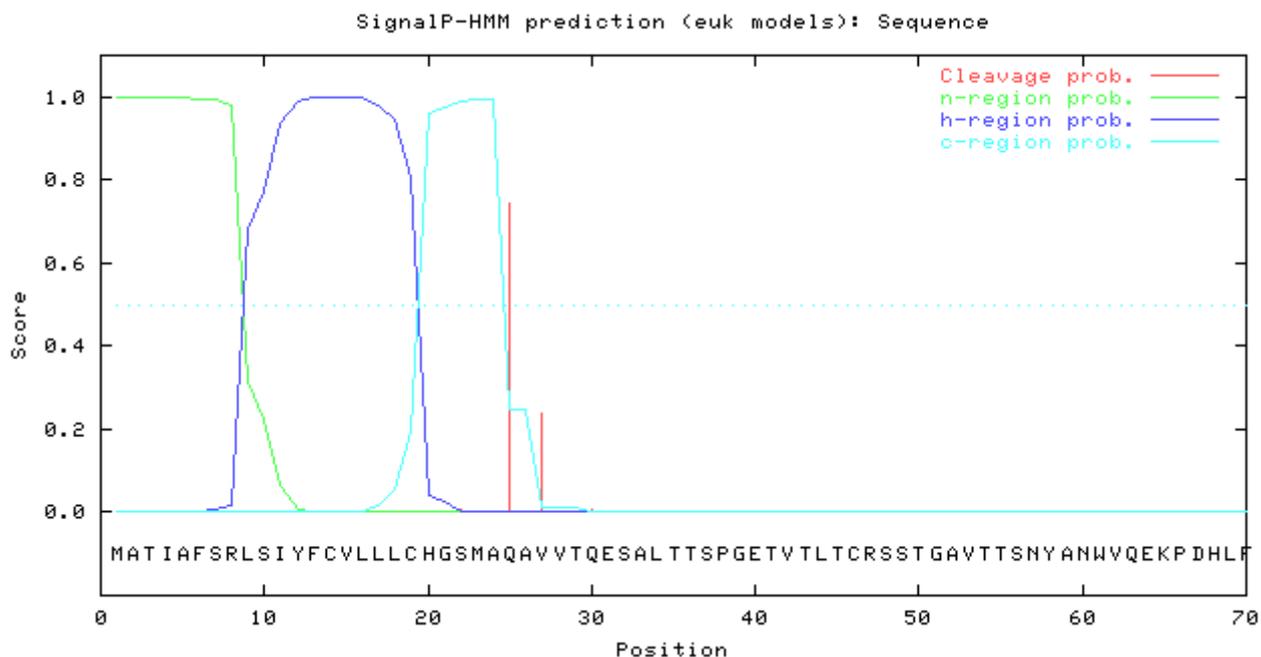
Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	392	0.011	0.055	0.978	0.006	S	1	24
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			

Predizione di taglio del PS:

SignalP



```
>Sequence          length = 70
# Measure  Position  Value  Cutoff  signal peptide?
max. C     25         0.918  0.32   YES
max. Y     25         0.851  0.33   YES
max. S     6          0.995  0.87   YES
mean S    1-24       0.946  0.48   YES
D         1-24       0.899  0.43   YES
# Most likely cleavage site between pos. 24 and 25: SMA-QA
```



>Sequence

Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 1.000

Signal anchor probability: 0.000

Max cleavage site probability: 0.743 between pos. 24 and 25

ProP

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 24 and 25: SMA-QA

SIG-PRED

Sequence origin

Eukaryote

Possible cleavage positions

Position	Site	Score
24 25	YFCVLLLC HGSMA QA	9.4
26 27	CVLLLC HGSMAQA VV	8.6

Most likely **signal peptide** and its passenger peptide

1 MATIAFSRLSI 11 YFCVLLLC HGSMA 21 SMA | QAVVTQE

PS PROLAMIN 10KDA DI *ORYZA SATIVA* [X84649]

Sequenza nucleotidica:

ATGGCAGCATAACACCAGCAAGATCTTTGCCCTGTTTGCCTTAATTGCTCTTTCTGCAAGTGCCACTACTGCA

Sequenza amminoacidica: **MAAYTSKIFALFALIALSASATTA**

Lunghezza: 24 aa

Predizione di targeting subcellulare:

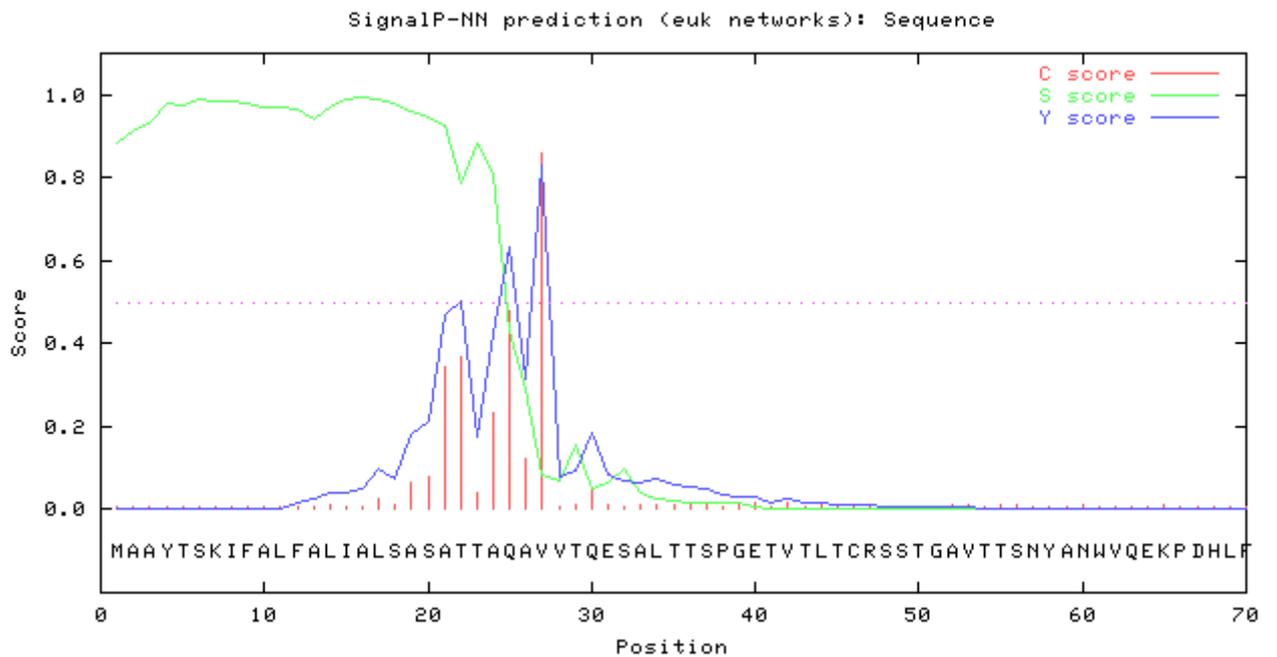
TargetP

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	392	0.088	0.016	0.982	0.003	S	1	26
cuttoff		0.000	0.000	0.000	0.000			



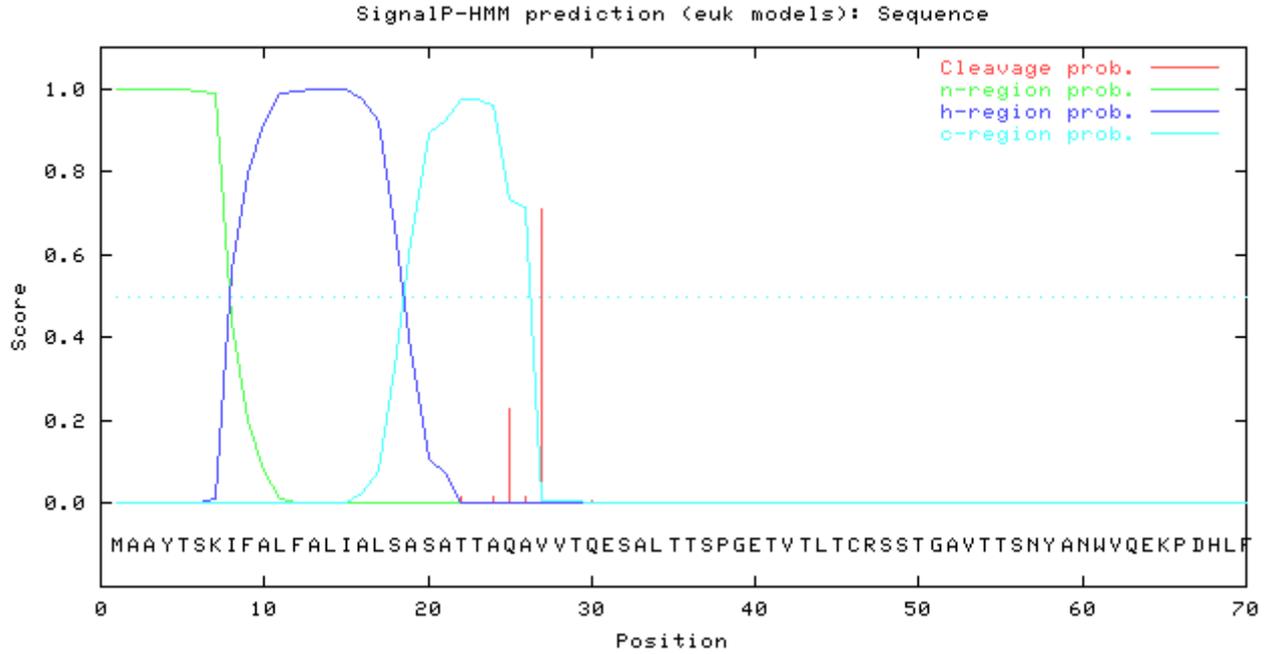
Predizione di taglio del PS:

SignalP



```
>Sequence          length = 70
# Measure  Position  Value  Cutoff  signal peptide?
max. C     27         0.861  0.32   YES
max. Y     27         0.830  0.33   YES
max. S     16         0.995  0.87   YES
mean S     1-26       0.901  0.48   YES
           D     1-26       0.866  0.43   YES
# Most likely cleavage site between pos. 26 and 27: AQA-VV
```





Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 1.000

Signal anchor probability: 0.000

Max cleavage site probability: 0.710 between pos. 26 and 27



ProP

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 26 and 27: AQA-VV



SIG-PRED

Sequence origin

Eukaryote

Possible cleavage positions

Position	Site	Score
20 21	IFALFALIALSAS AT	9.6
21 22	FALFALIALSASA TT	10.1
23 24	LFALIALSASATT AQ	8.8
24 25	FALIALSASATTA QA	10.3
25 26	ALIALSASATTAQ AV	7.2
26 27	LIALSASATTAQA VV	9.5

Most likely signal peptide and its passenger peptide

1 MAAYTSKIFAL 11 FALIALSASA 21 TTA | QAVVTQE

PS DI PROLAMIN (RP6) DI *ORYZA SATIVA* [X65064]

Sequenza nucleotidica: ATGAAGATCATTTCGTATTTGCTCTCCTTGCTATTGTTGCATGCAATGCCTCTGCG

Sequenza amminoacidica: **MKIIFVFALLAIVACNASA**

Lunghezza: 19 aa

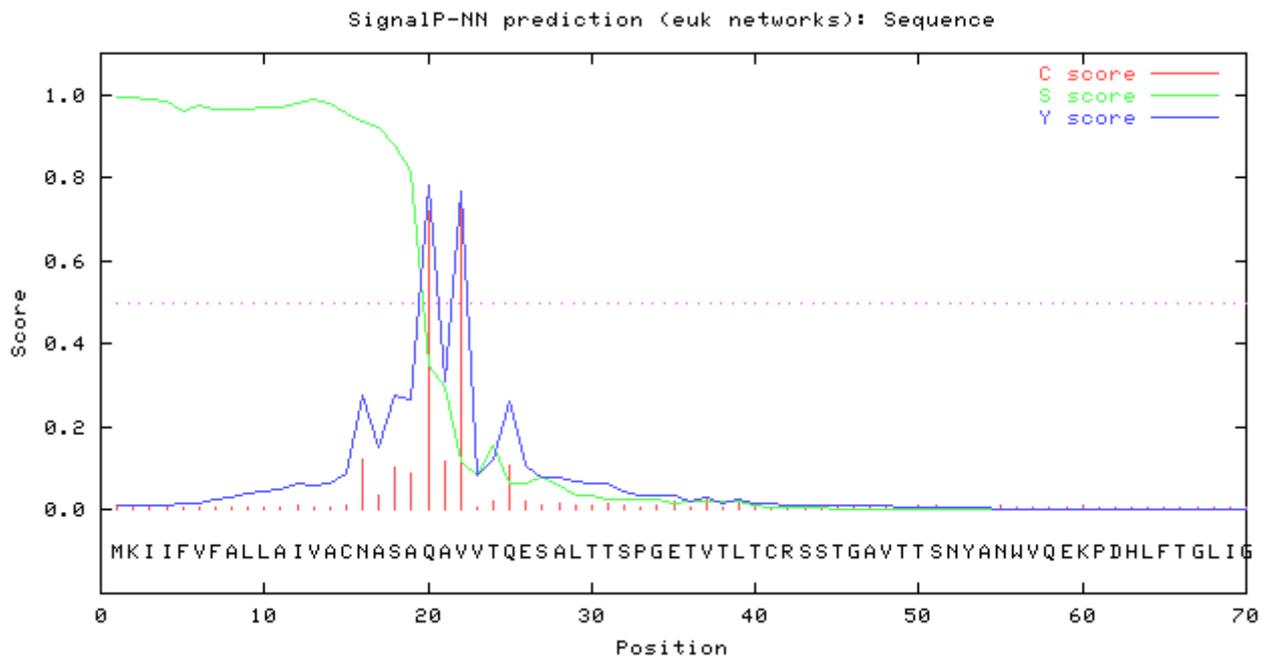
Predizione di targeting subcellulare:

TargetP

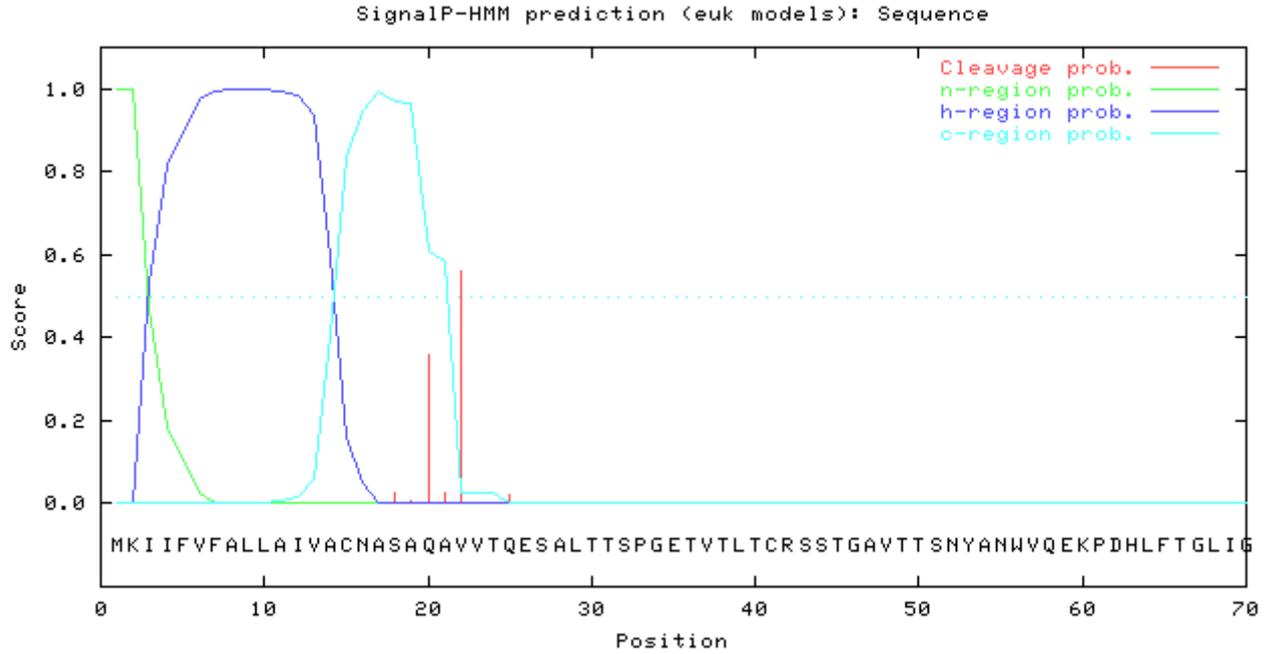
Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	387	0.195	0.014	0.915	0.021	S	2	19
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			

Predizione di taglio del PS:

SignalP



```
>Sequence          length = 70
# Measure  Position  Value  Cutoff  signal peptide?
  max. C     22      0.738  0.32   YES
  max. Y     20      0.781  0.33   YES
  max. S     2       0.994  0.87   YES
  mean S    1-19     0.957  0.48   YES
  D         1-19     0.869  0.43   YES
# Most likely cleavage site between pos. 19 and 20: ASA-QA
```



>Sequence

Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 1.000

Signal anchor probability: 0.000

Max cleavage site probability: 0.560 between pos. 21 and 22



ProP 1.0 Server:

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 19 and 20: ASA-QA

SIG-PRED:

Sequence origin

Eukaryote

Possible cleavage positions

Position	Site	Score
15 16	IIFVFALLAIVAC NA	8.6
16 17	IFVFALLAIVACN AS	7.4
17 18	FVFALLAIVACNA SA	9.6
18 19	VFALLAIVACNAS AQ	7.6
19 20	FALLAIVACNASA QA	10.3
21 22	LLAIVACNASAQA VV	8.8

Most likely signal peptide and its passenger peptide

1 MKIIFVFALLA 11 IVACNASA | QA

PS DI BASIC GLOBULIN 7S DI *GLYCINE MAX* [D16107]

Sequenza nucleotidica:

ATGGCTTCTATCCTCCACTACTTTTTAGCCCTCTCTCTTTCTTGCTCTTTTCTTTTCTTCTTATCCGACTCA

Sequenza amminoacidica: **MASILHYFLALSLSCSFLFFLSDS**

Lunghezza: 24 aa

Predizione di targeting subcellulare:

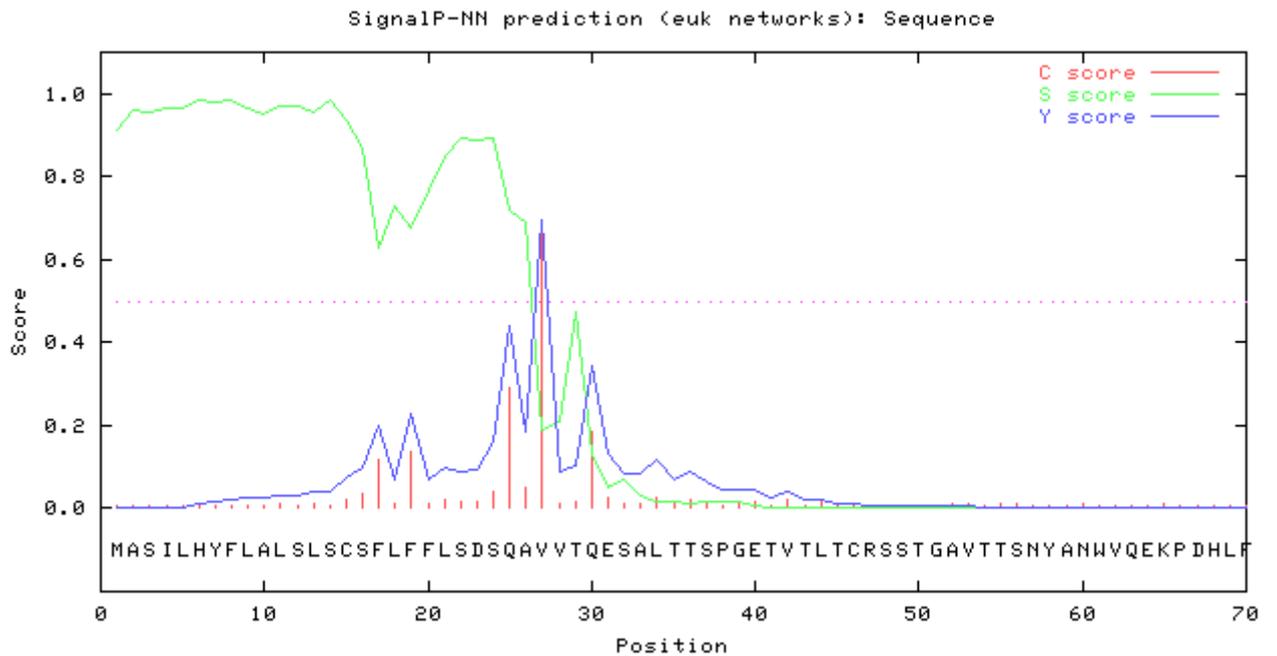
TargetP

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	392	0.049	0.021	0.977	0.008	S	1	26
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			



Predizione di taglio del PS:

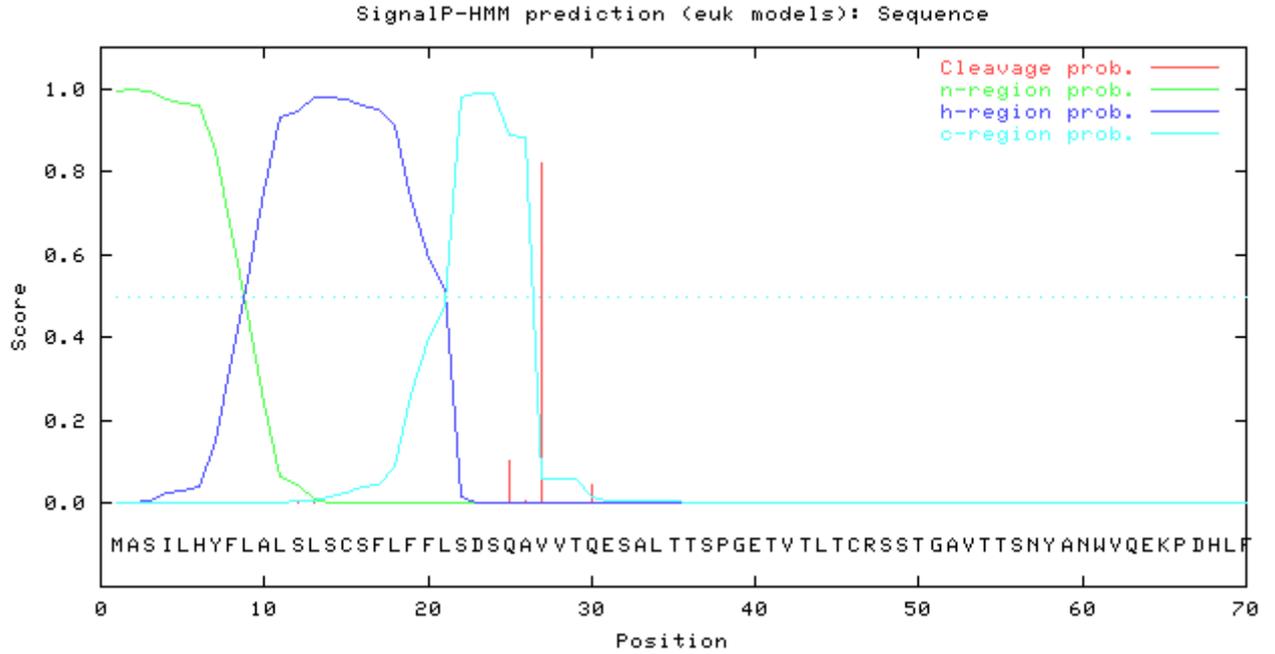
SignalP



```
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 27 0.664 0.32 YES
max. Y 27 0.696 0.33 YES
max. S 6 0.984 0.87 YES
mean S 1-26 0.886 0.48 YES
D 1-26 0.791 0.43 YES
```

Most likely cleavage site between pos. 26 and 27: SQA-VV





>Sequence

Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 0.996

Signal anchor probability: 0.003

Max cleavage site probability: 0.821 between pos. 26 and 27



ProP

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 26 and 27: SQA-VV



SIG-PRED

Sequence origin

Eukaryote

Possible cleavage positions

Position	Site	Score
26 27	SCSFLFFLSDSQA VV	7.2
29 30	FLFFLSDSQAVVT QE	8.2

Most likely signal peptide and its passenger peptide

1 MASILHYFLAL 11 SLSCSFLFFL 21 SDSQAVVT | QE



PS DI ACIDIC ENDOCHITINASE (CHIB1) DI *ARABIDOPSIS THALIANA* [NM_122314.2]

Sequenza nucleotidica:

ATGACCAACATGACTCTTCGCAAGCATGTTATATACTTTCTTTTCTTCATAAGCTGCTCTCTTAGC

Sequenza amminoacidica: **MTNMTLRKHVIYFLFFISCSLS**

Lunghezza: 22 aa

Predizione di targeting subcellulare:

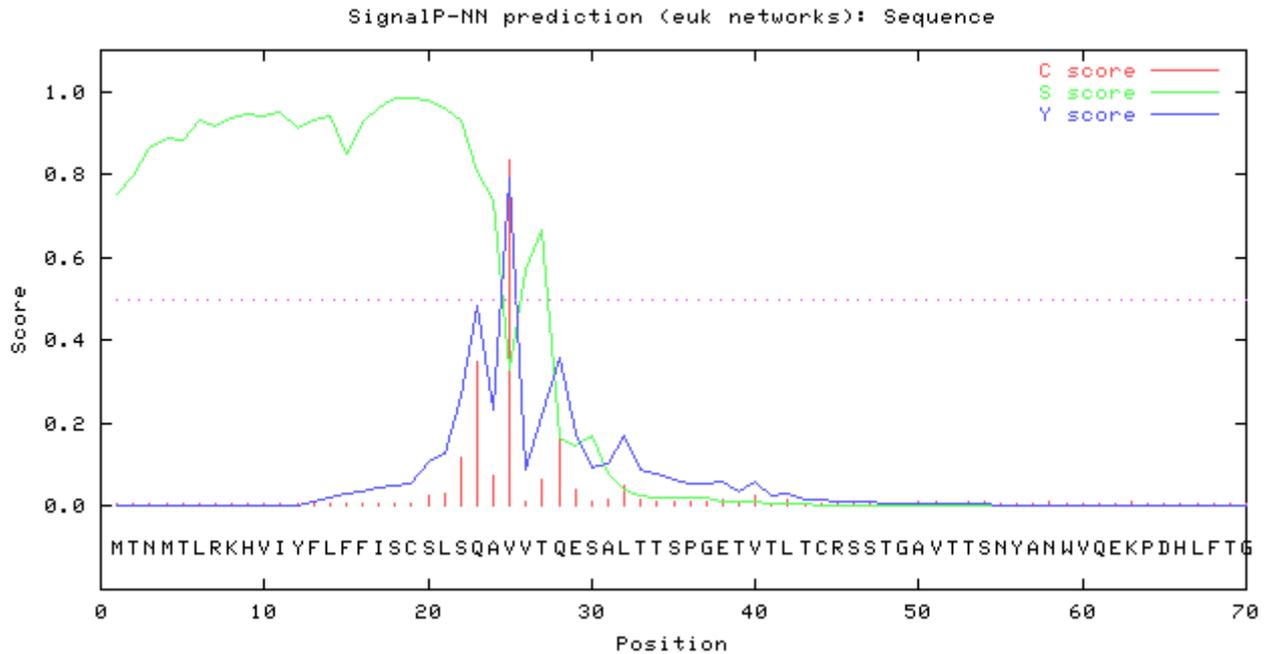
TargetP

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	390	0.009	0.082	0.961	0.012	S	1	24
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			



Predizione di taglio del PS:

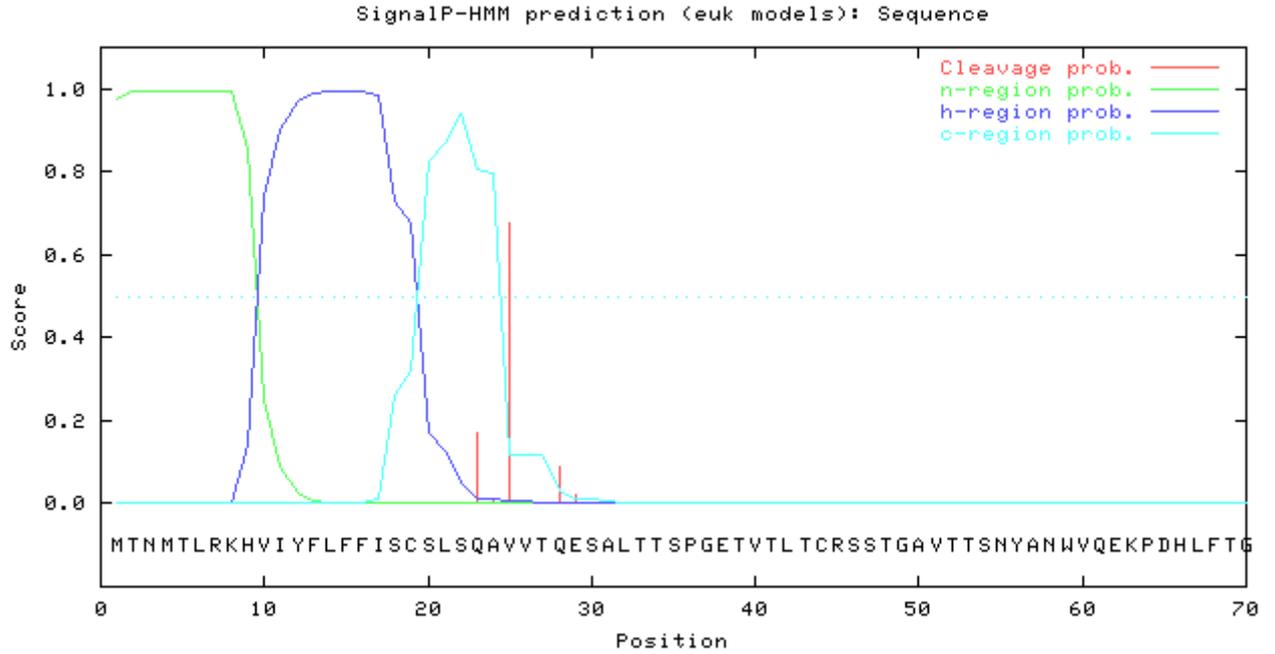
SignalP



```
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 25 0.834 0.32 YES
max. Y 25 0.794 0.33 YES
max. S 19 0.985 0.87 YES
mean S 1-24 0.905 0.48 YES
D 1-24 0.849 0.43 YES
```

Most likely cleavage site between pos. 24 and 25: SQA-VV





>Sequence

Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 0.977

Signal anchor probability: 0.018

Max cleavage site probability: 0.678 between pos. 24 and 25



ProP

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 24 and 25: SQA-VV



SIG-PRED

Sequence origin

Eukaryote

Possible cleavage positions

Position	Site	Score
22 23	VIYFLFFISCSLS QA	8.5
24 25	YFLFFISCSLSQA VV	8.3
27 28	FFISCSLSQAVVT QE	8.6

Most likely signal peptide and its passenger peptide

1 MTNMTLRKHVI 11 YFLFFISCSL 21 SQA-VV | QESA



PS DI P14 (PLANT PATHOGENS RELATED PROTEIN) DI *LYCOPERSICON ESCULENTUM* [A22637]

Sequenza nucleotidica:

ATGGGGTTATTCGAAAACACATTGTTTCTCTTTTGTTCATGATATTAGCCATATTTCACTCTTGTGACGCT

Sequenza amminoacidica: **MGLFENTLFLFCFMILAI FHSCDA**

Lunghezza: 24 aa

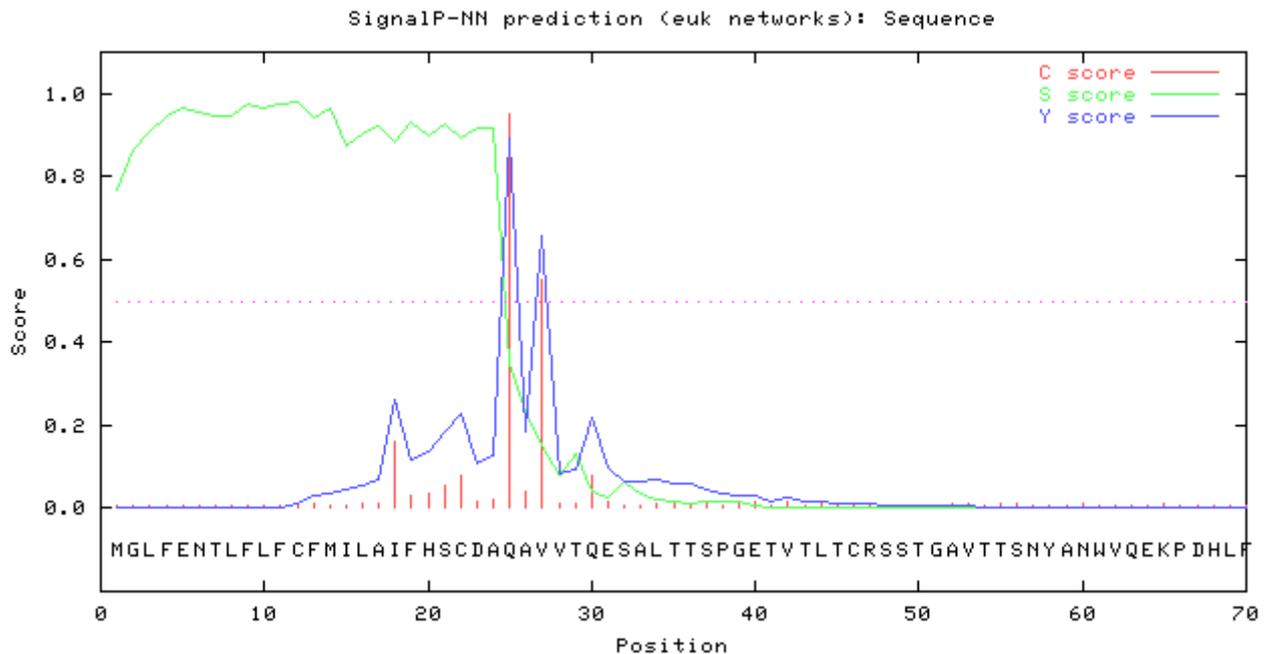
Predizione di targeting subcellulare:

TargetP

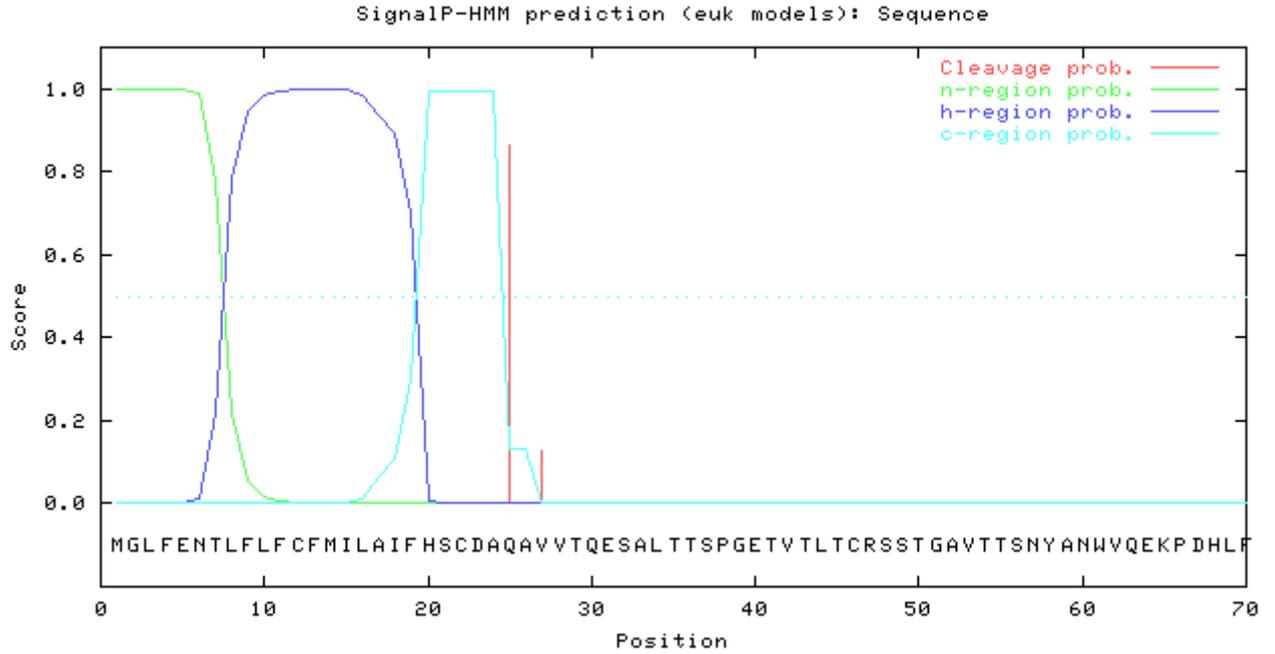
Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	392	0.011	0.019	0.988	0.021	S	1	24
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			

Predizione di taglio del PS:

SignalP



```
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 25 0.951 0.32 YES
max. Y 25 0.892 0.33 YES
max. S 12 0.979 0.87 YES
mean S 1-24 0.923 0.48 YES
D 1-24 0.908 0.43 YES
# Most likely cleavage site between pos. 24 and 25: CDA-QA
```



>Sequence

Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 0.997

Signal anchor probability: 0.003

Max cleavage site probability: 0.865 between pos. 24 and 25

ProP

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 24 and 25: CDA-QA

SIG-PRED

Sequence origin

Eukaryote

Possible cleavage positions

Position	Site	Score
21 22	FLFCFMILAIHFS CD	7.1
24 25	CFMILAIHFHSCDA QA	9.2

Most likely signal peptide and its passenger peptide

1 MGLFENTLFLF 11 CFMILAIHFS 21 CDA | QAVVTQE

PS DI EXTENSIN DI *NICOTIANA TABACUM* [E05393]

Sequenza nucleotidica:

ATGGGGAAAATGGCCTCTCTATTTGCCTCTCTTTTAGTGGTTTTAGTGTCGCTGAGCTTAGCTTCTGAAAGCTCA
GCA

Sequenza amminoacidica: **MGKMASLFASLLVVLVLSLASESSA**

Lunghezza: 26 aa

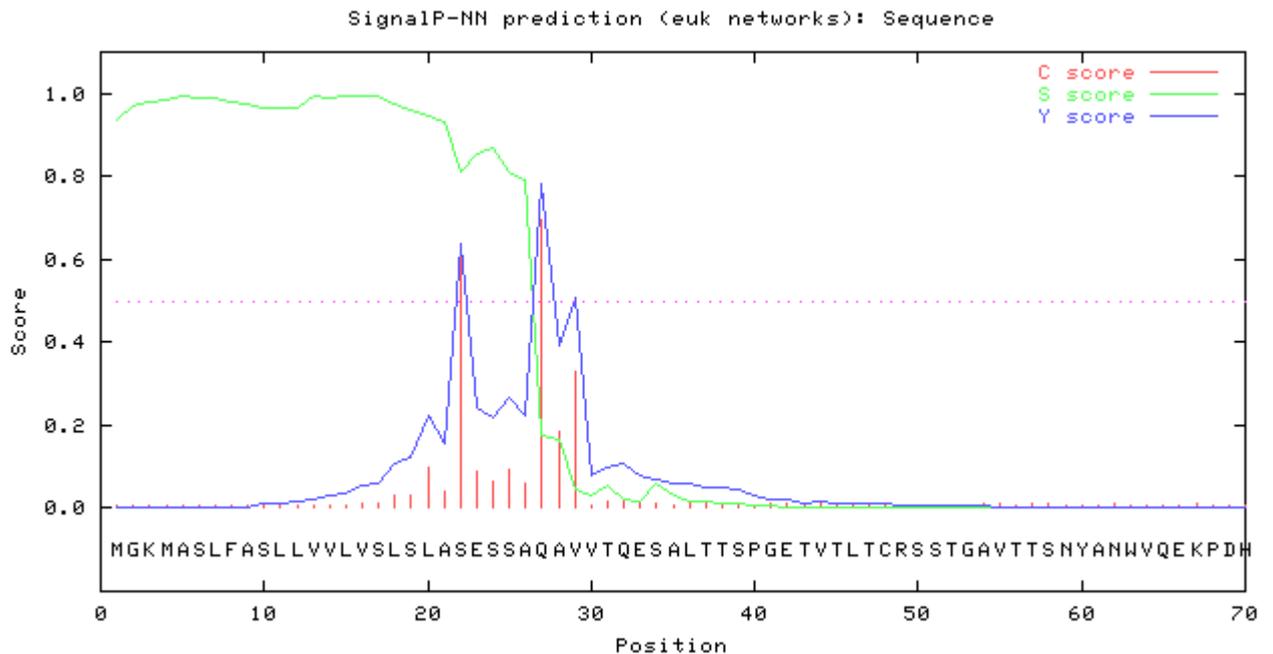
Predizione di targeting subcellulare:

TargetP

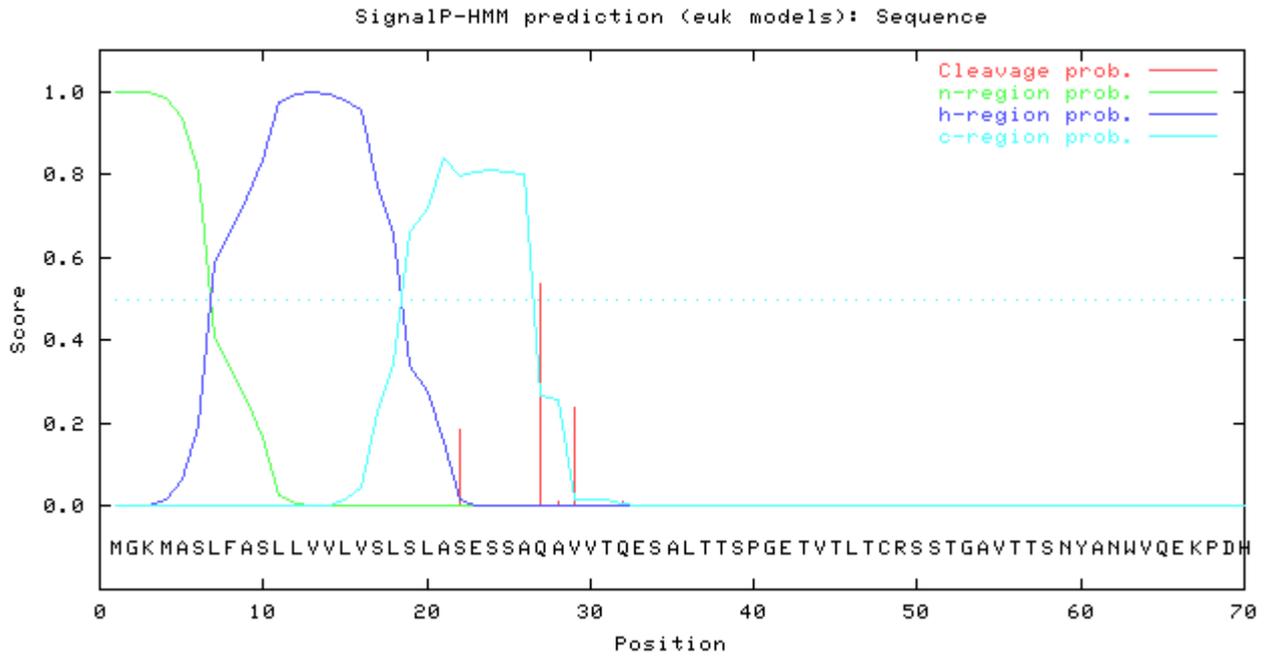
Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	397	0.054	0.013	0.983	0.004	S	1	26
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			

Predizione di taglio del PS:

SignalP 3.0 Server:



```
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 27 0.696 0.32 YES
max. Y 27 0.780 0.33 YES
max. S 17 0.995 0.87 YES
mean S 1-26 0.946 0.48 YES
D 1-26 0.863 0.43 YES
# Most likely cleavage site between pos. 26 and 27: SSA-QA
```



>Sequence

Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 1.000

Signal anchor probability: 0.000

Max cleavage site probability: 0.537 between pos. 26 and 27

ProP

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 26 and 27: SSA-QA

SIG-PRED

Sequence origin

Eukaryote

Possible cleavage positions

Position	Site	Score
21 22	ASLLVVLVSLSLA SE	10.4
23 24	LLVVLVSLSLASE SS	7.8
24 25	LVVLVSLSLASES SA	8.9
26 27	VLVSLSLASESSA QA	10.8

Most likely signal peptide and its passenger peptide

1 MGKMASLFASL 11 LVVLVSLSLA 21 SESSA | QAVVT

Origine della sequenza			PS	TargetP			SignalP-NN	SignalP-HMM		SigPred
Proteina	Organismo	GenBank#	n° aa	SP	RC	TPlen	Clv. site	Clv. site	Score	Clv. site
Ig (ott)	<i>Mus musculus</i>	-	19	0,851	2	19	19-20	19-20	0,893	19-20
Ig (ott2)	<i>Mus musculus</i>	-	19	0,586	3	19	19-20	19-20	0,946	19-20
PR1a (PRP)	<i>Nicotiana tabacum</i>	D90196	30	0,959	1	30	30-31	30-31	0,574	30-31
PR1b (PRP)	<i>Nicotiana tabacum</i>	D90197	30	0,955	1	32	30-31	30-31	0,513	30-31
Legumin B	<i>Vicia faba</i>	X03677	22	0,978	1	24	24-25	22-23	0,705	22-23
GluA-3	<i>Oryza sativa</i>	X54313	24	0,988	1	26	26-27	24-25	0,684	24-25
GluB-4	<i>Oryza sativa</i>	AF537221	24	0,978	1	24	24-25	24-25	0,743	24-25
Prolamin (10KDa)	<i>Oryza sativa</i>	X84649	24	0,982	1	26	26-27	26-27	0,710	24-25
Prolamin (RP6)	<i>Oryza sativa</i>	X65064	19	0,915	2	19	19-20	21-22	0,560	19-20
Basic 7S globulin	<i>Glycine max</i>	D16107	24	0,977	1	26	26-27	26-27	0,821	29-30
Acidic endochitinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_122314	22	0,961	1	24	24-25	24-25	0,678	27-28
P14 (PRP)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	A22637	24	0,988	1	24	24-25	24-25	0,865	24-25
Extensin	<i>Nicotiana tabacum</i>	E05393	26	0,983	1	26	26-27	26-27	0,537	26-27

Tabella 4.2 Sommario dei risultati dell'analisi bioinformatica per i PS selezionati (vedi testo)

I dati ottenuti per i 12 peptidi segnale analizzati oltre a PSott sono stati raccolti nella Tabella 4.2 per una più immediata visualizzazione e interpretazione. Per ogni PS sono stati riportati:

- il nome della proteina e dell'organismo di origine e il numero di accessione della sequenza nucleotidica depositata in banca dati (se disponibile);
- la lunghezza della sequenza amminoacidica;

- i parametri ottenuti dall'analisi con TargetP (SP: punteggio di predizione per la presenza di una sequenza tipo peptide segnale; RC: punteggio di affidabilità della predizione, 1 è ottimale; TPlen: lunghezza della sequenza predetta);
- il sito di taglio (Clv. site) previsto da uno degli algoritmi di SignalP (NN);
- il sito di taglio previsto dal secondo algoritmo di SignalP (HMM) con relativo punteggio (non è una vera probabilità);
- il sito di taglio previsto da SigPred.

Come si può vedere, l'analisi di alcuni peptidi segnale con diversi software dà come risultato valori discordanti fra loro riguardo la lunghezza del PS rilevato; ciò accade quando vengono rilevati più potenziali siti di taglio. Sono stati scartati tutti i peptidi segnale per cui vi erano discordanze fra le predizioni dei vari algoritmi e la lunghezza teorica della sequenza (celle evidenziate in arancio scuro). Sono stati quindi valutati i PS rimanenti in base ai punteggi di probabilità e affidabilità della previsione forniti da ciascun programma; nuovamente, PS con punteggi mediocri sono stati scartati (celle evidenziate in arancio chiaro). È stata scelta come PS ottimale la sequenza appartenente alla proteina P14 di *Lycopersicon esculentum*, ribattezzata "PSlyc".

4.2 PROGETTAZIONE E REALIZZAZIONE DI COSTRUTTI VETTORIALI

4.2.1 I COSTRUTTI A DISPOSIZIONE

Le sequenze nucleotidiche codificanti le quattro forme di minibody erano già state sintetizzate precedentemente a questa tesi e clonate all'interno del vettore di espressione pSTART (cfr. § 3.2.17). Poiché queste sequenze erano state create per l'espressione in tabacco, le triplette scelte per codificare ciascun amminoacido erano state ottimizzate sulla base delle preferenze codoniche riscontrate in piante dicotiledoni (De Amicis e Marchetti, 2000).

I quattro costrutti a disposizione sotto forma di glycerol stock sono i seguenti:

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Va_nos
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Vb_nos
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Vc_nos
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Vd_nos

Dove:

- 35S_{LLTCK} è il promotore derivato da CaMV in cui la sequenza 5'-UTR nativa è stata sostituita con il leader artificiale LLTCK (cfr. § 3.2.17)
- PSott è il peptide segnale di Ig murina presente nella sequenza originale dei minibody
- Va è la forma di minibody codificante per V_L-V_H-mC_{H3}-9aa
- Vb è la forma di minibody codificante per V_L-V_H-mC_{H3}
- Vc è la forma di minibody codificante per V_L-V_H-hC_{H3}-9aa
- Vd è la forma di minibody codificante per V_L-V_H-hC_{H3}
- nos è il terminatore della nopalina sintasi di *A. tumefaciens*

Di seguito sono riportati i siti di restrizione presenti nella cassetta di espressione base per le 4 forme di vaccino, utilizzati per le operazioni di biologia molecolare impiegate in questa tesi (Figura 4.6).

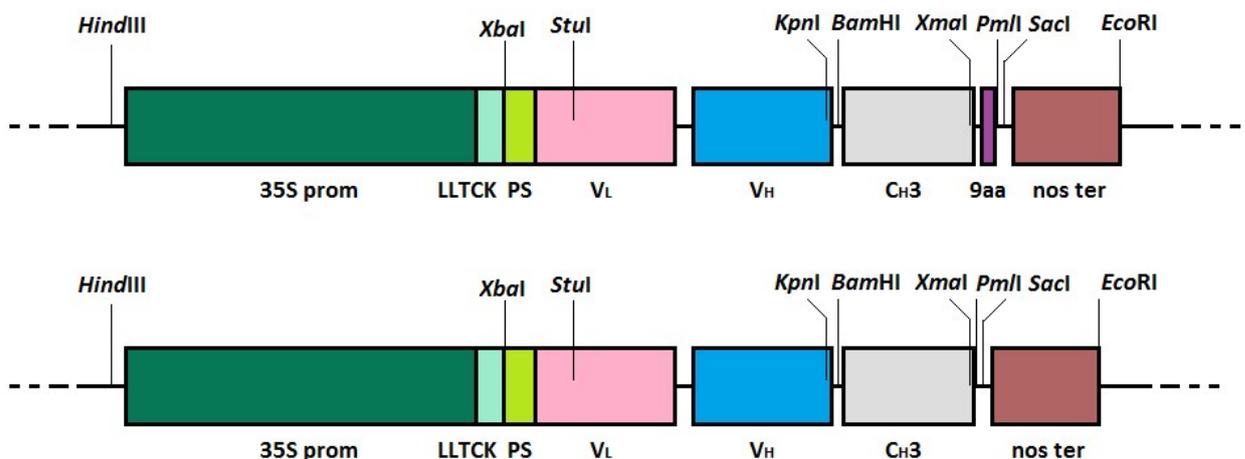


Figura 4.6 Rappresentazione grafica della cassetta di espressione base per minibody; in evidenza i siti di restrizione importanti per il lavoro di manipolazione dei costrutti. In alto la struttura generica per Va e Vc (portanti il nonamero), in basso per Vb e Vd

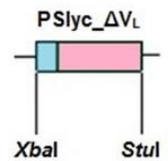
Dai glycerol stock disponibili per i quattro costrutti di partenza sono state effettuate miniprep, la cui concentrazione è stata misurata tramite Nanodrop®:

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Va_nos: 20.21 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Vb_nos: 31.89 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Vc_nos: 28.41 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Vd_nos: 39.86 ng/μL

4.2.2 SOSTITUZIONE DI PSOTT CON PSLYC

Per la creazione della sequenza codificante PSlyc (cfr. § 4.1.4) è stata scelta la sintesi da parte di una ditta esterna (GeneArt) di una sequenza corrispondente al PS con in coda un frammento della regione codificante per V_L (ΔV_L). La lunghezza della sequenza, pari a 224 bp, è tale da permettere la sua manipolazione con normali procedure di biologia molecolare (il solo PSlyc conta 72 bp ed è di difficile gestione). A monte del peptide segnale è stato introdotto un sito di restrizione per *Xba*I per permettere la sua clonazione nel vettore di destinazione. La porzione di V_L inclusa termina comprendendo un sito di restrizione per *Stu*I, già presente nella sequenza originale.

*Xba*I 5' **TCTAGA**ATGGGGTTATTTCGAAAACACATTGTTTCTCTTTTGTTCATGATATTAGCCATATTTCA
PSlyc CTCTTGTGACGCTCAAGCTGTTGTGACTCAAGAATCAGCTCTGACCACCTCTCCCTGGTGAGACTGTG
ΔV_L ACTCTGACTTGCAGGTCCCTCCACTGGTGTGACTTCCAACATATGCTAACTGGGTTCAAGAGA
*Stu*I AGCCTGATCACCTGTTACAGGCCT3'



Il plasmide ottenuto, pGA_PSlyc_ΔV_L, è stato introdotto in *E. coli* tramite elettroporazione. Delle colonie ottenute che apparivano bianche alla selezione tramite IPTG/X-Gal, 4 sono state inoculate in LB-broth per effettuare successive miniprep, poi quantificate al Nanodrop®.

- pUC57_PSlyc_ΔV_L 1: 351.11 ng/μL
- pUC57_PSlyc_ΔV_L 2: 347.25 ng/μL
- pUC57_PSlyc_ΔV_L 3: 335.78 ng/μL
- pUC57_PSlyc_ΔV_L 4: 328.62 ng/μL

L'effettiva presenza del plasmide di interesse nelle colonie scelte è stata verificata tramite PCR mediante primer forward (fatto sintetizzare ad hoc) che appaia con le prime 20 bp di PSlyc, comprendente anche il sito *Xba*I, e primer reverse che appaia sul primo tratto di V_L. Amplificato atteso: 205 bp. Tutte le colonie sono risultate positive (Figura 4.7). La colonia 2 è stata salvata mediante glycerol stock ed utilizzata per le operazioni successive.

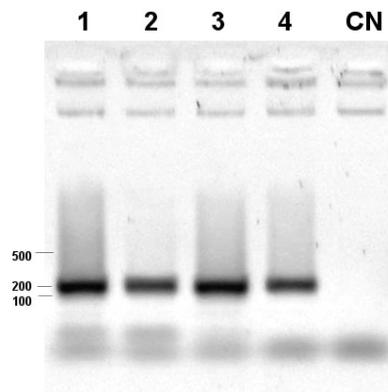


Figura 4.7 PCR di controllo per pGA_PSlyc_ΔV_L

È stata quindi effettuata la sostituzione di PSott con PSlyc nel costrutto pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Va_nos. È stata allestita una digestione enzimatica dei costrutti mediante *XbaI* e *StuI*. Poiché il sito *StuI* non è unico in pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Va_nos (poiché è presente in due punti, uno nella regione V_L e uno nel backbone), è stata ricercata una digestione parziale mediante un tempo di incubazione ridotto.

Profilo di restrizione atteso per pGA_PSlyc_ΔV_L (digestione completa):

- 3202 bp + 220 bp

Il profilo di restrizione atteso per pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Va_nos è dovuto a un'insieme dei frammenti derivati dalla digestione completa e parziale del costrutto:

- 8034 bp + 5871 bp + 205 bp per una digestione completa
- 13905 bp + 205 bp per una digestione parziale dall'esito desiderato
- 8239 bp + 5871 bp per una digestione parziale dall'esito non desiderato

Viene ricercato per pGA_PSlyc_ΔV_L il frammento a 220 bp, corrispondente a PSlyc_ΔV_L, e per pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Va_nos una banda a 13905 bp, data dalla digestione parziale che estrude solamente il pezzo da 205 bp (corrispondente a PSott_ΔV_L). I due frammenti sono stati recuperati da gel, purificati tramite kit Promega e quantificati al Nanodrop®.

- PSlyc_ΔV_L: 5.5 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_ΔVa_nos: 9.2 ng/μL

È stata effettuata una ligation con i frammenti purificati; il vettore ottenuto pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos è stato clonato in *E. coli* JM101. Delle colonie ottenute, 2 sono state inoculate per ottenere miniprep.

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos 1A: 85.11 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos 1B: 74.65 ng/μL

Le miniprep sono state saggiate mediante digestione enzimatica *XbaI* + *SacI*, per verificare la presenza della sequenza d'interesse e la corretta lunghezza del vettore. Profilo di restrizione atteso:

- 12914 bp + 1211 bp (tratto corrispondente al minibody intero)

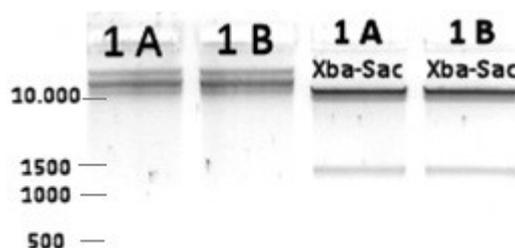


Figura 4.8 Digestione di controllo per pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos
A sinistra le miniprep non digerite

Le colonie ottenute mostrano il profilo di digestione corretto (Figura 4.8). Le colonie 1A e 1B sono state inviate alla ditta Primm per un controllo tramite sequenziamento; entrambe sono risultate corrette. La colonia 1A è stata conservata mediante glycerol stock e utilizzata per i passaggi successivi.

È stato quindi ottenuto correttamente il costrutto pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos, in cui la sequenza PSlyc è stata sostituita a PSott (Figura 4.9).

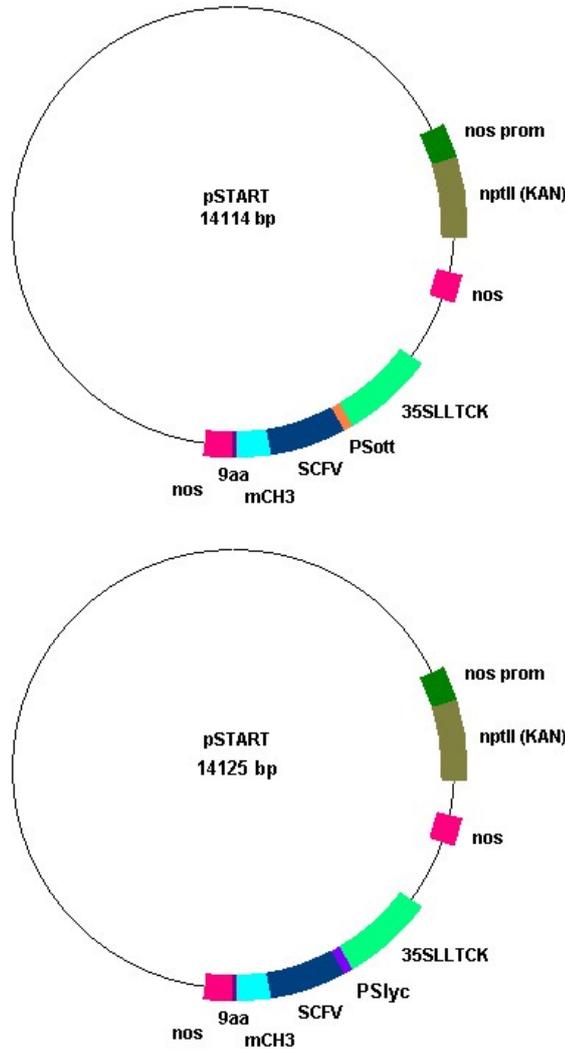


Figura 4.9 Rappresentazione grafica dei costrutti pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Va_nos (a sinistra) e pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos (a destra)

È stata quindi effettuata la sostituzione di PSott con PSlyc anche nei rimanenti costrutti. È stata allestita una digestione enzimatica *Bam*HI+*Sac*I in modo da sostituire nel costrutto pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos il tratto corrispondente a mC_H3-9aa (caratteristico di Va) con mC_H3, hC_H3-9aa e hCH3 rispettivamente per Vb, Vc e Vd. Profilo di restrizione atteso:

- 13730 bp + 395 bp per pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos
- 13715 bp + 359 bp per pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Vb_nos

- 13715 bp + 395 bp per pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Vc_nos
- 13715 bp + 359 bp per pSTART_35S_{LLTCK}_PSott_Vd_nos

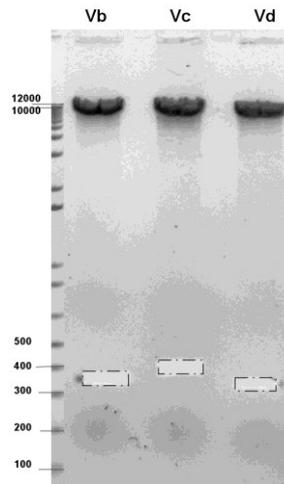


Figura 4.10 Digestione di Vb, Vc e Vd; sono evidenziati i punti di recupero della banda a basso PM da gel: si noti la differenza della forma Vc, che presenta il nonamero

Viene ricercato per PSlyc_Va il frammento ad alto peso molecolare, corrispondente al vettore, e per Vb, Vc e Vd il frammento a basso peso corrispondente alla regione terminale codificante per il minibody. Le bande corrette sono state recuperate da gel (Figura 4.10), purificate con kit Promega e quantificate al Nanodrop®.

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_V_L-V_H_nos: 15.2 ng/μL
- ΔVb (mC_{H3}): 7.5 ng/μL
- ΔVc (hC_{H3}-9aa): 6.9 ng/μL
- ΔVd (hC_{H3}): 6.8 ng/μL

È stata effettuata una ligation con i frammenti purificati; i vettori ottenuti pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb_nos, pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc_nos e pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vd_nos sono stati clonati in *E. coli* JM101. Delle colonie ottenute, 2 per ciascun costrutto sono state inoculate per ottenere miniprep, poi quantificate al Nanodrop®.

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb_nos 1: 47.23 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb_nos 2: 39.52 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc_nos 1: 39.73 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc_nos 2: 40.12 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vd_nos 1: 42.13 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vd_nos 2: 38.98 ng/μL

Le miniprep sono state saggate mediante PCR con primer specifici per la regione terminale del minibody corrispondente al C_{H3} murino o umano, per verificare la presenza della sequenza d'interesse. Amplificato atteso: 378 bp.

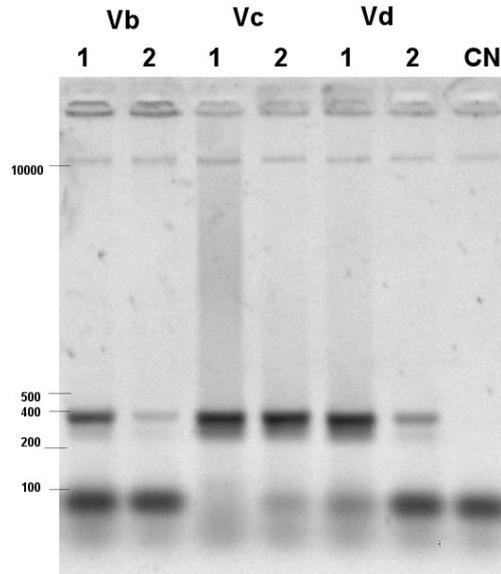


Figura 4.11 PCR di controllo per PSlyc Va, Vb e Vc

Le colonie ottenute mostrano l'amplificato atteso (Figura 4.11). Per ciascun costrutto la colonia 1 è stata conservata mediante glycerol stock.

Sono stati ottenuti i costrutti pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb_nos, pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc_nos e pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vd_nos.

4.2.3 TRASFORMAZIONE DI *A. TUMEFACIENS* CON I COSTRUTTI PORTANTI PSLYC

I quattro costrutti portanti PSlyc sono stati trasferiti in *A. tumefaciens* EHA105 tramite elettroporazione. Delle colonie cresciute, una per ciascun costrutto è stata inoculata su substrato liquido per effettuare una miniprep, poi quantificata tramite Nanodrop®.

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos 1 da EHA105: 25.06 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb_nos 1 da EHA105: 27.88 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc_nos 1 da EHA105: 25.59 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vd_nos 1 da EHA105: 19.56 ng/μL

Per saggiare la positività delle colonie di EHA105 è stata effettuata una prova di PCR con primer per amplificare il tratto corrispondente al minibody. Amplificato atteso: 991 bp per Va e Vb; 978 bp per Vc e Vd. Tutte e quattro le colonie sono risultate positive (Figura 4.12). I ceppi così ottenuti sono stati conservati mediante glycerol stock e utilizzati per le successive trasformazioni.

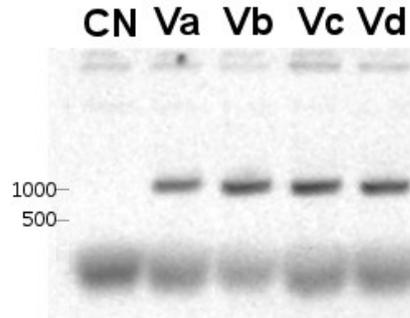


Figura 4.12 PCR di controllo per colonie di agrobatterio portanti PSlyc

4.2.4 INSERZIONE DEL SEGNALE DI RITENZIONE NEL RETICOLO ENDOPLASMICO KDEL

Al fine di valutare la miglior localizzazione subcellulare del vaccino, si è deciso di creare un costrutto che portasse una regione codificante la sequenza di ritenzione di proteine nel reticolo endoplasmico (KDEL) a valle della CDS del minibody. Come prototipo per l'introduzione della sequenza KDEL è stata scelta la forma Va. Le triplette migliori per codificare KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) sono state scelte con lo stesso criterio di ottimizzazione utilizzato in precedenza per la riscrittura delle CDS per le quattro forme di minibody (cfr. § 4.2.1); la sequenza risultante è **AAG-GAT-GAG-CTG**. Inoltre, poiché il minibody di tipo Va termina con la sequenza nonamero, il cui ultimo amminoacido è Lys (K), è stato sufficiente aggiungere la sequenza codificante per il tripeptide Asp-Glu-Leu: **VQGEESNDK** → **VQGEESNDKDEL**.

Di seguito è riportata la sequenza codificante per l'ultimo tratto di Va, modificato con l'aggiunta del segnale di ritenzione nell'ER.

...**CCCGGGAAG**GGTGGTTCA**GTTCAAGGTGAAGAATCCAATGACAAG****GATGAGCTG****TGAACACGTG**...
 ΔmC_H3 microlinker nonamero **KDEL** stop PmII

Data la brevità della sequenza da introdurre, si è scelto di attuare una serie di PCR sequenziali (Figura 4.13) con primer disegnati ad hoc piuttosto che richiedere a una ditta esterna la sintesi di un tratto più lungo (come avvenuto invece per PSlyc, cfr. § 4.2.2). È stata utilizzata una DNA polimerasi ad alta fedeltà (AccuTaq).

Sono stati quindi disegnati un primer forward (V_Hend_FOR) che appaia alla fine della CDS di V_H, e due primer reverse, il primo dei quali (1KDEL REV) appaia parzialmente con la fine della CDS di Va e inserisce una prima parte di KDEL; il secondo (2KDEL REV) appaia parzialmente con l'amplificato generato dal primo primer reverse e aggiunge la restante parte di sequenza. Di seguito sono riportati la sequenza originale (senza KDEL) con affiancati i primer KDEL disegnati ad hoc:

```

stampo      ...CCCGGGAAGGGTGGTTCAGTTCAAGGTGAAGAATCCAATGACAAGTGAACACGTGTGAATTACA...
1KDEL REV  GAATCCAATGACAAGGATGAGCT
2KDEL REV  ATGACAAGGATGAGCTGTGAACACGTG

1KDEL REV  5' -GAATCCAATGACAAGGATGAGCT          23 nt
2KDEL REV  5' -ATGACAAGGATGAGCTGTGAACACGTG     27 nt
    
```

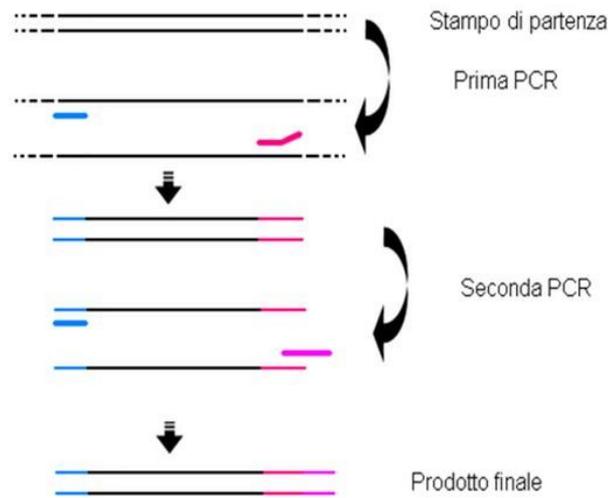


Figura 4.13 Schema rappresentante le 2 PCR sequenziali

Dopo aver allestito la prima reazione di PCR, l'amplicato corrispondente è stato purificato mediante kit Promega e utilizzato come stampo per la seconda PCR.

Amplificato atteso 1° PCR (VHend FOR + 1KDEL REV): 452 bp

Amplificato atteso 2° PCR (VHend FOR + 2KDEL REV): 463 bp

Parte dei due amplicati ottenuti è stata quindi visualizzata in gel di agarosio per verificarne la qualità (Figura 4.14).

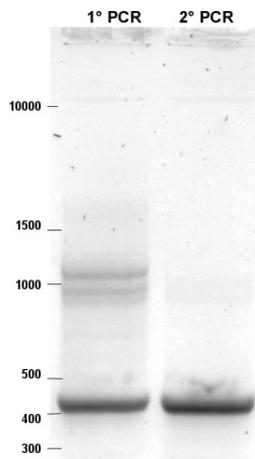


Figura 4.14 1° e 2° PCR allestite per inserire KDEL in Va

Nonostante la prima PCR abbia dato qualche amplicato secondario (Figura 4.14), la seconda PCR mostra una banda unica predominante all'altezza corretta. La 2° PCR è stata quindi caricata completamente in gel di agarosio e la banda corrispondente all'amplicato desiderato è stata recuperata e purificata tramite kit Promega. Per permettere quindi una clonazione in pGEM®-T, è stata allestita una reazione di A-tailing. Si è quindi potuto procedere con l'inserzione dell'amplicato nel vettore tramite ligation e clonazione in *E. coli* JM101, per ottenere il costrutto pGEM®-T_ΔV_H_mC_H3_9aa-KDEL. La trasformazione è avvenuta in condizioni di selezione mediante IPTG e X-Gal, e delle colonie bianche ottenute 6 sono state saggiate mediante PCR su colonia.

PCR effettuata con primer M13 FOR e REV (cfr. § 3.2.17). Amplificato atteso:

- 235 bp per vettore richiuso senza inserto
- 698 bp (235 bp + 463 bp) per vettore con inserto pGEM[®]-T_ΔV_H_mC_H3_9aa-KDEL

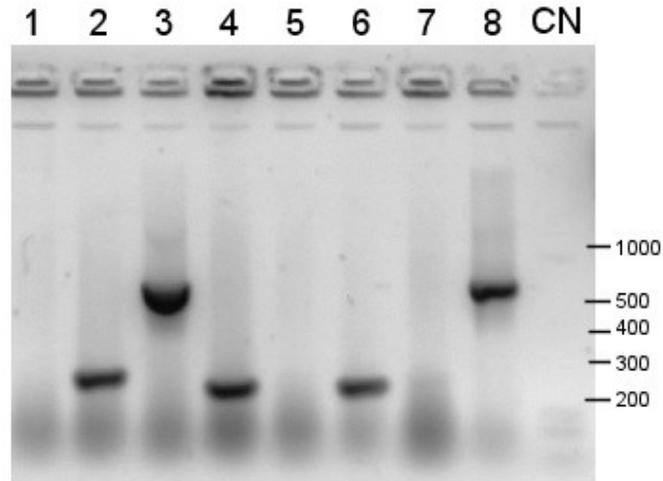


Figura 4.15 PCR su colonia per pGEM[®]-T_ΔV_H_mC_H3_9aa-KDEL

Le colonie n° 3 e 8 (Figura 4.15) presentano l'amplificato atteso. Entrambe sono state inoculate in LB-broth per ottenere una miniprep; le due miniprep sono state inviate a una ditta esterna (Primm) per essere controllate tramite sequenziamento. La colonia n° 8 è risultata corretta; è stata quindi conservata tramite glycerol stock e utilizzata per le operazioni successive.

È stato quindi trasferito il frammento ΔV_H_mC_H3_9aa-KDEL da pGEM[®]-T nel vettore di destinazione pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos. È stata effettuata una digestione enzimatica *KpnI*-*PmlI*. Prima del caricamento in gel di agarosio, il vettore pSTART è stato sottoposto a trattamento con fosfatasi alcalina. Profilo di restrizione atteso:

- 13.730 bp + 395 bp per pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos
- 3008 bp + 404 pb per pGEM[®]-T_ΔV_H_mC_H3_9aa-KDEL

I frammenti corrispondenti al vettore per pSTART e all'inserto per pGEM[®]-T sono stati recuperati da gel, purificati con kit Promega e quantificati al Nanodrop[®].

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_VL-ΔV_H_nos: 12.4 ng/μL
- ΔV_H_mC_H3_9aa-KDEL: 8.8 ng/μL

È stata effettuata una ligation con i frammenti purificati; il vettore risultante pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos è stato clonato in *E. coli* JM101. Delle colonie ottenute, 4 sono state inoculate per ottenere miniprep, poi quantificate al Nanodrop[®].

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos a1: 35.32 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos a2: 40.46 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos a3: 36.65 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos a4: 35.47 ng/μL

Le miniprep ottenute sono state controllate mediante PCR, con primer FOR specifico per mC_H3 e 2KDEL REV come primer REV. Amplificato atteso: 388 bp.

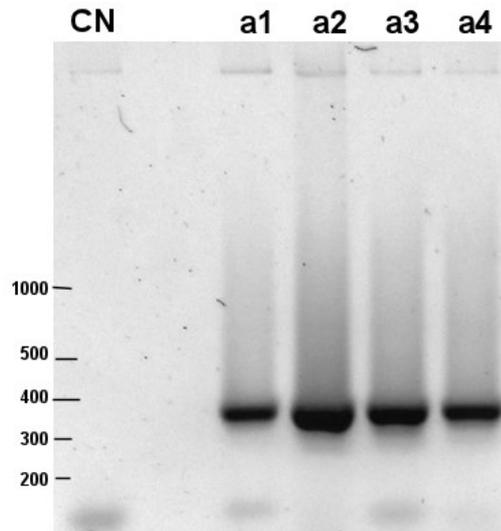


Figura 4.16 PCR di controllo per pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos

Tutte e quattro le colonie mostrano l'amplificato atteso. In questo caso il controllo negativo utilizzato è stato pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos: la mancanza di amplificato assicura la specificità della reazione per la sequenza correttamente portante KDEL. La colonia 1a è stata conservata mediante glycerol stock. È stato quindi ottenuto il vettore pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos (Figura 4.17).

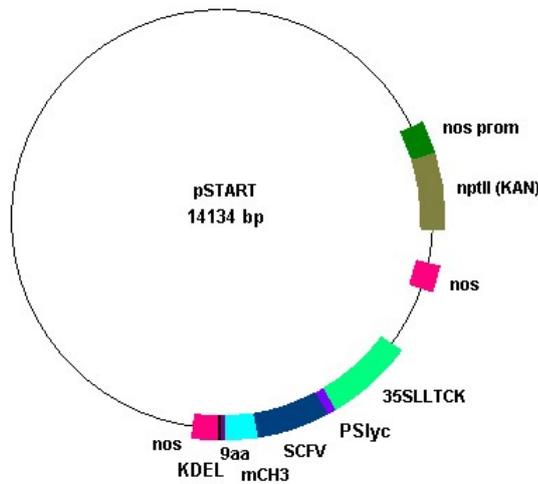


Figura 4.17 Rappresentazione del vettore pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos

4.2.5 TRASFORMAZIONE DI *A. TUMEFACIENS* CON pSTART_35S_{LLTCK}_PSLYC_Va-KDEL_NOS

Il costrutto pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos è stato inserito in *A. tumefaciens* EHA105 tramite elettroporazione. Due delle colonie ottenute sono state inoculate in LB-broth per effettuare una miniprep, poi quantificata tramite Nanodrop®.

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos 1 da EHA105: 22.08 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos 2 da EHA105: 25.84 ng/μL

Per saggiare la positività delle colonie di EHA105 è stata effettuata una prova di PCR con primer per amplificare il tratto corrispondente alla zona iniziale del minibody. Come controllo positivo è stata utilizzata la miniprep da *E. coli*. Amplificato atteso: 418 bp

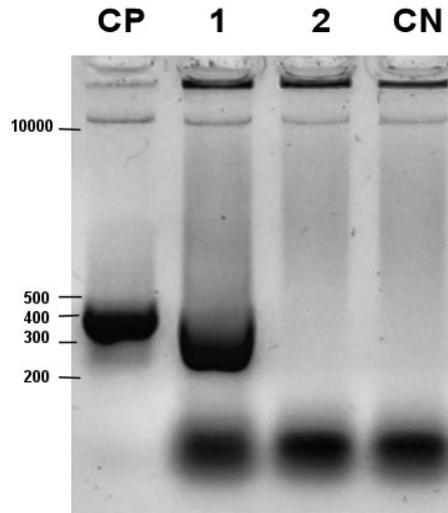


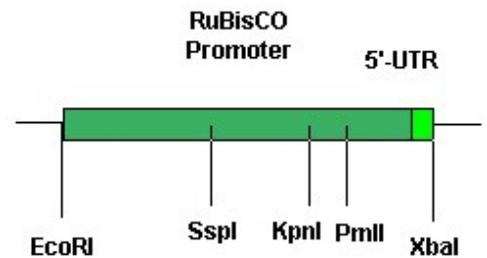
Figura 4.18 PCR da *A. tumefaciens* per pSTART_35S_{LTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos

La colonia n° 1 presenta l'amplificato atteso (Figura 4.18); le bande corrispondenti presentano un artefatto a "smile" (cfr. § 3.2.7).

4.2.6 SOSTITUZIONE DEL PROMOTORE 35S CON IL PROMOTORE RBS IN pSTART

La sequenza nucleotidica del promotore del gene della subunità piccola della proteina RuBisCO di *Chrisantemum morifolium* L. (qui chiamata RBSnat), riportata di seguito, era già stata isolata precedentemente a questa tesi, ma adattata a un contesto vettoriale diverso.

EcoRI **GAATTC**CAGACAAACACCCCTTGTTATACAAAGAATTTTCGCTTTACAAAATCAAATTCGAGAAAATA
 ATATATGCACTAAATAAGATCATTTCGGATCCAATCTAACCAATTACGATACGCTTTGGGTACACTT
 GATTTTTGTTTCAGTGGTTACATATATCTTGTTTTATATGCTATCTTTAAGGATCTGCACAAAGAT
 TATTTGTTGATGTTCTTGATGGGGCTCAGAAGATTTGATATGATACACTCTAATCTTTAGGAGATA
 CCAGCCAGGATTATATTCAGTAAGACAATCAAATTTTACGTGTTCAAACCTCGTTATCTTTTCATTC
SspI AAAGGATGAGCCAGAATCTTTATAGAATGATTGCAATCGAGAATATGTTTCGGCCGATATGCCTTTG
 TTGGCTTCAATATTTCTACATATCACACAAGAATCGACCGTATTGTACCCTCTTTCCATAAAGGAAA
 ACACAATATGCAGATGCTTTTTTCCCACATGCAGTAACATATAGGTATTCAAAAATGGCTAAAAGA
 AGTTGGATAACAAATTGACAACATTTCCATTTCTGTTATATAAATTTCACAAACACACAAAAGCCC
 GTAATCAAGAGTCTGCCCATGTACGAAATAACTTCTATTATTTGGTATTGGGCCTAAGCCAGCTC
KpnI AGAGTACGTGGGGGTACCACATATAGGAAGGTAAC
 AAAATACTGCAAGATAGCCCCATAACGTACCAGCC
PmlI TCTCCTTACCACGAAGAGATAAGATATAAGACCCA
 CCCTGCCACGTGTCACATCGTCATGGTGGTTAATG
PmlI ATAAGGGATTACATCCTTCTATGTTTGTGGACATG
 ATGCATGTAATGTCATGAGCCACAGGATCCAATGG
 CCACAGGAACGTAAGAATGTAGATAGATTTGATTT
Leader TGTCGTTAGATAGCAAACAACATTATAAAAGGTG
nativo TGTATCAATAGGAACTAATTCACCTCATTGGATTCA
XbaI TAGAAGTCCATTCTCCTAAGTATCTAAATCTAGA



Il promotore RBSnat era incluso nel vettore pGA_RBSnat, conservato tramite glycerol stock. È stato quindi effettuato un inoculo in terreno liquido ed è stata allestita una miniprep, quantificata al Nanodrop®.

- pGA_RBSnat 186.33 ng/μL

Per poter utilizzare RBSnat in sostituzione del promotore 35S_{LTCK} nel vettore pSTART, è necessario sostituire il sito *EcoRI* posto al 5' della sequenza con il sito *HindIII*. Sono stati quindi disegnati primer ad hoc in modo da poter eliminare il sito di restrizione indesiderato e inserire al suo posto *HindIII* (AAGCTT).

Sequenza originale: ...GAATTCAGACAAACACCCCTTGTATACAAAG...

HindRBS FOR: 5' - AAGCTTAGACAAACACCCCT 20bp

XbaRBS REV: 3' - CATTCCTCCTAAGTATCTAAATCTAGA

5' -TCTAGATTTAGATACTTAGGAGGAATG 27 bp

È stata allestita una reazione di PCR utilizzando i primer sopra descritti; l'amplificato atteso è di 1010 bp. È stata utilizzata una Taq ad alta fedeltà.

Una parte del prodotto di PCR è stato visualizzato in gel di agarosio; verificata la correttezza dell'amplificato e l'assenza di contaminazioni (Figura 4.19), l'amplificato restante è stato visualizzato in gel di agarosio, recuperato e purificato mediante kit Promega.

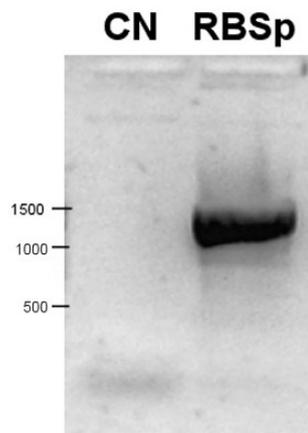


Figura 4.19 PCR per la creazione di *HindIII*-RBSnat-*XbaI*

Per permettere quindi una clonazione dell'amplificato in pGEM®-T, è stata allestita una reazione di A-tailing. Si è quindi potuto procedere con l'inserzione dell'amplificato nel vettore tramite ligation e clonazione in *E. coli* JM101, per ottenere il costrutto pGEM®-T_*HindIII*-RBSnat-*XbaI*. La trasformazione è avvenuta in condizioni di selezione mediante IPTG e X-Gal, e delle colonie bianche ottenute 10 sono state saggate mediante PCR su colonia. Come controllo positivo è stato utilizzato il costrutto pGA_RBSprom.

PCR effettuata con primer M13 FOR e REV (cfr. § 3.2.16). Amplificato atteso:

- 235 bp per vettore richiuso senza inserto
- 1245 bp (235 bp + 1010 bp) per vettore con inserto pGEM®-T_*HindIII*-RBSnat-*XbaI*

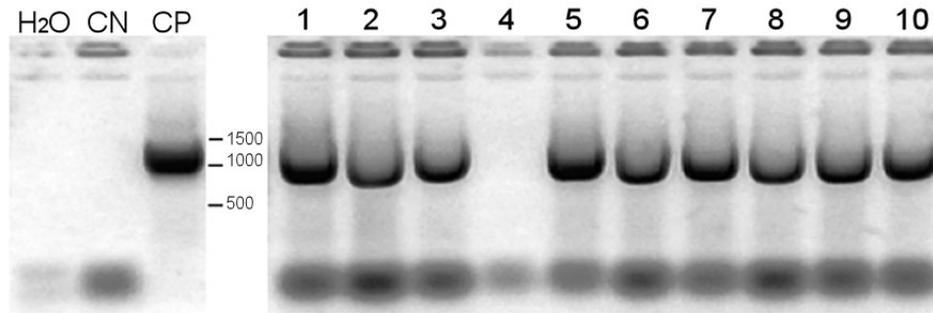


Figura 4.20 PCR su colonia per pGEM[®]-T_*Hind*III-RBSnat-*Xba*I

Delle colonie che hanno mostrato l'amplificato atteso (tutte tranne la n° 4) (Figura 4.20), quattro (1, 2, 3 e 5) sono state inoculate in substrato liquido per effettuare una miniprep, poi quantificata al Nanodrop[®].

- pGEM[®]-T_*Hind*III-RBSnat-*Xba*I 1: 349.76 ng/μL
- pGEM[®]-T_*Hind*III-RBSnat-*Xba*I 2: 347.53 ng/μL
- pGEM[®]-T_*Hind*III-RBSnat-*Xba*I 3: 343.23 ng/μL
- pGEM[®]-T_*Hind*III-RBSnat-*Xba*I 4: 328.83 ng/μL

Le quattro colonie scelte sono quindi state inviate alla ditta Primm per essere controllate tramite sequenziamento. La colonia n° 5 presenta una sequenza perfetta, è stata perciò conservata tramite glycerol stock e utilizzata per le procedure successive. È stato ottenuto il costrutto pGEM[®]-T_*Hind*III-RBSnat-*Xba*I.

Il vettore base pSTART (d'ora in poi chiamato pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos, per meglio evidenziare le componenti della sua cassetta di espressione), era già presente sotto forma di miniprep, ma è disponibile anche in glycerol stock.

Per effettuare la sostituzione del promotore 35S_{LLTCK} di pSTART con RBSnat, è stata allestita una digestione enzimatica *Hind*III-*Xba*I. Prima del caricamento in gel di agarosio, il vettore pSTART è stato sottoposto a trattamento con fosfatasi alcalina. Profilo di restrizione atteso:

- 13893 bp + 921 bp per pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos
- 3006 bp + 1004 bp per pGEM[®]-T_*Hind*III-RBSnat-*Xba*I

Sono stati recuperati il frammento ad alto peso molecolare per pSTART e quello a basso peso molecolare (corrispondente a RBSnat) per pGEM[®]-T. I frammenti sono stati purificati con kit Promega e quantificati al Nanodrop[®].

- pSTART_Δ_GUS_nos: 11.8 ng/μL
- *Hind*III-RBSnat-*Xba*I: 5.0 ng/μL

È stata effettuata una ligation con i frammenti purificati; il vettore risultante pSTART_RBSnat_GUS_nos è stato clonato in *E. coli* JM101. Su 8 colonie ottenute è stata effettuata una PCR su colonia, con primer che appaiano all'inizio e alla fine della sequenza RBSnat. Come controllo positivo è stato utilizzato il vettore pGEM[®]-T_*Hind*III-RBSnat-*Xba*I. Amplificato atteso: 1010 bp.

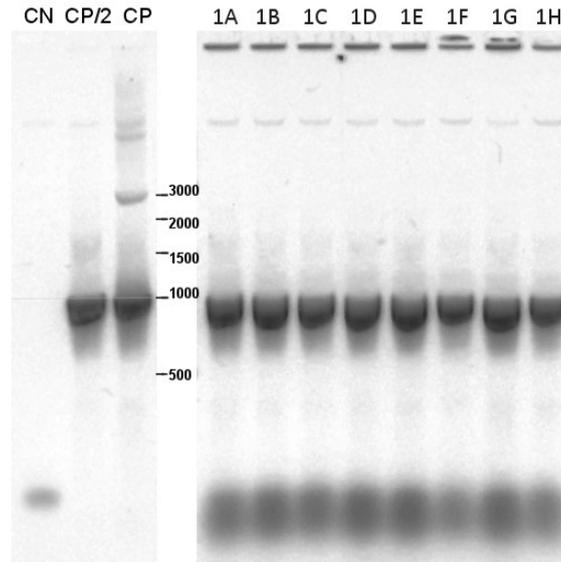


Figura 4.21 PCR su colonia per pSTART_RBSnat_GUS_nos
CP/2: miniprep CP utilizzata come stampo in quantità minore; in CP si nota una banda a ~3000 bp corrispondente al vettore stampo (pGEM[®]-T_ *Hind*III-RBSnat-*Xba*I)

Delle colonie che hanno mostrato l'amplificato atteso (Figura 4.21), quattro (1A, 1B, 1C e 1D) sono state inoculate in terreno liquido per effettuare una miniprep, poi quantificata al Nanodrop[®].

- pSTART_RBSnat_GUS_nos 1A: 40.2 ng/ μ L
- pSTART_RBSnat_GUS_nos 1B: 36.8 ng/ μ L
- pSTART_RBSnat_GUS_nos 1C: 35.7 ng/ μ L
- pSTART_RBSnat_GUS_nos 1D: 39.6 ng/ μ L

Le miniprep ottenute sono state ulteriormente controllate tramite digestione enzimatica *Hind*III-*Xba*I. Profilo di restrizione atteso:

- 13893 bp + 1004 bp

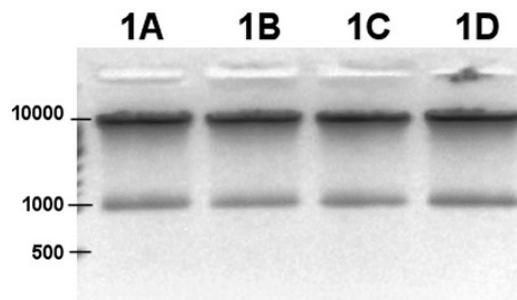


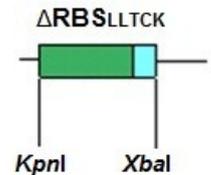
Figura 4.22 Digestioni di controllo per pSTART_RBSnat_GUS_nos

Tutte e quattro le colonie testate mostrano il profilo di restrizione atteso (Figura 4.22); la colonia 1A è stata conservata mediante glycerol stock e utilizzata per le operazioni successive. È stato ottenuto il vettore pSTART_RBSnat_GUS_nos.

4.2.7 CREAZIONE DI RBS_{LLTCK} E CLONAZIONE IN pSTART

Per la sostituzione della regione 5'UTR nativa del promotore RBS con il leader artificiale LLTCK non si è potuto ricorrere a un sistema di PCR sequenziali data la lunghezza della porzione da sostituire. È stato quindi fatto sintetizzare dalla ditta GeneArt un frammento lungo 345 bp e comprendente la parte terminale del promotore RBS dal sito *PmlI* in poi, con l'avvenuta sostituzione leader nativo → LLTCK. Di seguito è riportata la sequenza sintetizzata.

KpnI GGTACCACATATAGGAAGGTAACAAAATACTGCAAGATAGCCCCATAACGTA
 CCAGCCTCTCCTTACCACGAAGAGATAAGATATAAGACCCACCCTGCCACGT
PmlI GTCACATCGTCATGGTGGTTAATGATAAGGGATTACATCCTTCTATGTTTTGT
 GGACATGATGCATGTAATGTCATGAGCCACAGGATCCAATGGCCACAGGAAC
 GTAAGAATGTAGATAGATTTGATTTTGTCCGTTAGATAGCAAACAACATTAT
LLTCK AAAAGGTGTGTATCAATTATTTTTACAACAATACCAACAACAACAACAACA
XbaI ACAACATTACAATTACGTATTTCTCTCTCTAGA



La sequenza $\Delta\text{RBS}_{\text{LLTCK}}$ è stata sintetizzata e clonata in un vettore pGA, arrivato in forma liofilizzata e risospeso a una concentrazione di 100 ng/ μL . Per effettuare la sostituzione della sequenza leader nel vettore pSTART_RBSnat_GUS_nos è stata allestita una digestione enzimatica *KpnI-XbaI*. Prima del caricamento in gel di agarosio, il vettore pSTART è stato sottoposto a trattamento con fosfatasi alcalina. Profilo di restrizione atteso:

- 14569 bp + 328 bp per pSTART_RBSnat_GUS_nos
- 3087 bp + 335 bp per pGA_ $\Delta\text{RBS}_{\text{LLTCK}}$

Sono stati recuperati da gel il frammento ad alto peso molecolare per pSTART e quello a basso peso molecolare per pGA (corrispondente a $\Delta\text{RBS}_{\text{LLTCK}}$). I frammenti sono stati purificati con kit Promega e quantificati al Nanodrop®.

- pSTART_ $\Delta\text{RBS}_{\text{LLTCK}}$ _GUS_nos: 15.21 ng/ μL
- $\Delta\text{RBS}_{\text{LLTCK}}$: 7.35 ng/ μL

È stata effettuata una ligation con i frammenti purificati; il vettore risultante pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_nos è stato clonato in *E. coli* JM101. Su 4 delle colonie ottenute è stata effettuata una PCR su colonia, con primer che appaiano all'inizio e alla fine della sequenza RBS_{LLTCK} (primer REV specifico per leader sintetico). Amplificato atteso: 1017 bp.

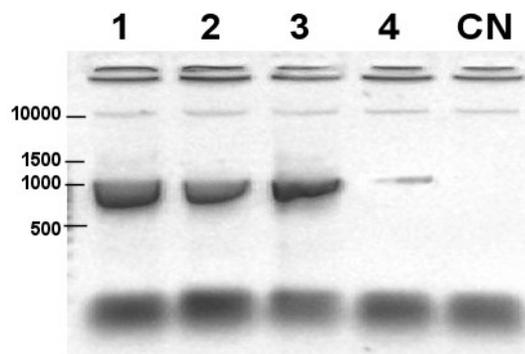


Figura 4.23 PCR su colonia per pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_nos

Le colonie n° 1, 2 e 3 mostrano sicuramente l'amplificato atteso; la colonia 4 presenta una banda all'altezza corretta ma molto debole. Le colonie 1 e 2 sono state inoculate in terreno liquido per effettuare una miniprep, poi quantificata al Nanodrop®.

- pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_nos 1: 30.20 ng/μL
- pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_nos 2: 29.75 ng/μL

Le miniprep ottenute sono state ulteriormente controllate tramite digestione enzimatica *KpnI-XbaI*. Profilo di restrizione atteso:

- 14569 bp + 335 bp

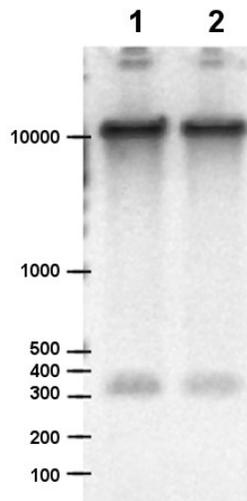


Figura 4.24 Digestione di controllo per pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_nos

Entrambe le colonie hanno dato il profilo di restrizione atteso. La colonia n° 1 è stata conservata mediante glycerol stock e utilizzata nelle procedure successive. È stato ottenuto il costrutto pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_nos.

È stato effettuato un ulteriore controllo per verificare e comparare i tre costrutti pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos, pSTART_RBS_{nat}_GUS_nos e pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_nos tramite una digestione con *HindIII* e *SnaBI*. *HindIII* possiede un sito di riconoscimento unico in tutti e tre i costrutti posizionato a monte del promotore. Il sito per *SnaBI* si trova all'interno della CDS per GUS, ma un secondo sito è presente a livello di leader LLTCK (quindi in due dei tre costrutti *SnaBI* taglia due volte). Profilo di restrizione atteso:

- pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos: 13479 bp + 909 bp + 426 bp
- pSTART_RBS_{nat}_GUS_nos: 13479 bp + 1418 bp
- pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_nos: 13479 bp + 999 bp + 426 bp

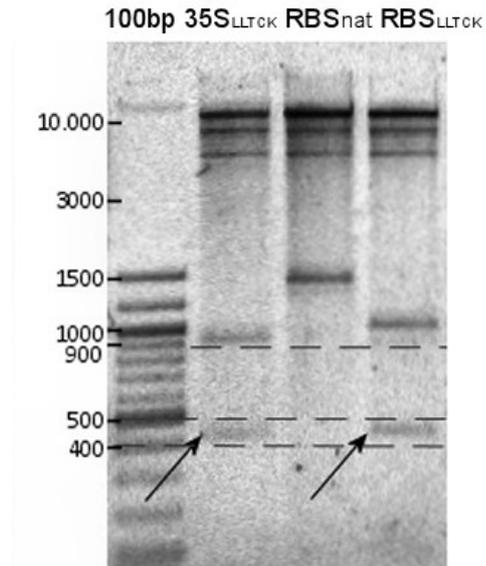


Figura 4.25 Digestione di confronto fra i tre costrutti con diverso promotore

Come si può vedere nella Figura 4.25, tutti e tre i costrutti danno il profilo di restrizione atteso (diverse bande ad alto PM indicano una digestione non completa ma non inficiano i risultati ottenuti); si conferma perciò la loro correttezza.

4.2.8 SOSTITUZIONE DEL TERMINATORE NOS CON RBSTER IN pSTART

La sequenza nucleotidica del terminatore del gene della subunità piccola della proteina RuBisCO di *Chrysanthemum morifolium* L. (qui chiamata RBster), riportata di seguito, era già stata isolata precedentemente a questa tesi, ma adattata a un contesto vettoriale diverso.

<p><u>KpnI</u> <u>PmlI</u> GGTACCCACGTGGTTTTACTATTTACCAAG ACTTTTGAATATTAACCTTCTTGTAAACGAG TCGGTTAAATTTGATTGTTTAGGGTTTTGT ATTATTTTTTTTTTGGTCTTTTAATTCATCA CTTTAATTCCTAATTGTCTGTTTCATTTTCG TTGTTTGTTCGGATCGATAATGAAATGT <u>EcoRV</u> AAGAGATATCATATATAAATAATAAATTGT CGTTTCATATTTGCAATCTTTTTTTTACAA ACCTTAATTAATTGTATGTATGACATTTT CTTCTTGTTATATTAGGGGAAATAATGTTAAATAAAAGTACAAAATAAACTACAGTACATCGTAC TGAATAAATTACCTAGCCAAAAGTACACCTTTCCATATACTTCTTACATGAAGGCATTTTCAACA TTTTCAAATAAGGAATGCTACAACCGCATAATAACATCCACAAATTTTTTTATAAAAATAACATGTC AGACAGTGATTGAAAGATTTTATTATAGTTTCGTTATCTTCTTTCTCATTAAAGCGAATCACTACC TAACACGTCATTTTGTGAAATATTTTTTGAATGTTTTTATATAGTTGTAGCATTCTCTTTTCAA TTAGGGTTTGTGAGATAGCATTTCAGCCGGTTCATACAACCTTAAAGCATACTCTAATGCTGGA AAAAAGACTAAAAATCTTGTAAGTTAGCGCAGAATATTGACCCAAATTATATACACACATGACCC CATATAGAGACTAATTACCTTTTAACCACTAATAATTATTACTGTATTATAACATCTACTAATTA AACCTGTGAGTTTTTGTGCTAGAATTATTATCATATATACTAAAAGGCAGGAACGCAAACATTGCCCC GGTACTGTAGCAACTACGGTAGACGCATTAATTGTCTATAGTGGACGCATTAATTAACCAAACCG <u>BfrI</u> <u>SacI</u> CCTCTTCCCCTTCTTCTTGCTTAAGGAGCTC</p>	
---	--

Il terminatore RBster era incluso nel vettore pGA_RBster, conservato tramite glycerol stock. È stato quindi effettuato un inoculo in terreno liquido ed è stata allestita una miniprep, quantificata al Nanodrop®.

- pGA_RBster: 351.56 ng/μL

Per poter utilizzare RBster in sostituzione del terminatore nos nel vettore pSTART, è necessario rimpiazzare i siti di restrizione ai terminali 5' e 3' della sequenza con siti per *SacI* ed *EcoRI*, rispettivamente. Sono stati quindi disegnati primer ad hoc in modo da poter sostituire i siti di restrizione indesiderati.

Sequenza originale: ...GGTACCCACGTGGTTTTACTATTTACCAAGACTTTTGAATATTAACCTTCTA...
KpnI *PmlI*
 SacRBster FOR: 5' - GAGCTCGTTTTACTATTTACCAAG 24 bp
SacI

Sequenza originale: ...CGCATTAATTAACCAAACCGCCTCTTCCCCTTCTTCTTGCTTAAGGAGCTC...
BfrI *SacI*
 EcoRBster REV: 3' - CTTCCCCTTCTTCTTGAATTC 23 bp
EcoRI
 5' - GAATTC AAGAAGAAGGGGAAAG

È stata allestita una reazione di PCR utilizzando i primer sopra descritti; l'amplificato atteso è di 950 bp. È stata utilizzata una Taq ad alta fedeltà.

Una parte del prodotto di PCR è stato visualizzato in gel di agarosio; verificata la correttezza dell'amplificato e l'assenza di contaminazioni (Figura 4.26), l'amplificato restante è stato visualizzato in gel di agarosio, recuperato e purificato mediante kit Promega.

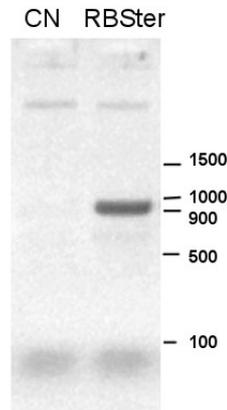


Figura 4.26 PCR per la creazione di *Sacl*-RB*Ste*r-*Eco*RI

Per permettere quindi una clonazione dell'amplificato in pGEM[®]-T, è stata allestita una reazione di A-tailing. Si è quindi potuto procedere con l'inserzione dell'amplificato nel vettore tramite ligation e clonazione in *E. coli* JM101, per ottenere il costrutto pGEM[®]-T_*Sacl*-RB*Ste*r-*Eco*RI. La trasformazione è avvenuta in condizioni di selezione mediante IPTG e X-Gal, e delle colonie bianche ottenute 12 sono state saggiate mediante PCR su colonia.

PCR effettuata con primer M13 FOR e REV (cfr. § 3.2.16). Amplificato atteso:

- 235 bp per vettore richiuso senza inserto
- 1252 bp (235 bp + 1017 bp) per vettore con inserto pGEM[®]-T_*Sacl*-RB*Ste*r-*Eco*RI

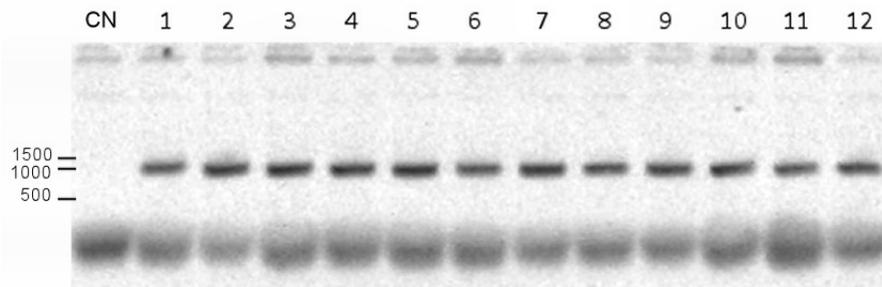


Figura 4.27 PCR su colonia per pGEM[®]-T_*Sacl*-RB*Ste*r-*Eco*RI

Tra le colonie che hanno mostrato l'amplificato atteso (Figura 4.27), quattro (1, 2, 3 e 4) sono state inoculate in substrato liquido per effettuare una miniprep, poi quantificata al Nanodrop[®].

- pGEM[®]-T_*Sacl*-RB*Ste*r-*Eco*RI 1: 208.16 ng/ μ L
- pGEM[®]-T_*Sacl*-RB*Ste*r-*Eco*RI 2: 159.40 ng/ μ L
- pGEM[®]-T_*Sacl*-RB*Ste*r-*Eco*RI 3: 206.43 ng/ μ L
- pGEM[®]-T_*Sacl*-RB*Ste*r-*Eco*RI 4: 174.10 ng/ μ L

Le colonie scelte sono state quindi inviate alla ditta Primm per essere controllate tramite sequenziamento. La colonia n° 1 presenta una sequenza perfetta, è stata perciò conservata tramite glycerol stock e utilizzata per le procedure successive. È stato ottenuto il costrutto pGEM[®]-T_ *SacI*-RB*Ste*r-*Eco*RI.

Per effettuare la sostituzione del terminatore nos di pSTART con RB*Ste*r, è stata allestita una digestione enzimatica *SacI*-*Eco*RI. Questa operazione è stata effettuata in parallelo per i tre costrutti pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos, pSTART_RBSnat_GUS_nos e pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_nos. Prima del caricamento in gel di agarosio, i vettori con base pSTART sono stati sottoposti a trattamento con fosfatasi alcalina. Profilo di restrizione atteso:

- 14547 bp + 267 bp per pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos
- 14630 bp + 267 bp per pSTART_RBSnat_GUS_nos
- 14637 bp + 267 bp per pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_nos
- 2962 bp + 940 bp + 48 bp per pGEM[®]-T_ *SacI*-RB*Ste*r-*Eco*RI

Sono stati recuperati i frammenti ad alto peso molecolare per i vettori con base pSTART e quello a basso peso molecolare (corrispondente a RB*Ste*r) per pGEM[®]-T. I frammenti sono stati purificati con kit Promega e quantificati al Nanodrop[®].

- pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos: 7.15 ng/μL
- pSTART_RBSnat_GUS_nos: 9.65 ng/μL
- pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_nos: 5.08 ng/μL
- *SacI*-RB*Ste*r-*Eco*RI: 8.33 ng/μL

È stata effettuata una ligation con i frammenti purificati; il vettori risultanti pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_RB*Ste*r, pSTART_RBSnat_GUS_RB*Ste*r e pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_RB*Ste*r sono stati clonati in *E. coli* JM101. Su alcune colonie ottenute è stata effettuata una PCR su colonia, con primer che appaiano all'inizio e alla fine della sequenza RB*Ste*r. Come controllo positivo è stato utilizzato il vettore pGEM[®]-T_ *SacI*-RB*Ste*r-*Eco*RI. Amplificato atteso: 950 bp.

Diverse colonie hanno mostrato l'amplificato atteso (Figura 4.28). Per ciascun costrutto sono state inoculate due colonie in terreno liquido per effettuare miniprep, successivamente quantificate al Nanodrop[®].

- pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_RB*Ste*r S2: 16.05 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_RB*Ste*r S8: 12.51 ng/μL
- pSTART_RBSnat_GUS_RB*Ste*r N3: 14.70 ng/μL
- pSTART_RBSnat_GUS_RB*Ste*r N4: 14.48 ng/μL
- pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_RB*Ste*r L5: 13.38 ng/μL
- pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_RB*Ste*r L6: 13.20 ng/μL

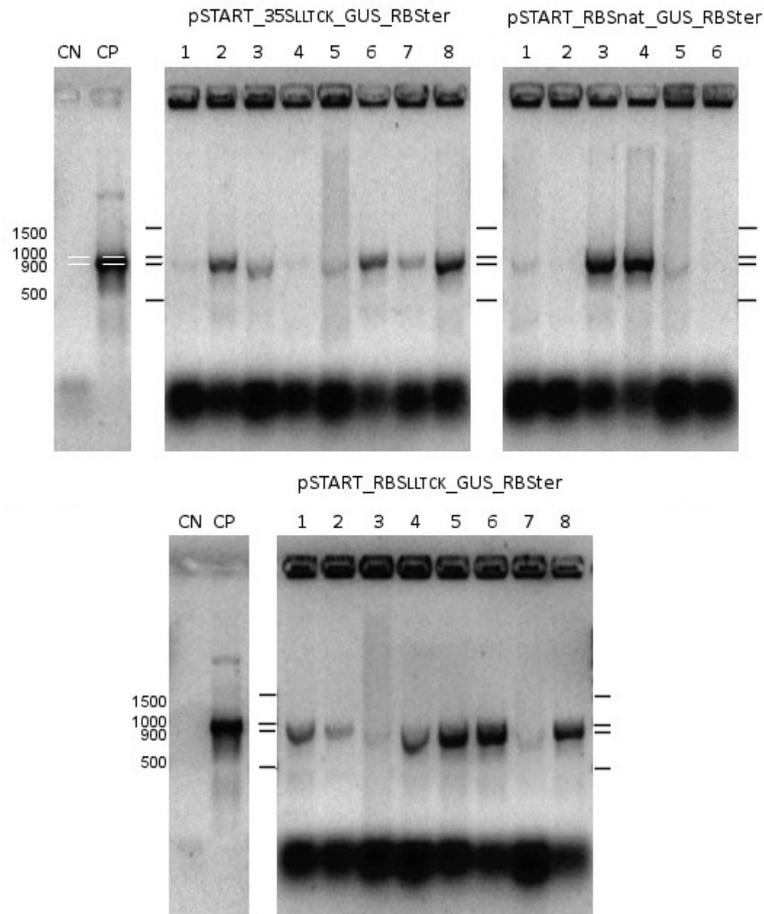


Figura 4.28 PCR su colonia per i costrutti con RBSter

È stata quindi effettuata una digestione enzimatica con *EcoRI* e *SacI* per un ulteriore controllo della presenza dell'inserto e della correttezza dei siti di restrizione utilizzati. Profilo di restrizione atteso:

- 14547 bp + 940 bp per pSTART_35S_{LTCK}_GUS_RBSter
- 14630 bp + 940 bp per pSTART_RBSnat_GUS_RBSter
- 14637 bp + 940 bp per pSTART_RBS_{LTCK}_GUS_RBSter

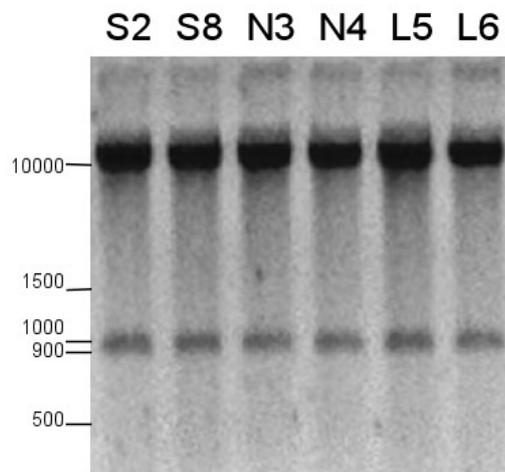


Figura 4.29 Digestione di controllo per i costrutti con RBSter

Tutte le colonie analizzate mostrano il profilo di restrizione atteso (Figura 4.29) e sono quindi corrette. Le colonie S2, N3 e L5 vengono conservate mediante glycerol stock e utilizzate per le operazioni successive. Sono stati ottenuti i costrutti:

- pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_RBster
- pSTART_RBSnat_GUS_RBster
- pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_RBster

4.2.9 TRASFORMAZIONE DI *A. TUMEFACIENS* CON I COSTRUTTI RBS

Il costrutti portanti il promotore e/o il terminatore del gene della subunità piccola di RuBisCo (RBS) di *C. morifolium* ottenuti finora sono stati inseriti in *A. tumefaciens* EHA105 tramite elettroporazione. Due colonie per ciascun costrutto sono state inoculate in LB-broth per effettuare miniprep. Per saggiare la positività delle colonie di EHA105 è stata effettuata una prova di PCR utilizzando primer che appaiano con la regione iniziale della CDS per GUS, regione comune a tutti i costrutti.

Amplificato atteso: 463 bp

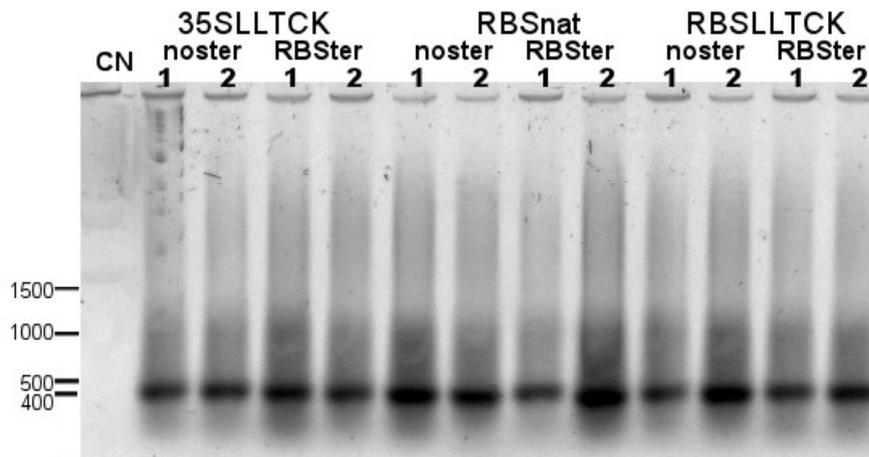


Figura 4.30 PCR di controllo per colonie di *A. tumefaciens*

Tutte le colonie saggate hanno dato l'amplificato atteso (Figura 4.30). La colonia n° 1 per ogni costrutto è stata conservata mediante glycerol stock e utilizzata per le operazioni successive.

4.2.10 INSERIMENTO DELLA CASSETTA DI ESPRESSIONE DI pSTART IN pCAMBIA2300

Per confrontare al meglio il backbone vettoriale della serie pSTART e pCAMBIA, è necessario che la cassetta di espressione di riferimento sia identica fra le due famiglie di costrutti. Per questo si è deciso di trasferire la cassetta di espressione per la β -glucuronidasi di pSTART (35S_{LLTCK}_GUS_nos) in pCAMBIA2300, un vettore della serie pCAMBIA che non contiene geni reporter (cfr. § 3.2.17). Questa operazione può essere effettuata facilmente in quanto pCAMBIA2300 presenta all'interno del T-DNA un sito di clonazione multiplo adatto ad accogliere la cassetta di espressione senza apportare modifiche ai siti di restrizione presenti (Figura 4.31).

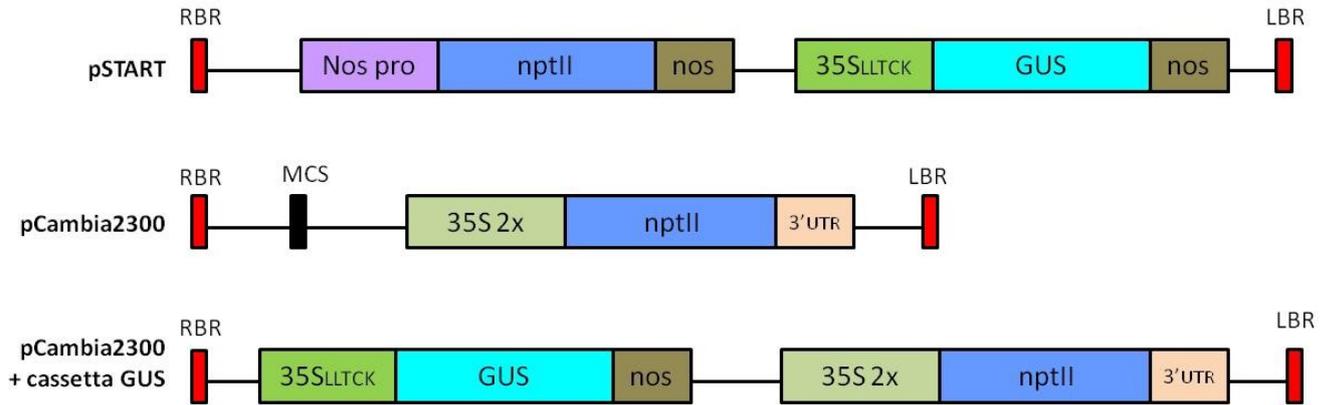


Figura 4.31 Schema rappresentante la conformazione del T-DNA dei vettori pSTART, pCAMBIA2300 e pCAMBIA2300 portante la cassetta di espressione per GUS derivata da pSTART.

Per effettuare lo spostamento della cassetta 35S_{LLTCK}_GUS_nos da pSTART a pCAMBIA2300 è stata allestita una digestione con gli enzimi *Hind*III ed *Eco*RI, che tagliano rispettivamente a monte del promotore 35S_{LLTCK} e a valle del terminatore nos in pSTART; in pCAMBIA entrambi i siti sono presenti nel MCS in modo da permettere un orientamento “testa-coda” delle cassette presenti nel T-DNA di pCAMBIA, come mostrato in Figura 4.31.

Sia pSTART che pCAMBIA2300 sono presenti sotto forma di glycerol stock. Sono state preparate miniprep, quantificate al Nanodrop®.

- pSTART: 35.16 ng/μL
- pCAMBIA2300: 189.07 ng/μL

È stata quindi effettuata una digestione per entrambi i costrutti con gli enzimi *Hind*III e *Eco*RI. Il vettore pCAMBIA2300 è stato sottoposto a trattamento con fosfatasi alcalina prima del caricamento in gel di agarosio. Profilo di restrizione atteso:

- 11.726 bp + 3088 bp per pSTART
- 8691 bp + 51 bp per pCAMBIA2300

Sono stati recuperati il frammento a basso peso molecolare per pSTART, corrispondente alla cassetta di espressione per GUS, e quello ad alto peso molecolare per pCAMBIA2300. I frammenti sono stati purificati con kit Promega e quantificati al Nanodrop®.

- pCAMBIA2300_ *Eco*RI-*Hind*III: 7.2 ng/μL
- *Hind*III-35S_{LLTCK}_gusA_nos-*Eco*RI: 4.0 ng/μL

È stata effettuata una ligation con i frammenti purificati; il vettore risultante pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos è stato clonato in *E. coli* JM101. 4 colonie ottenute sono state inoculate in LB-broth per effettuare miniprep, quantificate al Nanodrop®.

- pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos 1: 193.22 ng/μL
- pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos 2: 212.29 ng/μL
- pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos 3: 166.77 ng/μL
- pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos 4: 174.92 ng/μL

Per verificare la positività e la correttezza delle colonie ottenute è stata allestita una digestione enzimatica *Xba*I-*Sac*I aventi siti unici presenti rispettivamente all'estremità 5' e 3' della CDS di GUS. Profilo di restrizione atteso:

- 9887 bp + 1900 bp

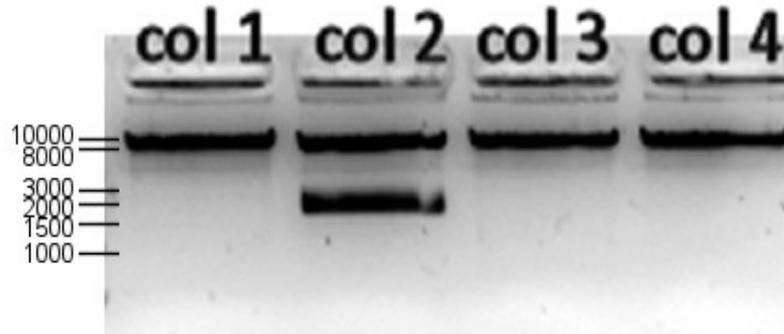


Figura 4.32 Digestioni di controllo per pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos

La colonia n°2 presenta il profilo di restrizione atteso; è stata perciò conservata mediante glycerol stock e utilizzata nelle operazioni successive. È stato ottenuto il costrutto pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos.

4.2.11 TRASFORMAZIONE DI *A. TUMEFACIENS* CON pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_NOS

Il costrutto pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos è stato inserito in *A. tumefaciens* EHA105 tramite elettroporazione. Due colonie per costrutto sono state inoculate in terreno liquido per effettuare miniprep. Per saggiare la positività delle colonie di EHA105 è stata effettuata una digestione enzimatica con *Xba*I-*Sac*I. Profilo di restrizione atteso:

- 9887 bp + 1900 bp

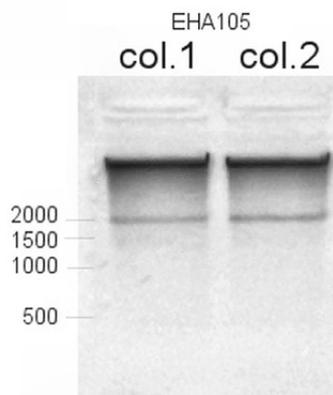


Figura 4.33 Digestione di controllo per pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos in *A. tumefaciens*

Tutte le colonie saggiate hanno dato il profilo di restrizione atteso (Figura 4.33). La colonia n°1 è stata conservata mediante glycerol stock e utilizzata per le operazioni successive.

4.2.12 CREAZIONE DI GUSINTR E SUO INSERIMENTO IN COSTRUTTI PER AGROINFILTRAZIONE

Nella tecnica di trasformazione transitoria mediante agroinfiltrazione il gene codificante per la proteina GUS può essere trascritto e tradotto in parte anche da *A. tumefaciens*, creando un rumore di fondo indesiderato; è stato perciò necessario utilizzare come gene reporter una versione di β -glucuronidasi contenente un introne (GUSintr) la cui ritenzione preclude il corretto funzionamento dell'enzima. Una versione di GUS-intr è presente nel vettore pCAMBIA2301; di seguito è riportata la prima parte di CDS per GUS, contenente la sequenza codificante per l'introne della catalasi di seme di *Ricinus communis*, modificato presso l'istituto Cambia (Castor bean catalase intron, qui abbreviato CBCI).

<u>NcoI</u> / 1° esone	...CCATGGTAGATCTGAGGGTAAATTTCTAGTTTTTCTCCTTCATTTTCTTGTTAGGAC
GUS, sintetico	CCTTTTCTCTTTTTATTTTTTTGAGCTTTGATCTTTCTTTAAACTGATCTATTTTTTAA
CBCI, modificato	TTGATTGGTTATGGTGTAAATATTACATAGCTTTAACTGATAATCTGATTACTTTATTT
	CGTGTGTCTATGATGATGATAGTTACAGAACCGACGACTCGTCCGTCTGTAGAAA
	CCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTTCAGTCTGGATCGCGAA
	AACTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGCAATTGC
2° esone GUS	TGTGCCAGGCAGTTTTAACGATCAGTTCGCCGATGCAGATATTTCGTAATTATGCGGGCA
(parte iniziale)	ACGTCTGGTATCAGCGCGAAGTCTTTATACCGAAAGGTTGGGCAGGCCAGCGTATCGTG
	CTGCGTTTTCGATGCGGTCATCATTACGGCAAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTGAT
	GGAGCATCAGGGCGGCTATACGCCATTTGAAGCCGATGTCACGCCGTATGTTATTGCCG
	GGAAAAGTGTACGTATCA...
<u>SnaBI</u>	

È stata innanzitutto effettuata un'analisi di comparazione fra le due proteine GUS e GUSintr, per valutare la strategia migliore per effettuare l'inserzione di GUSintr nei vettori pSTART; sono state confrontate le sequenze amminoacidiche delle due molecole. Di seguito è riportato uno schema riportante l'allineamento riscontrato tramite analisi con BLASTn (cfr. § 3.1.1).

```

MVDLRNRRLV RPVETPTREIKKLDGLWAFSLDRENCGIDQRWVESALQESRAIAVPGSFNDQFADADIRNYAGNV
WYQREVFI PKGWAGQRIVLRFDAVTHYGKVVNNQEVMEHQGGYTPFEADVTPYVIAGKS VRI TVCVNNELNWQT
I PPGMVI TDENGKKKQSYFHDFNYAGIHRSVMLY TTPNTWVDDITVVTHVAQDCNHASVDWQVVANGDVSVELR
DADQQVVATGQGTSGTLQVVPNLWQPGEGLYEL EVTAKSQTE SDIYPLRVGIRSVAVKQ QQFLINHKPFYFTG
FGRHEDADLRGKGFNDVLMVHDHALMDWIGANSYRTSHYPYAEEMLDWADEHGIVVIDETAAVGF QLSLGIGFEA
GNKPKELYSEEAVNGETQQAHLQAIKELIARDKNHPSVVMWSIANEPDTRPQGAREYFAPLAEATRKLDPTRPIT
CVNVMFCDAHTDTISDLFDVLCNRYYGWYVQSGDLETAEKVLEKELLAWQEKLHQPIIITEYGVDTLAGLHSMY
TDMWSEEYQCAWLDMYHRVFDRVSAVVGEGVWNFADFATSQGILRVGGNKKGI FTRDRPKSAAFLQKRWTGMN
FGEKPQQGGKQ ASHHHHHHV

```

La sequenza amminoacidica rappresentata appartiene a GUSintr (da pCAMBIA2301) (GenBank: AAF65404.1). In grigio sono evidenziate le regioni di appaiamento perfetto fra GUS (da pSTART) e GUSintr; in rosso le sequenze peptidiche presenti solamente in GUSintr; in giallo le sostituzioni amminoacidiche rilevate. Il tripeptide VRI in carattere chiaro mostra la posizione corrispondente al sito *SnaBI* a livello di sequenza nucleotidica.

Si è quindi deciso di procedere sostituendo la porzione iniziale della CDS per GUS con quella di GUSintr (fino al sito *SnaBI*). Per effettuare questo passaggio è stato necessario effettuare la sostituzione del sito di restrizione al 5' della sequenza GUSintr (*NcoI*) con *XbaI*. Sono stati quindi disegnati primer ad hoc.

Sequenza originale: ...**ACACGGGGGACTCC**ATGGTAGATCTGAGG**GTAAATTTCTAGTTTTTCTCCTTCATTTT...**

NcoI

XbaGusi FOR: 5' - **C**TCTAGA**ATGGTAGATCTGAGG** 22 bp

XbaI

Sequenza originale: ...**GGAAAAGTGTACGTATCACCGTTTTGTGTGAACAACGA...**

SnaGUS REV: 3' - **G**TGTACGTATCACCGTTTTG

SnaBI

5' - CAAACGGTGATACGTACAC 19 bp

È stata allestita una reazione di PCR utilizzando i primer sopra descritti; l'amplificato atteso è di 619 bp. È stata utilizzata una Taq ad alta fedeltà.

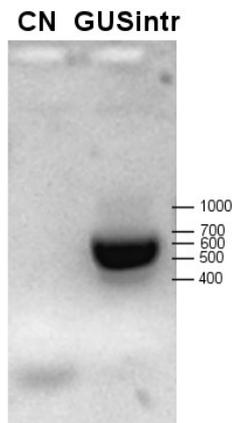


Figura 4.34 PCR per la creazione di Δ GUSintr

Una parte del prodotto di PCR è stato visualizzato in gel di agarosio; verificata la correttezza dell'amplificato e l'assenza di contaminazioni (Figura 4.34), l'amplificato restante è stato visualizzato in gel di agarosio, recuperato e purificato mediante kit Promega.

Per permettere una clonazione dell'amplificato in pGEM[®]-T, è stata allestita una reazione di A-tailing. Si è quindi potuto procedere con l'inserzione dell'amplificato nel vettore tramite ligation e clonazione in *E. coli* JM101, per ottenere il costrutto pGEM[®]-T_ΔGUSintr. La trasformazione è avvenuta in condizioni di selezione mediante IPTG e X-Gal, e delle colonie bianche ottenute 6 sono state saggiate mediante PCR su colonia. Come controllo è stato utilizzato il costrutto pCAMBIA2301, portante GUSintr.

PCR effettuata con primer M13 FOR e REV (cfr. § 3.2.16). Amplificato atteso:

- 235 bp per vettore richiuso senza inserto
- 854 bp (235 bp + 619 bp) per vettore con inserto pGEM[®]-T_HindIII-RBSnat-XbaI
- 619 bp per pCAMBIA2301 (CP)

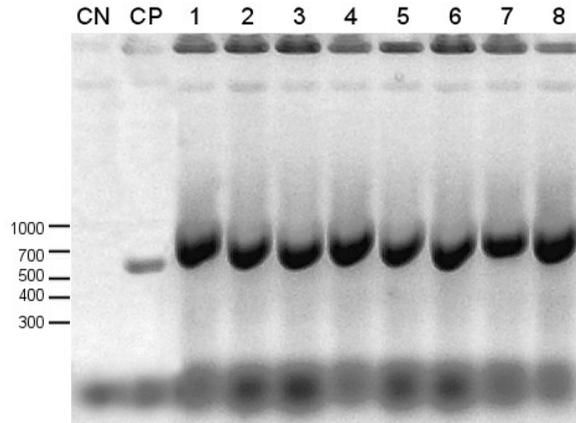


Figura 4.35 PCR su colonia per pGEM[®]-T_ΔGUSintr

Delle colonie che hanno mostrato l'amplificato atteso (Figura 4.35), quattro (1, 2, 3 e 4) sono state inoculate in terreno liquido per effettuare miniprep, poi quantificate al Nanodrop[®].

- pGEM[®]-T_ΔGUSintr 1: 203.55 ng/μL
- pGEM[®]-T_ΔGUSintr 2: 248.71 ng/μL
- pGEM[®]-T_ΔGUSintr 3: 211.08 ng/μL
- pGEM[®]-T_ΔGUSintr 4: 229.56 ng/μL

Le colonie scelte sono quindi state inviate alla ditta Primm per essere controllate tramite sequenziamento. La colonia n° 1 presenta una sequenza perfetta, è stata perciò conservata tramite glycerol stock e utilizzata per le procedure successive. È stato ottenuto il costrutto pGEM[®]-T_ΔGUSintr.

Per effettuare la sostituzione della porzione iniziale di GUS in pSTART con ΔGUSintr, non è possibile effettuare una semplice digestione *Xba*I + *Sna*BI poiché *Sna*BI non ha un unico sito di restrizione in pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos: esiste infatti oltre al sito interno alla CDS per GUS anche un sito di taglio a livello di leader LLTCK. È quindi necessario compiere un passaggio intermedio, sostituendo prima la porzione iniziale di GUS in un vettore senza LLTCK e quindi trasferendo il neoformato GUSintr nella sua interezza, tramite restrizione *Xba*I + *Sac*I. È disponibile in forma di glycerol stock il vettore pUC18_35S_GUS_nos, che porta il promotore 35S con la sequenza leader nativa; è stata quindi effettuata una miniprep di questo costrutto, quantificata al Nanodrop[®].

- pUC18_35S_GUS_nos: 223.01 ng/μL

È stata quindi allestita per entrambi i costrutti pGEM[®]-T_ΔGUSintr e pUC18_35S_GUS_nos una digestione enzimatica *Xba*I + *Sna*BI. Profilo di restrizione atteso:

- 5253 bp + 414 bp per pUC18_35S_GUS_nos
- 3015 bp + 604 bp per pGEM[®]-T_ΔGUSintr

I frammenti ad alto peso molecolare per pUC18 e a basso PM (ΔGUSintr) per pGEM[®]-T sono stati recuperati da gel, purificati con kit Promega e quantificati al Nanodrop[®].

- pUC18_35S_ΔGUS_nos: 25.50 ng/μL
- ΔGUSintr: 11.68 ng/μL

È stata effettuata una ligation con i frammenti purificati; il vettore risultante pUC18_35S_GUSintr_nos è stato clonato in *E. coli* JM101. Su 8 colonie è stata effettuata una PCR su colonia, con i primer utilizzati per modificare GUSintr (amplificano quindi il primo tratto di GUSintr). Come controllo positivo è stato utilizzato il vettore pGEM[®]-T_ΔGUSintr. Amplificato atteso: 619 bp.

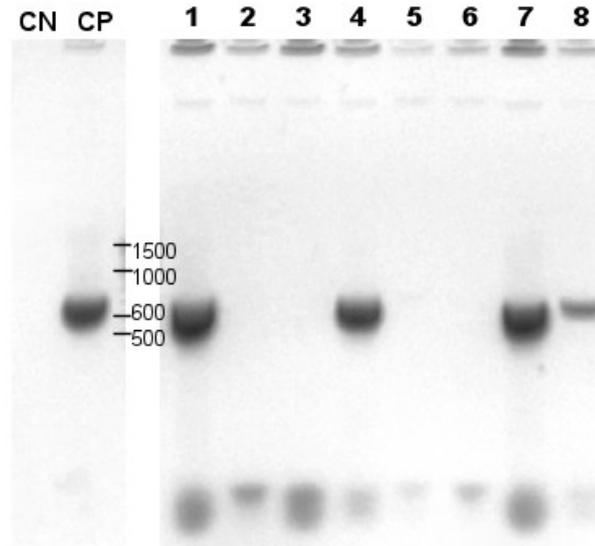


Figura 4.36 PCR su colonia per pUC18_35S_GUSintr_nos

Le colonie 1, 4, 7 e 8 presentano l'amplificato atteso (Figura 4.36), sono state quindi inoculate in LB-broth per l'ottenimento di miniprep, quantificate al Nanodrop[®].

- pUC18_35S_GUSintr_nos 1: 66.04 ng/μL
- pUC18_35S_GUSintr_nos 4: 177.05 ng/μL
- pUC18_35S_GUSintr_nos 7: 200.68 ng/μL
- pUC18_35S_GUSintr_nos 8: 156.10 ng/μL

Sulle miniprep è stata quindi effettuata una digestione enzimatica mediante *Sna*BI e *Xba*II, al fine di controllare ulteriormente la presenza dell'insero e la correttezza dei siti (Figura 4.37).

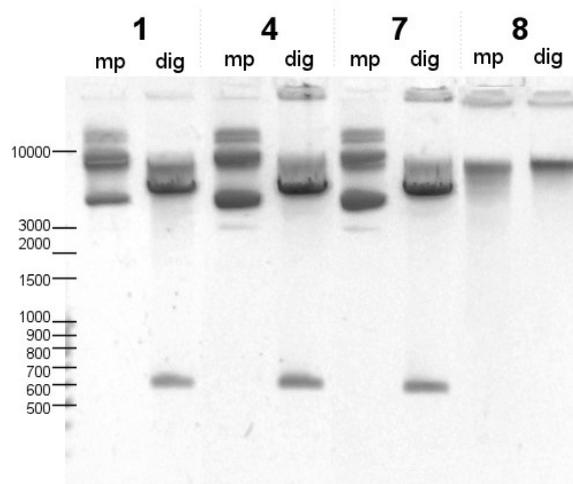


Figura 4.37 Digestioni di controllo per pUC18_35S_GUSintr_nos; per ciascuna colonia sono state caricate la miniprep tal quale (mp) e il prodotto di digestione (dig)

Profilo di restrizione atteso:

- 5253 bp + 604 bp

Le colonie 1, 4 e 7 presentano il profilo corretto. La colonia 1 è stata conservata tramite glycerol stock e utilizzata nelle procedure successive. È stato ottenuto il costrutto pUC18_35S_GUSintr_nos.

È stato quindi trasferito il frammento *Xba*I-GUSintr-*Sac*I da pUC18 nel vettore di destinazione pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos. È stata effettuata una digestione enzimatica *Xba*I-*Sac*I. Prima del caricamento in gel di agarosio, il vettore pSTART è stato sottoposto a trattamento con fosfatasi alcalina. Profilo di restrizione atteso:

- 12914 bp + 1900 bp per pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos
- 3767 bp + 2090 bp per pUC18_35S_GUSintr_nos

I frammenti ad alto peso molecolare per pSTART e a basso peso molecolare (corrispondente a GUSintr) per pUC18 sono stati recuperati da gel, purificati con kit Promega e quantificati al Nanodrop®.

- pSTART_35S_{LLTCK}_Δ_nos: 4.3 ng/μL
- GUSintr: 7.2 ng/μL

È stata effettuata una ligation con i frammenti purificati; il vettore risultante pSTART_35S_{LLTCK}_GUSintr_nos è stato clonato in *E. coli* JM101. È stata quindi effettuata una PCR su colonia con primer specifici per la parte iniziale di GUSintr (gli stessi utilizzati per la sostituzione dei siti nella sequenza). Amplificato atteso: 619 bp.

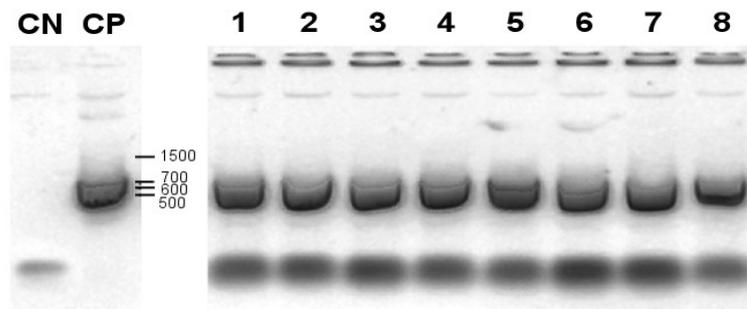


Figura 4.38 PCR su colonia per pSTART_35S_{LLTCK}_GUSintr_nos

Tutte le colonie saggiate presentano l'amplificato atteso (Figura 4.38); di queste 2 sono state inoculate per ottenere miniprep, poi quantificate al Nanodrop®.

- pSTART_35S_{LLTCK}_GUSintr_nos 1: 42.7 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_GUSintr_nos 2: 51.7 ng/μL

Sulle miniprep è stata quindi effettuata una digestione enzimatica mediante *Xba*I e *Sna*BI, al fine di controllare ulteriormente la correttezza dell'inserto; per un ulteriore confronto sono stati digeriti anche i vettori pUC18_35S_GUSintr_nos e pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos. Profilo di restrizione atteso:

- 14388 bp + 604 bp + 12 bp per pSTART_35S_{LLTCK}_GUSintr_nos
- 14388 bp + 414 bp + 12 bp per pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos
- 5253 bp + 604 bp per pUC18_35S_GUSintr_nos

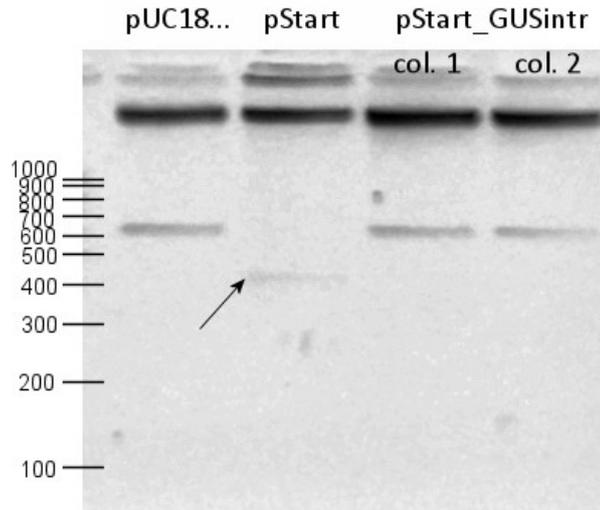


Figura 4.39 Digestione di controllo per GUSintr; i frammenti da 12 bp sono troppo piccoli per poter essere visualizzati in gel di agarosio e vengono persi durante la corsa; questo gel è stato calibrato per risolvere bene frammenti a basso PM ma non ad alto PM, che infatti appaiono appiattiti nella parte alta delle corsie

Tutti i vettori hanno dato il profilo di restrizione atteso; la colonia 1 è stata conservata mediante glycerol stock e utilizzata per le operazioni successive. È stato ottenuto il costrutto pSTART_35S_{LLTCK}_GUSintr_nos.

4.2.13 TRASFORMAZIONE DI *A. TUMEFACIENS* CON COSTRUTTI PORTANTI GUSINTR

I costrutti pSTART_35S_{LLTCK}_GUSintr_nos e pCAMBIA2301 sono stati inseriti in *A. tumefaciens* EHA105 tramite elettroporazione. Per ciascuna trasformazione una colonia è stata inoculata in mezzo liquido per effettuare una miniprep, poi quantificata tramite Nanodrop®.

- pSTART_35S_{LLTCK}_GUSintr_nos 1 da EHA105: 31.65 ng/μL
- pCAMBIA2301: 31.52 ng/μL

Per saggiare la positività delle colonie di EHA105 è stata effettuata una prova di PCR con primer per amplificare il tratto corrispondente alla zona iniziale di GUSintr. Amplificato atteso: 619 bp.

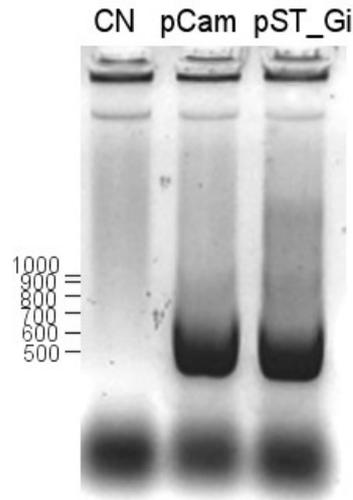


Figura 4.40 PCR di controllo per costrutti con GUSintr in EHA105

Le colonie saggiate presentano l'amplificato atteso (Figura 4.40). La colonia selezionata per ciascun costrutto è stata conservata mediante glycerol stock.

4.2.14 INSERZIONE DELLA SEQUENZA KDEL NEI COSTRUTTI CODIFICANTI Vb, Vc E Vd

In seguito ai risultati ottenuti dalla comparazione dei due costrutti pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos e pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos, si è deciso di inserire la sequenza codificante il segnale di ritenzione nel reticolo endoplasmico (KDEL) anche nei costrutti portanti le varianti di minibody Vb, Vc e Vd.

La prima forma di minibody a essere modificata è stata Vc, che come Va porta la sequenza nonamero su cui è stata costruita la CDS per KDEL (cfr. § 4.2.4). Per ottenere il costrutto desiderato è stato sufficiente sostituire alla porzione codificante il C_{H3} murino di pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos un C_{H3} umano derivato da pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc_nos. È stata quindi allestita per entrambi i costrutti una digestione enzimatica *KpnI* + *XmaI* per isolare i frammenti corrispondenti a mC_{H3} o hC_{H3}. Il vettore digerito pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos è stato sottoposto a trattamento con fosfatasi alcalina prima della visualizzazione in gel di agarosio. Profilo di restrizione atteso:

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos: 13790 bp + 344 bp
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc_nos: 13781 bp + 344 bp

I frammenti ad alto peso molecolare per Va-KDEL e a basso PM per Vc sono stati recuperati da gel, purificati con kit Promega e quantificati al Nanodrop®.

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_V_L-V_H-Δ-KDEL_nos: 9.59 ng/μL
- hC_{H3}: 5.87 ng/μL

È stata effettuata una ligation con i frammenti purificati; il vettore risultante pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc-KDEL_nos è stato clonato in *E. coli* JM101. È stata allestita una PCR su colonia per verificare la presenza di hC_{H3} nelle colonie ottenute mediante primer FOR specifico per mC_{H3} e primer REV appaiante sul KDEL. Come controllo negativo è stato utilizzato il vettore di partenza pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos, che porta C_{H3} murino; come controllo positivo per

verificare il corretto peso molecolare dell'amplificato è stato utilizzato lo stesso pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos, ma utilizzando un primer FOR diverso, specifico per mC_H3.

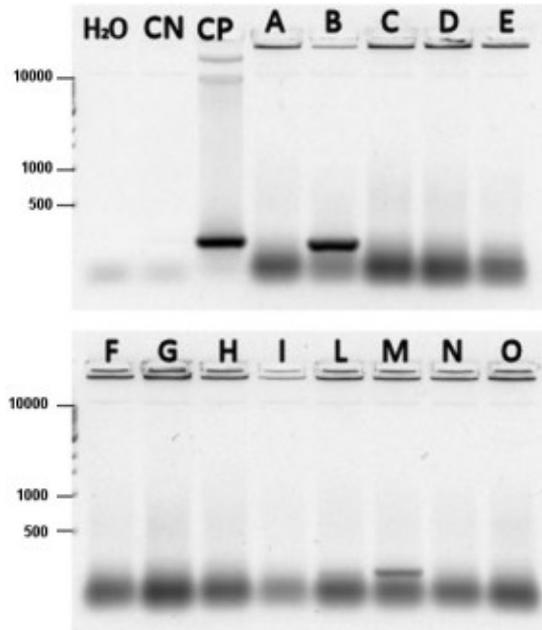


Figura 4.41 PCR su colonia per pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc-KDEL_nos

Le colonie B e M presentano l'amplificato atteso. Data la diversa intensità delle bande riscontrate, si è deciso di effettuare un'ulteriore controllo sulle colonie putativamente positive. Le colonie B e M sono state quindi inoculate in substrato liquido per l'ottenimento di miniprep, quantificate al Nanodrop®.

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc-KDEL_nos B: 32.15 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc-KDEL_nos M: 29.55 ng/μL

Sulle miniprep è stata quindi effettuata una digestione enzimatica mediante *KpnI* e *PmlI*, al fine di controllare ulteriormente la presenza dell'inserto. Profilo di restrizione atteso:

- 13.730 bp + 404 bp

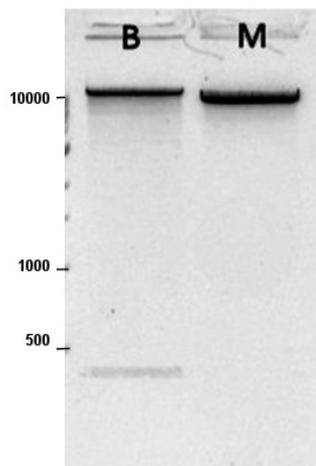


Figura 4.42 Digestioni di controllo per pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc-KDEL_nos

Entrambe le PCR mostrano una banda all'altezza corretta (Figura 4.43). La 2° PCR è stata quindi caricata completamente in gel di agarosio e la banda corrispondente all'amplificato desiderato è stata recuperata e purificata tramite kit Promega. Per permettere quindi una clonazione in pGEM®-T, è stata allestita una reazione di A-tailing. Si è quindi potuto procedere con l'inserzione dell'amplificato nel vettore tramite ligation e clonazione in *E. coli* JM101, per ottenere il costrutto pGEM®-T_ΔV_H_mC_H3-KDEL. La trasformazione è avvenuta in condizioni di selezione mediante IPTG e X-Gal, e delle colonie bianche ottenute 6 sono state saggiate mediante PCR su colonia. PCR effettuata con primer M13 FOR e REV (cfr. § 3.2.16). Amplificato atteso:

- 235 bp per vettore richiuso senza inserto
- 662 bp (235 bp + 427 bp) per vettore con inserto pGEM®-T_ΔV_H_mC_H3-KDEL

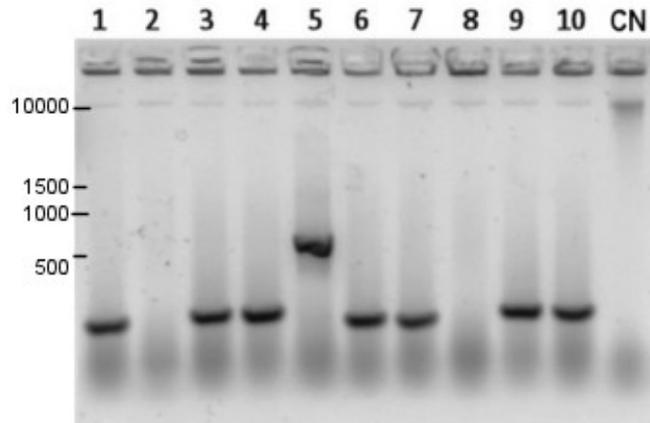


Figura 4.44 PCR su colonia per pGEM®-T_ΔV_H_mC_H3-KDEL

La colonia n° 5 presenta l'amplificato atteso; è stata quindi inoculata in substrato liquido per effettuare una miniprep, quantificata al Nanodrop®.

- pGEM®-T_ΔV_H_mC_H3-KDEL 5: 247.37 ng/μL

La colonia è stata quindi inviata alla ditta Primm per un controllo tramite sequenziamento; la sequenza è risultata corretta. È stato quindi ottenuto il vettore pGEM®-T_ΔV_H_mC_H3-KDEL.

Successivamente è stato trasferito il frammento ΔV_H_mC_H3-KDEL da pGEM®-T nel vettore di destinazione pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb_nos. È stata effettuata una digestione enzimatica *KpnI-PmlI*. Prima del caricamento in gel di agarosio, il vettore pSTART è stato sottoposto a trattamento con fosfatasi alcalina. Profilo di restrizione atteso:

- 13.730 bp + 359 bp per pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb_nos
- 3059 bp + 368 pb per pGEM®-T_ΔV_H_mC_H3-KDEL

I frammenti corrispondenti al vettore per pSTART e all'inserto per pGEM®-T sono stati recuperati da gel, purificati con kit Promega e quantificati al Nanodrop®.

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_VL-ΔV_H_nos: 18.07 ng/μL
- ΔV_H_mC_H3-KDEL: 10.53 ng/μL

È stata effettuata una ligation con i frammenti purificati; il vettore risultante pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb-KDEL_nos è stato clonato in *E. coli* JM101. Delle colonie ottenute, 6 sono state inoculate per ottenere miniprep, poi quantificate al Nanodrop®.

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb-KDEL_nos 1: 35.32 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb-KDEL_nos 2: 40.46 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb-KDEL_nos 3: 36.65 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb-KDEL_nos 4: 32.01 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb-KDEL_nos 5: 32.25 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb-KDEL_nos 6: 35.47 ng/μL

Le miniprep ottenute sono state controllate mediante PCR, con primer FOR specifico per PSlyc e 3KDEL REV come primer REV. Amplificato atteso: 1165 bp.

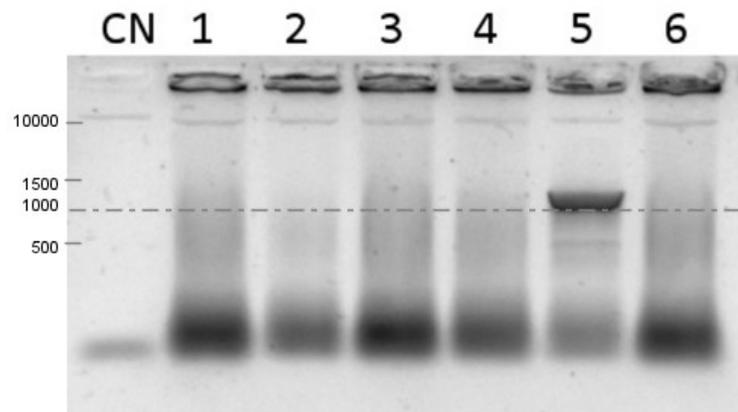


Figura 4.45 PCR di verifica per pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb-KDEL_nos

La colonia n° 5 mostra l'amplificato atteso (Figura 4.45), viene quindi conservata tramite glycerol stock e utilizzata per i passaggi successivi.

Per l'assemblaggio di Vd-KDEL è stata effettuata una procedura simile a quella messa in atto per il passaggio da Va-KDEL a Vc-KDEL, ovvero la sostituzione nel costrutto pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb-KDEL_nos del C_{H3} murino con un C_{H3} umano. È stata quindi allestita una digestione enzimatica *KpnI-XmaI* per isolare le sequenze corrispondenti alle regioni C_{H3}. Un frammento-inserito C_{H3} umano tagliato con gli stessi enzimi era già stato ottenuto precedentemente (formazione di Vc-KDEL). È stato dunque digerito unicamente il vettore pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb-KDEL_nos, sottoposto a incubazione con fosfatasi alcalina prima del carico in gel di agarosio. Profilo di restrizione atteso:

- 13730 bp + 368 bp

La banda ad alto peso molecolare è stata recuperata da gel, purificata mediante kit Promega e quantificata al Nanodrop®.

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_V_L_ΔV_H_KDEL_nos: 9.79 ng/μL

È stata effettuata una ligation con i frammenti purificati; il vettore risultante pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vd-KDEL_nos è stato clonato in *E. coli* JM101. Delle colonie ottenute, 2 sono state inoculate per ottenere miniprep, poi quantificate al Nanodrop®.

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vd-KDEL_nos d1: 44.64 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vd-KDEL_nos d2: 48.60 ng/μL

Le miniprep ottenute sono state controllate mediante PCR, con primer FOR che appaia nella zona V_H e 3KDEL REV come primer REV. Amplificato atteso: 675 bp. Come controllo positivo è stato utilizzato il vettore pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb-KDEL_nos.

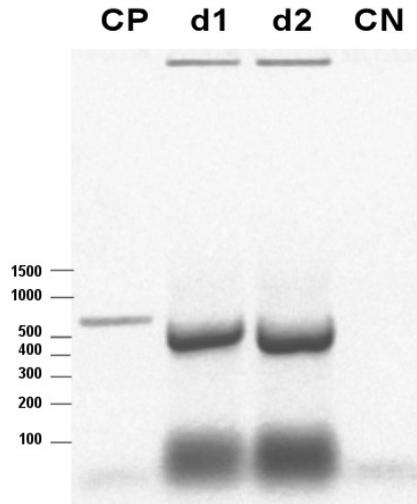


Figura 4.46 PCR di controllo per pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vd-KDEL_nos

Entrambe le colonie portano l'amplificato atteso (Figura 4.46); il PM apparentemente più basso rispetto al CP è dovuto alla presenza di una quantità di amplificato molto abbondante, che crea in gel di agarosio artefatti di tipo "smile" (cfr. § 3.2.7).

È stato quindi ottenuto il costrutto pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vd-KDEL_nos.

4.2.15 TRASFORMAZIONE DI *A. TUMEFACIENS* CON I COSTRUTTI PORTANTI KDEL

I costrutti pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb/c/d-KDEL_nos sono stati inseriti in *A. tumefaciens* EHA105 tramite elettroporazione. Due colonie ottenute per ciascuna trasformazione sono state inoculate in mezzo liquido per effettuare una miniprep, poi quantificata tramite Nanodrop®.

- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb-KDEL_nos b1 da EHA105: 31.65 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb-KDEL_nos b2 da EHA105: 31.52 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc-KDEL_nos c1 da EHA105: 30.43 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc-KDEL_nos c2 da EHA105: 27.15 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vd-KDEL_nos d1 da EHA105: 26.01 ng/μL
- pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vd-KDEL_nos d2 da EHA105: 30.98 ng/μL

Per saggiare la positività delle colonie di EHA105 viene effettuata una prova di PCR con primer per amplificare il tratto corrispondente alla zona iniziale del minibody. Amplificato atteso: 418 bp.

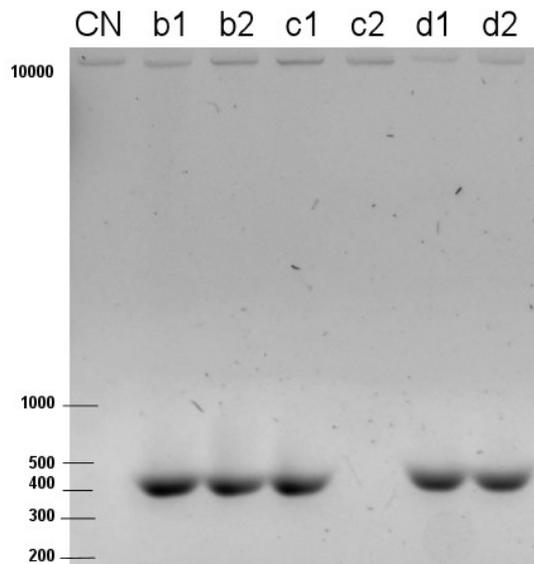


Figura 4.47 PCR da *A. tumefaciens* per pSTART_35SLLTCK_PSIyc_Vb/c/d-KDEL_nos

Tutti i costrutti presentano almeno una colonia positiva (Figura 4.47). Le tre colonie n° 1 per ciascun costrutto sono state conservate mediante glycerol stock.

4.3 TRASFORMAZIONE DI *N. TABACUM*

4.3.1 PROCESSO DI TRASFORMAZIONE E CRESCITA IN IDROPONICA

I costrutti ottenuti (cfr. § 4.2) sono stati introdotti in *A. tumefaciens* e utilizzati per la trasformazione di piante di *N. tabacum* cv. Xanthi secondo la metodologia descritta in precedenza (cfr. § 3.3).

Di seguito sono illustrati i passaggi fondamentali del processo di trasformazione, rigenerazione, selezione e coltura in idroponica effettuati per le piante geneticamente modificate ottenute in questa tesi (Figura 4.48 → Figura 4.56).



Figura 4.48 Plantule di tabacco in Baby jar al momento del prelievo dei dischetti fogliari per la trasformazione. Materiale fogliare giovane favorisce una miglior rigenerazione *in vitro*

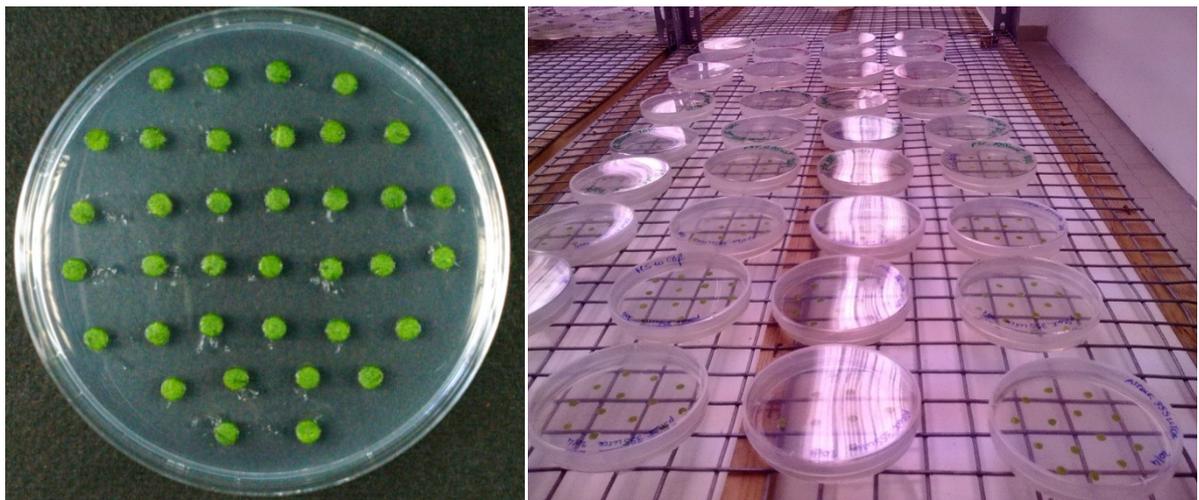


Figura 4.49 Dischetti fogliari disposti su substrato MS10 al momento dell'inoculo con le colture di *A. tumefaciens*; nei successivi trasferimenti su substrato di selezione il numero di dischetti per piastra viene progressivamente ridotto

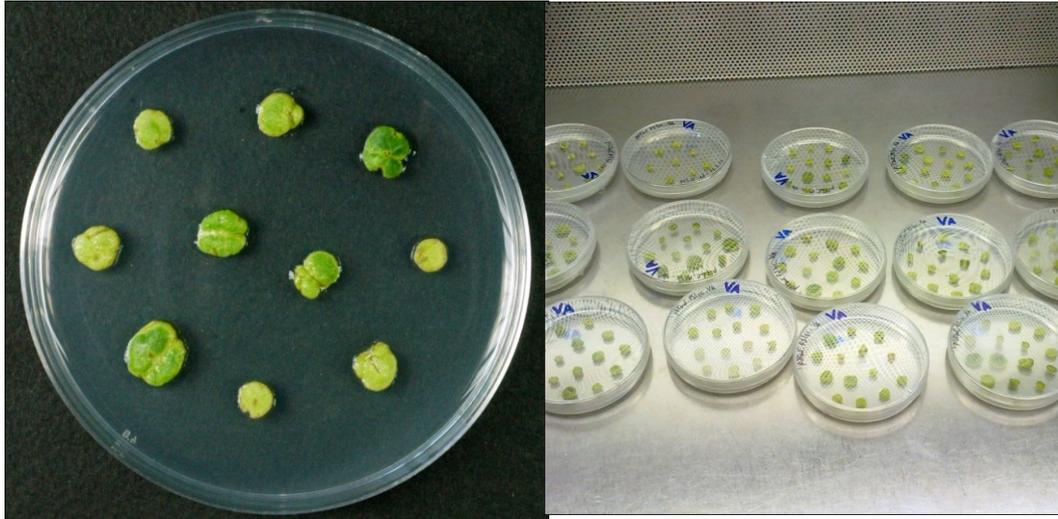


Figura 4.50 Dischetti fogliari in fase di selezione su MS10-Cefotaxime-Kanamicina

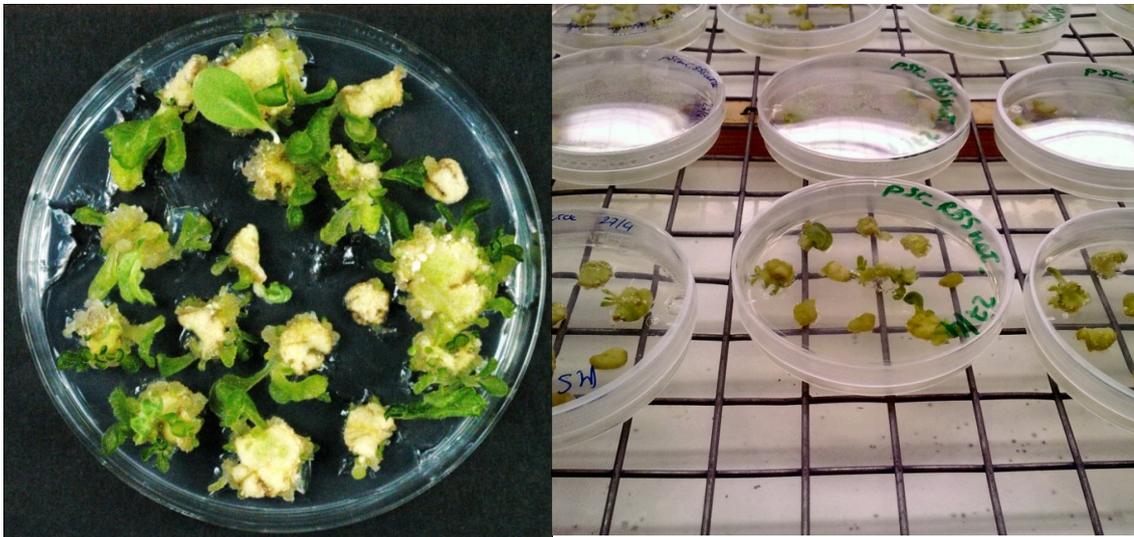


Figura 4.51 Calli formati da dischetti fogliari mantenuti su substrato selettivo; sono evidenti i germogli (verdi) originatisi in più zone di ciascun callo



Figura 4.52 Plantule putativamente trasformate in substrato per la radicazione (in contenitore Magenta a sinistra e Sarstedt a destra)



Figura 4.53 Processo di rimozione del substrato gelificato e posa in idroponica della plantula radicata; nell'accomodare la giovane pianta nel supporto le foglie più vecchie, alla base, vengono rimosse

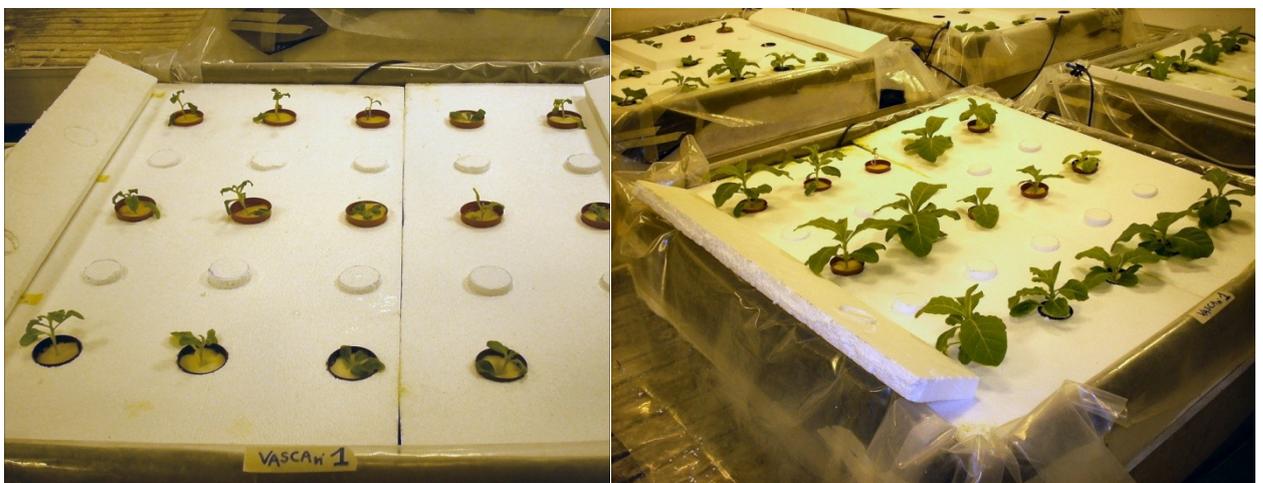


Figura 4.54 Piantine in crescita in idroponica, a un giorno (a sinistra) e otto giorni (a destra) dal trasferimento. L'adattamento dal vitro all'idroponica avviene in poche ore



Figura 4.55 Piante di tabacco trasformate dopo 3 settimane di crescita in idroponica



Figura 4.56 Foglia di tabacco di medie dimensioni appartenente a una pianta trasformata cresciuta in idroponica per 3 settimane. Le foglie possono arrivare facilmente a una lunghezza di 50 cm. Il foro presente nella parte apicale è indice di un prelievo di una piccola quantità di tessuto per scopi analitici

La trasformazione di materiale vegetale con i costrutti ottenuti è stata suddivisa in più sessioni di lavoro; ciò a causa sia della laboriosità delle operazioni da svolgere nella fase di trasformazione e rigenerazione *in vitro* sia della capacità offerta dalle strutture attualmente a disposizione, in grado di accogliere un numero limitato di rigeneranti e di piante trasformate. Rispettando queste esigenze sono stati trasformati in parallelo fino a tre costrutti per volta.

Ciascun evento di trasformazione si è svolto nell'arco di 11 settimane (Tabella 4.3), dal giorno di infezione degli espianti fogliari (giorno 1) allo smaltimento delle piante dopo crescita in idroponica per quattro settimane (giorno 75-78). Durante la fase di crescita delle piante in idroponica sono stati effettuati prelievi di tessuto fogliare; raggiunta la fase di fioritura, il materiale fogliare appartenente agli individui di interesse è stato generalmente raccolto e conservato a -80°C.

Giorno	Operazione
1	Trasformazione degli espianti e posa su MS10
2	Trasferimento dei dischetti su MS10 cef
9	Trasferimento dei rigenerati su MS10 cef+kana
29	Trasferimento dei germogli su substrato di radicazione
49	Trasferimento delle plantule in idroponica
56	Addizione di elementi nutritivi
63	Addizione di elementi nutritivi
75-78	Recupero della biomassa e smaltimento delle piante

Tabella 4.3 Tempi di svolgimento di un evento di trasformazione

Durante tutta la fase di crescita in idroponica i parametri della soluzione nutritiva sono stati monitorati (Figura 4.57); il pH è stato generalmente mantenuto in un intervallo definito (da 5.5 a 6.5). Dopo l'allestimento delle vasche, i valori di pH si stabilizzano generalmente entro la prima settimana; è tuttavia necessario monitorare ed eventualmente correggere il valore di pH giornalmente in questo periodo. Successivamente, variazioni di pH significative si riscontrano generalmente in corrispondenza all'aggiunta di macro- e microelementi.



Figura 4.57 Strumento portatile con funzioni di pHmetro e conduttimetro, nella foto è utilizzato nella calibrazione del pH in una vasca in fase di allestimento

È stato saltuariamente riscontrato un problema di contaminazione del sistema idroponico dovuto a un micete, il cui sviluppo è avvenuto nella soluzione di coltura, principalmente lungo le pareti delle vasche e attorno alle radici delle piante in crescita. L'agente in questione non ha tuttavia provocato necrosi radicale, ed è stato contenuto prima ed eliminato poi tramite un abbassamento del pH a valori compresi tra 5.2 e 5.5. Le piante cresciute a pH stabile attorno a 5.5 non hanno presentato segni evidenti di sofferenza, perciò sono stati mantenuti valori di pH attorno al limite inferiore

dell'intervallo prestabilito per la crescita del tabacco in idroponica, prevenendo ulteriori contaminazioni (cfr. § 3.3.4).

4.3.2 LE QUATTRO FORME BASE DI VACCINO Va, Vb, Vc E Vd

I costrutti pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos, pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vb_nos, pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vc_nos e pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Vd_nos (qui chiamati semplicemente Va, Vb, Vc e Vd) sono stati inseriti in *A. tumefaciens* per la trasformazione di tabacco secondo protocollo standard (cfr. § 3.3).

La trasformazione di tabacco con tutti e quattro i costrutti è stata effettuata in due eventi di trasformazione separati, prima Va e Vb e poi Vc e Vd. In fase di trasformazione e crescita non sono state riscontrate differenze evidenti all'interno delle coppie di costrutti saggiate.

Costrutto	Dischetti trasformati	Germogli posti a radicazione	Plantule trasferite in idroponica
Va	250	91	35
Vb	250	102	40
Vc	250	96	37
Vd	250	108	30

Tabella 4.4 Dati relativi al processo di trasformazione e rigenerazione per le 4 forme base di minibody

Il materiale fogliare raccolto a fine coltivazione è stato conservato a -80°C come previsto.

4.3.3 CONFRONTO FRA Va E VaKDEL

I costrutti pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos e pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos sono stati introdotti in pianta in un unico evento di trasformazione. Non sono state riscontrate differenze evidenti fra un costrutto e l'altro in fase di trasformazione e crescita.

Costrutto	Dischetti trasformati	Germogli posti a radicazione	Plantule trasferite in idroponica
Va	221	56	37
Va-KDEL	221	56	37

Tabella 4.5 Dati relativi al processo di trasformazione e rigenerazione per Va e Va-KDEL

Il materiale fogliare raccolto a fine coltivazione è stato conservato a -80°C come previsto.

Due piante per ciascun costrutto risultate fra le migliori all'analisi dei livelli di espressione (cfr. § 4.4.3) sono inoltre state portate a fioritura; le capsule sono state raccolte e fatte essiccare in cella climatica in modo da conservarne i semi.

4.3.4 CONFRONTO FRA PROMOTORI 35S_{LLTCK}, RBS_{nat} E RBS_{LLTCK} E TERMINATORI nos E RBSter

I costrutti pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos, pSTART_RBS_{nat}_GUS_nos e pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_nos sono stati introdotti in pianta in un primo evento di trasformazione. Non sono state riscontrate differenze evidenti fra un costrutto e l'altro in fase di trasformazione e crescita.

Costrutto	Dischetti trasformati	Germogli posti a radicazione	Plantule trasferite in idroponica
35S _{LLTCK} ...nos	200	40	24
RBS _{nat} ...nos	200	40	24
RBS _{LLTCK} ...nos	200	41	24

Tabella 4.6 Dati relativi al processo di trasformazione e rigenerazione per i costrutti "RBS" portanti terminatore nos

Il materiale fogliare raccolto a fine coltivazione è stato conservato a -80°C come previsto.

I costrutti pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_RBSter, pSTART_RBS_{nat}_GUS_RBSter e pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_RBSter sono stati introdotti in pianta in un secondo evento di trasformazione. Non sono state riscontrate differenze evidenti fra un costrutto e l'altro in fase di trasformazione e crescita.

Costrutto	Dischetti trasformati	Germogli posti a radicazione	Plantule trasferite in idroponica
35S _{LLTCK} ...RBSter	200	39	20
RBS _{nat} ...RBSter	200	44	20
RBS _{LLTCK} ...RBSter	200	42	20

Tabella 4.7 Dati relativi al processo di trasformazione e rigenerazione per i costrutti "RBS" portanti terminatore RBSter

Il materiale fogliare raccolto a fine coltivazione è stato conservato a -80°C come previsto.

4.3.5 CONFRONTO FRA VETTORI pSTART E pCAMBIA

Il confronto fra backbone vettoriale pSTART e pCAMBIA è avvenuto in primo luogo per quanto riguarda la qualità della trasformazione; per questo motivo, tutte le fasi svolte *in vitro* e *in vivo* sono state monitorate e registrate con particolare attenzione.

Un primo evento di trasformazione ha visto il confronto diretto fra pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos e pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos; la modificazione del vettore pCAMBIA2300 in modo che presentasse la stessa cassetta di espressione del gene reporter e la stessa organizzazione del T-DNA di pSTART (Figura 4.31) è stata effettuata proprio per poter valutare al meglio l'effetto del solo backbone vettoriale.

Come si può vedere in Tabella 4.8, è stata riscontrata una differenza netta fin dalle prime fasi di trasformazione. Nei primi passaggi il numero di dischetti che non hanno portato alla formazione di germogli per pCAMBIA2300 è risultato decisamente basso (9 su 208), specie se confrontato con il valore ottenuto per pSTART (67 su 206). La conta del numero totale di germogli, sebbene indicativa della capacità rigenerativa (332 contro 506), non è stata considerata un buon parametro di valutazione poiché i germogli ottenuti presentavano differenze morfologiche evidenti, osservabili in Figura 4.58.

Costrutto	Espianti Ø	Trasferimento dei germogli in contenitore				Trasferimento delle plantule in idroponica					Piante in idroponica alla 3 ^o settimana
		Ø	Ø senza germogli	germogli totali	germogli trasferiti	radicate grandi	radicate piccole	non radicate	sbiancate	trasferite	
pSTART	210	206	67	332	40	17	15	5	3	20	20
pCAMBIA 2300	210	208	9	506	45	5	8	20	12	20	7

Tabella 4.8 Monitoraggio della trasformazione per pSTART e pCAMBIA2300; Ø: n. dischetti

I germogli derivati dai trasformati pSTART erano di forma irregolare, con foglie non ben definite e contorte, di un colore verde chiaro spesso tendente al bianco, generalmente piccoli anche se presenti in discrete quantità; i germogli derivati da pCAMBIA2300 invece si sono mostrati subito qualitativamente superiori, con una forma ben definita, foglioline riconoscibili dal colore spesso tendente al verde scuro, in numero generalmente elevato e con una crescita decisamente superiore rispetto a quelli derivati da pSTART.



Figura 4.58 Differenze morfologiche fra germogli derivati da espanti trasformati con pSTART (a sinistra) e pCAMBIA2300 (a destra)

Nonostante la palese diversità riscontrata nella rigenerazione degli espanti, i germogli derivati da trasformazione con pCAMBIA2300 hanno mostrato notevoli difficoltà nella fase di radicazione; più

della metà dei germogli (20 non radicati e 12 sbiancati su 45 totali) si sono rivelati inadatti al trasferimento in idroponica. I germogli derivati da pSTART hanno dato invece risultati nel complesso molto positivi (5 non radicati e 3 sbiancati su 40 totali). Questa differenza di qualità dei rigenerati ottenuti con i due sistemi vettoriali è stata riscontrata anche a livello di sopravvivenza in idroponica delle plantule: quelle portanti il costrutto pSTART sono sopravvissute all'adattamento e hanno generato piante adulte; la maggior parte delle plantule trasformate con pCAMBIA2300 invece è morta in fase di adattamento.

Alla luce di questo risultato è stato allestito un secondo esperimento di trasformazione di conferma. È stato trasformato in parallelo a pSTART e pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos anche il costrutto pCAMBIA2301, che porta lo stesso backbone di pCAMBIA2300 ma presenta in più una cassetta di espressione per GUSintr all'interno del T-DNA (Figura 3.11).

Costrutto	Espianti	Trasferimento dei germogli in contenitore			Trasferimento delle plantule in idroponica			
		∅	∅ senza germogli	germogli trasferiti	radicate grandi	radicate piccole	non radicate	sbiancate
pSTART	210	209	65	40	17	12	10	1
pCAMBIA 2300	210	210	24	40	3	5	32	0
pCAMBIA 2301	210	204	16	40	2	3	27	8

Tabella 4.9 Monitoraggio della trasformazione per pSTART, pCAMBIA2300 e pCAMBIA2301; ∅: n. dischetti

Come si può vedere in Tabella 4.9, l'evidenza ottenuta nella trasformazione precedente per pSTART e pCAMBIA2300 viene ribadita: a fronte di una maggior rigenerazione per pCAMBIA si riscontra poi una cattiva radicazione dei germogli.

pCAMBIA2301 sembra seguire il comportamento di pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos, con pochi dischetti privi di germogli ma una percentuale prevalente di germogli sbiancati e non radicati su substrato selettivo.

Le piante derivate da questo evento di trasformazione non sono state effettivamente trasferite in idroponica; i saggi molecolari effettuati sono derivati dall'analisi delle plantule *in vitro*.

4.3.6 VALIDAZIONE DI GUSintr

Per verificare la validità della forma ibrida di GUS (GUSintr) creata per l'utilizzo come gene reporter in agroinfiltrazione, è stata effettuata una trasformazione stabile utilizzando in parallelo i costrutti pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos e pSTART_35S_{LLTCK}_GUSintr_nos. Lo scopo di questo evento di trasformazione era la produzione di poche piante, allevate in vaso, per il prelievo di piccole quantità di tessuto fogliare. Non sono quindi state monitorate le condizioni di trasformazione e rigenerazione *in vitro*. Sono state ottenute sei piante per pSTART_35S_{LLTCK}_GUSintr_nos e tre piante per pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos.

4.3.7 PROVE DI AGROINFILTRAZIONE

Sono state effettuate prove di agroinfiltrazione utilizzando costrutti portanti GUSintr appositamente creati (4.2.12). L'agroinfiltrazione è avvenuta su piante di tre settimane; in Figura 4.59 sono riportate immagini della procedura utilizzata.

Per effettuare le prove di agroinfiltrazione sono state scelte piante cresciute in vaso con terriccio invece di piante in idroponica per poter manipolare le colture di *A. tumefaciens* con più sicurezza: nelle prime prove di infiltrazione mediante siringa, infatti, l'esercitare una pressione non corretta avrebbe potuto causare versamenti di sospensione batterica, con contaminazione delle vasche di coltura.

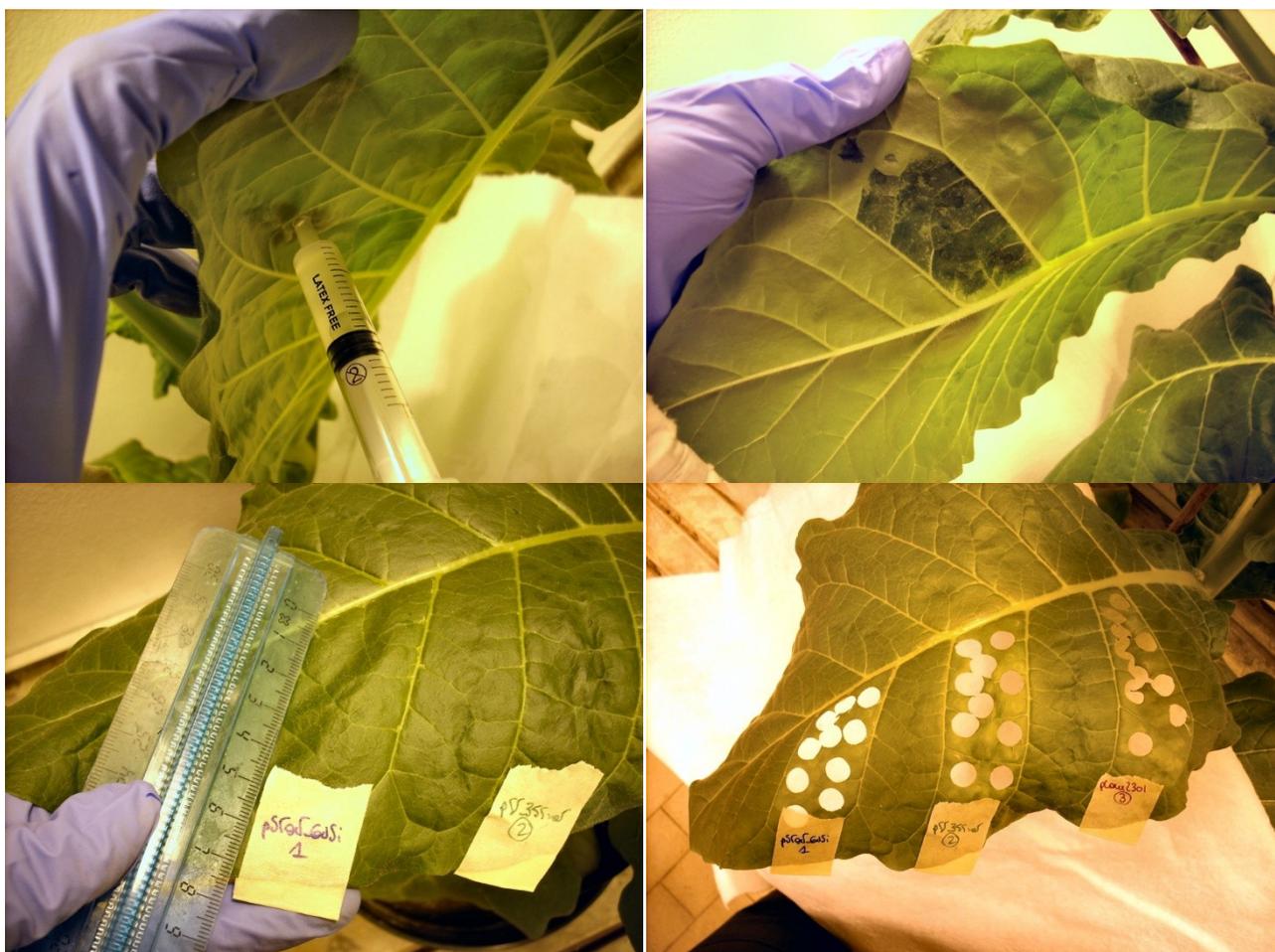


Figura 4.59 Agroinfiltrazione: infezione con una coltura di *A. tumefaciens* (in alto) misurazione della superficie agroinfiltrata e prelievo di dischetti fogliari (in basso)

Dopo l'infiltrazione di una coltura di *A. tumefaciens* portante il vettore desiderato, le piante sono state lasciate in cella climatica; i prelievi fogliari sono stati effettuati a 24, 48 e 96 h dall'infiltrazione. I ceppi batterici utilizzati nelle prove di agroinfiltrazione portavano i seguenti costrutti:

- pSTART_35S_{LLTCK}_GUSintr_nos
- pCAMBIA2301
- Ø (controllo)

4.4 ANALISI DEI TRASFORMATI

4.4.1 VALIDAZIONE DELLA TECNICA DI SELEZIONE UTILIZZATA PER I VACCINI

La selezione delle piante trasformate è stata effettuata mediante tecnica ELISA. Ciò è possibile sia per la sensibilità del saggio immunoenzimatico, che permette di rilevare anche piccole quantità della molecola bersaglio, sia per l'alta efficienza di trasformazione di costrutti a base pSTART che, come confermato in seguito (cfr. § 4.4.5), danno raramente origine a individui escape. La metodica di selezione dei migliori trasformati mediante rilevazione di proteine in foglia di tabacco con tecnica ELISA è stata messa a punto al di fuori di questa tesi, e prevede l'utilizzo di pochissimo materiale fogliare di partenza (un dischetto del diametro di 1 cm) come campione rappresentativo dell'intera pianta. La quantità di proteina rilevata non viene in questo caso rapportata alla concentrazione proteica totale riscontrata nell'estratto, ma alla superficie fogliare, che rimane costante per ogni campione.

Come esperimento preliminare si è voluto comunque effettuare una convalida di questo metodo, in modo da rafforzare i dati precedentemente ottenuti. È stata effettuata una prova su foglie di tre piante scelte a caso nella popolazione trasformata con pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos (chiamate K1, K2 e K3). Per ogni pianta sono state scelte una foglia basale, una mediana e una apicale, e per ogni foglia sono stati effettuati tre prelievi (come in Figura 4.60). I prelievi sono stati effettuati alla terza settimana di coltivazione in idroponica.

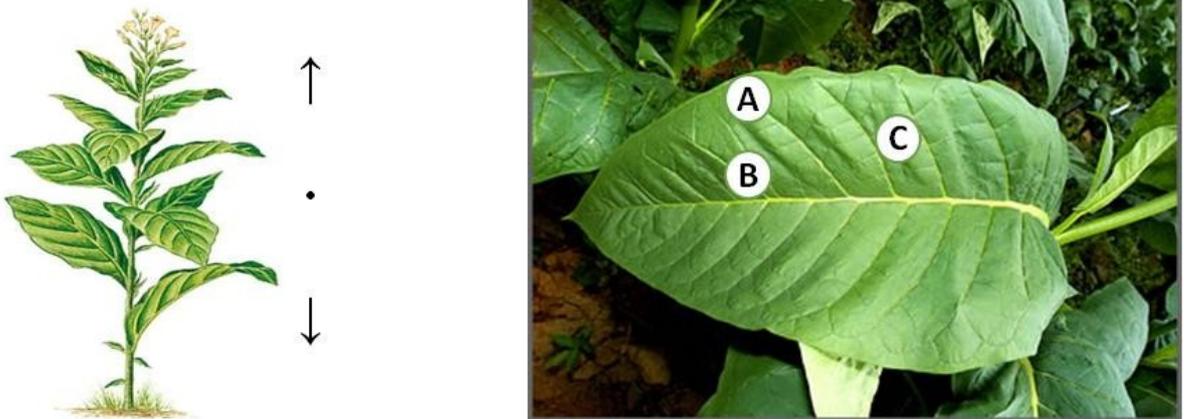


Figura 4.60 Schema rappresentante la localizzazione dei prelievi effettuati nella pianta di tabacco

Come visualizzato in Figura 4.61, l'analisi ELISA effettuata sui diversi campioni ha mostrato una piccola variazione della quantità di vaccino espressa per i tre prelievi (a, b e c) effettuati all'interno della stessa foglia; una diversità maggiore è stata invece riscontrata fra le tre foglie saggiate appartenenti alla stessa pianta (↑ · ↓) e in maniera ancora più marcata fra piante diverse (K1, K2, K3). La tendenza generale osservata vede un accumulo della proteina-minibody nelle foglie più mature (↓).

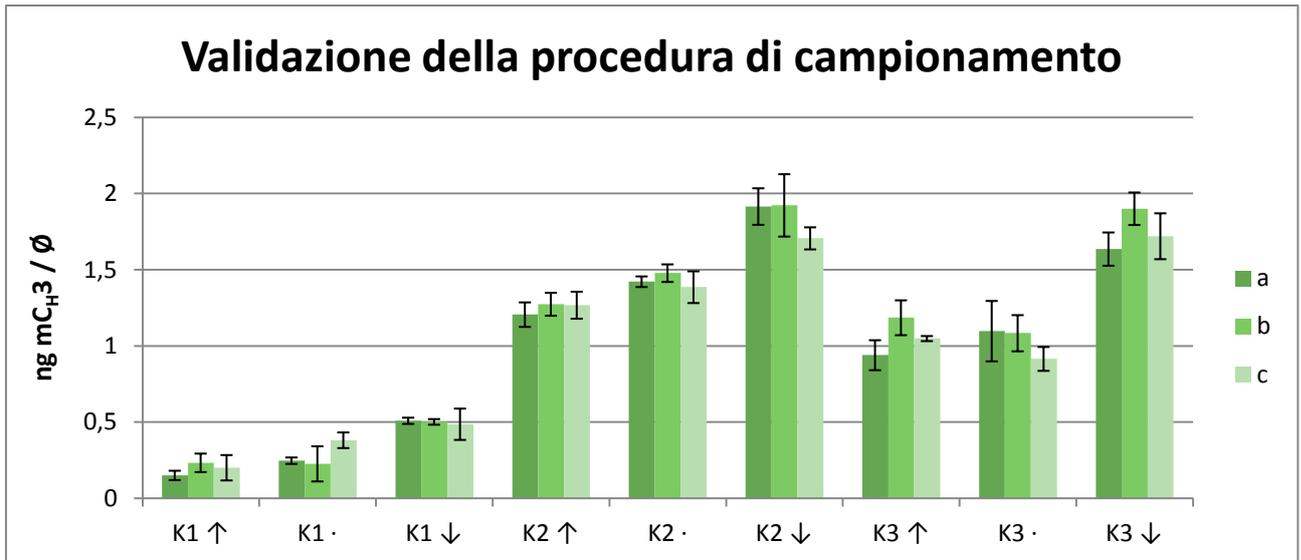


Figura 4.61 Grafico rappresentante le quantità di vaccino Va riscontrate nei diversi prelievi (a, b, c) in ciascuna foglia analizzata. K1, K2, K3: piante trasformate con costrutto portante Va-KDEL

L'analisi della varianza (ANOVA, analisi a un fattore, $\alpha = 0.05$) eseguita per i dati sopra ottenuti (effettuata in Excel) è riportata in seguito. Come si può vedere, vi è una diversità statisticamente significativa ($F > F_{crit}$, valore di significatività $P < 0.05$) sia fra le tre piante (Figura 4.62) sia fra foglie della stessa pianta (Figura 4.63 per K1, Figura 4.66 per K2, Figura 4.69 per K3). Analizzando invece i dati relativi a tutti i dischetti appartenenti alla stessa pianta, non è stata trovata alcuna differenza significativa; i dati sono stati divisi sia in tre gruppi composti dai valori ottenuti dai dischetti in posizione a, b o c per ciascuna foglia (Figura 4.64, Figura 4.67, Figura 4.70), sia in due gruppi composti in modo casuale (random1, random2) (Figura 4.65, Figura 4.68, Figura 4.71). Come ulteriore conferma, inoltre, sono stati messi a confronto i gruppi random1 per ogni pianta, e come atteso mostrano una differenza statisticamente significativa (Figura 4.72).

Questi dati confermano che la quantificazione in ELISA del vaccino effettuata a seguito del prelievo di un singolo dischetto da una pianta sia un buon metodo di valutazione dell'espressione della pianta stessa. Considerata la diversità riportata fra foglia e foglia e la generale tendenza di accumulo del minibody all'aumentare dell'età fogliare, i dischetti fogliari dovrebbero essere prelevati tutti dalla medesima posizione all'interno della pianta (in questa tesi è stata scelta la foglia apicale completamente distesa ↑, posizione a, come da Figura 4.60).

RIEPILOGO						
Gruppi	Conteggio	Somma	Media	Varianza		
K1	9	2938,348	326,4831	20547,26		
K2	9	13578,43	1508,714	75555,82		
K3	9	11528,12	1280,902	136148,5		
ANALISI VARIANZA						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	7081453	2	3540727	45,73566	0,00000000649898	3,402826
In gruppi	1858013	24	77417,2			
Totale	8939466	26				

Figura 4.62 ANOVA per gruppi K1, K2, K3

RIEPILOGO				
Gruppi	Conteggio	Somma	Media	Varianza
K1 ↑	3	585,0867	195,0289	1727,586
K1 ·	3	855,5248	285,1749	7076,755
K1 ↓	3	1497,737	499,2456	134,5224

ANALISI VARIANZA						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	146500,3	2	73250,16	24,58372	0,001286487	5,143253
In gruppi	17877,73	6	2979,621			
Totale	164378	8				

Figura 4.63 ANOVA per gruppi K1↑, K1·, K1↓

RIEPILOGO				
Gruppi	Conteggio	Somma	Media	Varianza
a	3	907,3867	302,4622	34387,22
b	3	961,7715	320,5905	24708,68
c	3	1069,19	356,3967	20833,3

ANALISI VARIANZA						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	4519,641	2	2259,82	0,084818	0,919760994	5,143253
In gruppi	159858,4	6	26643,07			
Totale	164378	8				

Figura 4.64 ANOVA per gruppi a, b, c (K1)

RIEPILOGO				
Gruppi	Conteggio	Somma	Media	Varianza
random 1	5	1574,075	314,815	28722,96
random 2	4	1364,273	341,0683	15984,85

ANALISI VARIANZA						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	1531,644	1	1531,644	0,065838	0,804873654	5,591448
In gruppi	162846,4	7	23263,77			
Totale	164378	8				

Figura 4.65 ANOVA per gruppi random1 e random2 (K1)

RIEPILOGO				
Gruppi	Conteggio	Somma	Media	Varianza
K2 ↑	3	3747,547	1249,182	1415,864
K2 ·	3	4286,127	1428,709	2156,705
K2 ↓	3	5544,757	1848,252	15085,05

ANALISI VARIANZA						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	567131,3	2	283565,6	45,59514	0,00023528	5,143253
In gruppi	37315,24	6	6219,207			
Totale	604446,5	8				

Figura 4.66 ANOVA per gruppi K2↑, K2·, K2↓

RIEPILOGO				
Gruppi	Conteggio	Somma	Media	Varianza
a	3	4543,09	1514,363	132220,2
b	3	4675,133	1558,378	110119,8
c	3	4360,207	1453,402	51546,53

ANALISI VARIANZA						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	16673,4	2	8336,698	0,085101	0,919508037	5,143253
In gruppi	587773,1	6	97962,19			
Totale	604446,5	8				

Figura 4.67 ANOVA per gruppi a, b, c (K2)

RIEPILOGO				
Gruppi	Conteggio	Somma	Media	Varianza
random 1	5	7573,51	1514,702	88744,55
random 2	4	6004,92	1501,23	83021,68

ANALISI VARIANZA						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	403,3217	1	403,3217	0,004674	0,947406087	5,591448
In gruppi	604043,2	7	86291,89			
Totale	604446,5	8				

Figura 4.68 ANOVA per gruppi random1 e random2 (K2)

RIEPILOGO				
Gruppi	Conteggio	Somma	Media	Varianza
K3 ↑	3	3173,837	1057,946	15166,09
K3 ·	3	3096,916	1032,305	10292,82
K3 ↓	3	5257,363	1752,454	18327,67

ANALISI VARIANZA						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	1001615	2	500807,5	34,3124	0,000519762	5,143253
In gruppi	87573,15	6	14595,53			
Totale	1089188	8				

Figura 4.69 ANOVA per gruppi K3↑, K3·, K3↓(A7)

RIEPILOGO				
Gruppi	Conteggio	Somma	Media	Varianza
a	3	405,6975	135,2325	3008,658
b	3	339,8186	113,2729	38,66962
c	3	245,7324	81,91081	4507,182

ANALISI VARIANZA						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	4309,01	2	2154,505	0,855584	0,471078584	5,143253
In gruppi	15109,02	6	2518,17			
Totale	19418,03	8				

Figura 4.70 ANOVA per gruppi a, b, c (K3)

RIEPILOGO						
<i>Gruppi</i>	<i>Conteggio</i>	<i>Somma</i>	<i>Media</i>	<i>Varianza</i>		
random 1	5	6428,767	1285,753	132060,7		
random 2	4	5099,349	1274,837	186893,5		
ANALISI VARIANZA						
<i>Origine della variazione</i>	<i>SQ</i>	<i>gdl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valore di significatività</i>	<i>F crit</i>
Tra gruppi	264,8038	1	264,8038	0,001702	0,968242025	5,591448
In gruppi	1088923	7	155560,5			
Totale	1089188	8				

Figura 4.71 ANOVA per gruppi random1 e random2 (K3)

RIEPILOGO						
<i>Gruppi</i>	<i>Conteggio</i>	<i>Somma</i>	<i>Media</i>	<i>Varianza</i>		
Random1 K1	5	1574,075	314,815	28722,96		
Random1 K2	5	7573,51	1514,702	88744,55		
Random1 K3	5	6428,767	1285,753	132060,7		
ANALISI VARIANZA						
<i>Origine della variazione</i>	<i>SQ</i>	<i>gdl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valore di significatività</i>	<i>F crit</i>
Tra gruppi	4058113	2	2029056	24,39472	5,91724E-05	3,885294
In gruppi	998112,8	12	83176,07			
Totale	5056226	14				

Figura 4.72 ANOVA per gruppi random provenienti da K1, K2 e K3

4.4.2 LE QUATTRO FORME BASE DI VACCINO Va, Vb, Vc E Vd

Per la selezione dei migliori trasformati nelle piante portanti costrutti Va, Vb, Vc e Vd sono stati effettuati saggi ELISA da prelievi effettuati in corrispondenza alla posizione “↑a” (Figura 4.60). Le piante sono state saggiate dopo due settimane dalla posa in idroponica. Come si può notare di seguito, tutte le trasformazioni hanno avuto esito positivo. La molecola vaccino è stata rilevata per tutti e quattro i costrutti (saggi ELISA effettuati su controlli non trasformati di tabacco non hanno dato alcun segnale; dati non riportati). Per ogni trasformazione sono state eliminate le piante con livello di espressione più basso, mantenendo in idroponica fino a 10 piante per costrutto, in modo da permettere un miglior sviluppo delle rimanenti. Al raggiungimento della quarta settimana in idroponica, il materiale fogliare è stato asportato, congelato immediatamente e conservato a -80°C per future analisi.

Di seguito sono riportati i grafici relativi alle analisi ELISA effettuate sulle piante trasformate. Ogni dato è ottenuto dalla media dei valori riscontrati in due diversi dischetti fogliari prelevati in posizione attigua all'interno della pianta.

I valori riportati per Va e Vb (Figura 4.73, Figura 4.74) risultano più alti di quelli riscontrati in Vc e Vd (Figura 4.75, Figura 4.76). Per un'analisi delle ragioni che possono aver determinato questi risultati, si rimanda alla sez. Discussione (cfr. § 5.1.1). E' utile comunque ricordare fin d'ora che le due coppie di vaccini differiscono per la regione C_H3 (di origine murina per Va e Vb, umana per Vc e Vd).

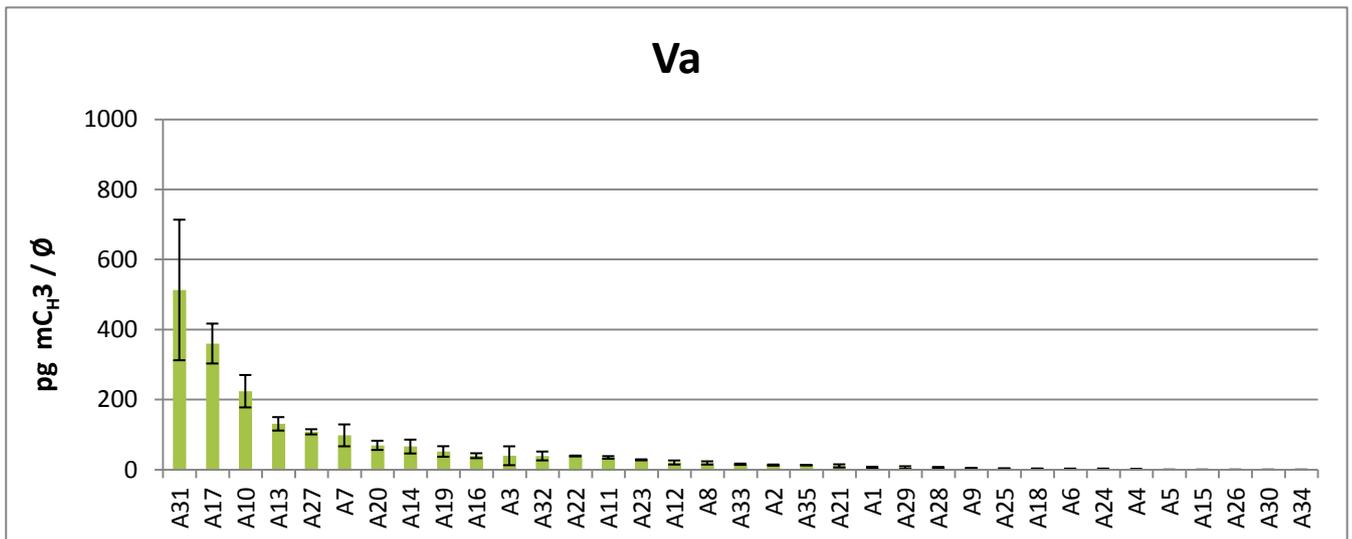


Figura 4.73 Selezione dei migliori trasformati Va

Vb

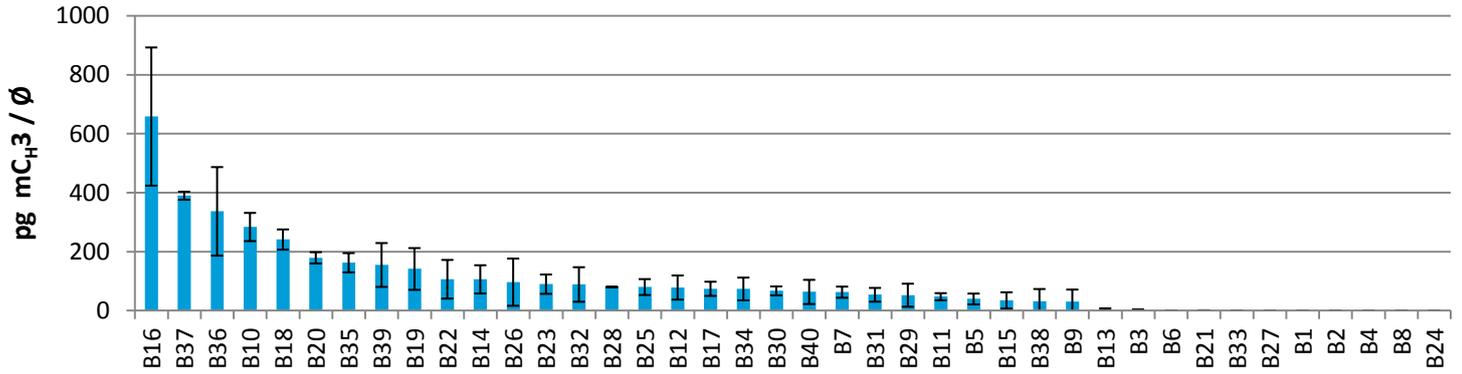


Figura 4.74 Selezione dei migliori trasformati Vb

Vc

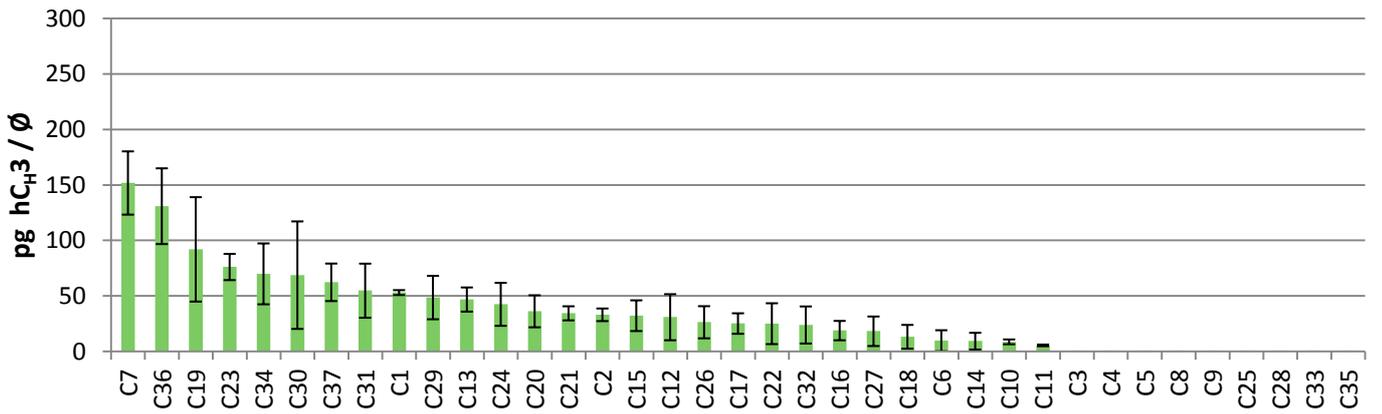


Figura 4.75 Selezione dei migliori trasformati Vc

Vd

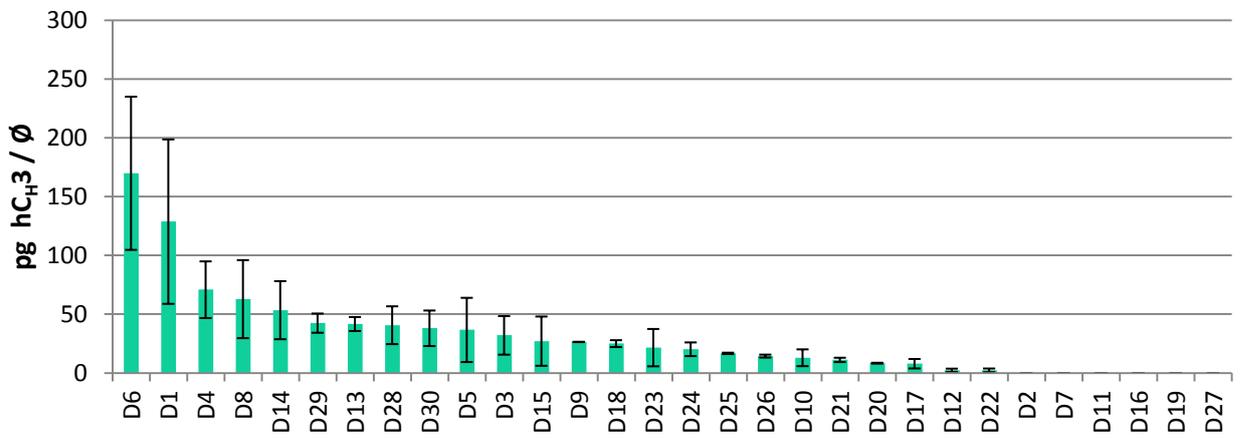


Figura 4.76 Selezione dei migliori trasformati Vd

4.4.3 VALUTAZIONE DELLA SEQUENZA DI RITENZIONE NELL'ER KDEL IN Va

Al fine di valutare l'effetto della sequenza di ritenzione nell'ER (KDEL) è stata effettuata una trasformazione in parallelo con i costrutti pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va_nos e pSTART_35S_{LLTCK}_PSlyc_Va-KDEL_nos. Le analisi dei trasformati primari sono state effettuate mediante saggio ELISA, con prelievi effettuati a due e quattro settimane dalla posa in idroponica.

Come si può vedere in Figura 4.77 per Va e in Figura 4.78 per Va-KDEL, la trasformazione è stata effettuata con successo. Come già riscontrato nelle trasformazioni coinvolgenti le 4 forme base di vaccino (cfr. § 4.4.2), più della metà delle piante esprimono il minibody a livelli di espressione rilevabili dal saggio, confermando la tendenza osservata in precedenza. In seguito a quest'analisi, i peggiori espressor per ciascun costrutto sono stati scartati, lasciando a dimora 21 piante per tipo. Già alla 2° settimana si può notare un incremento generale nell'accumulo di vaccino per la forma portante KDEL.

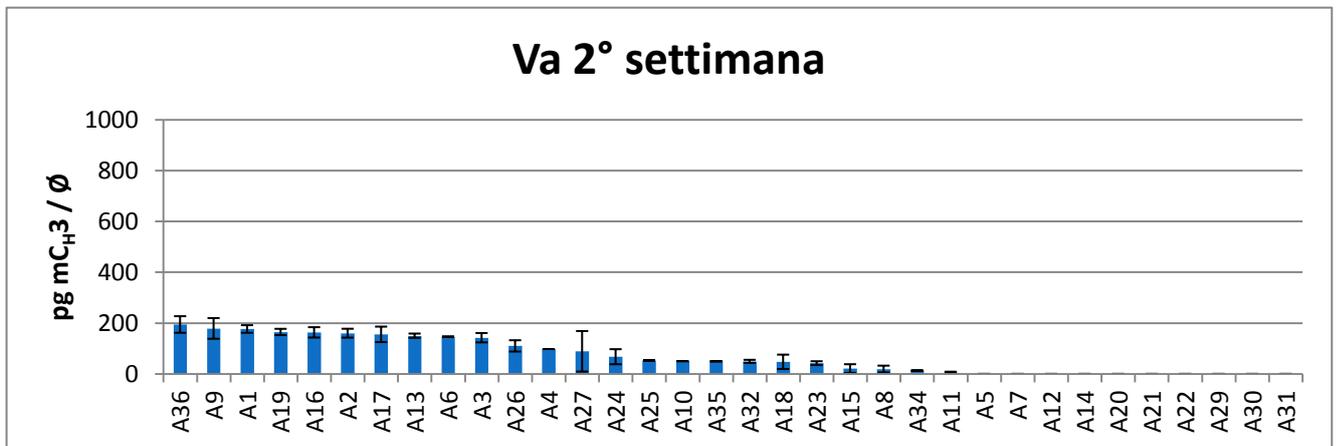


Figura 4.77 ELISA su trasformati Va alla 2° settimana

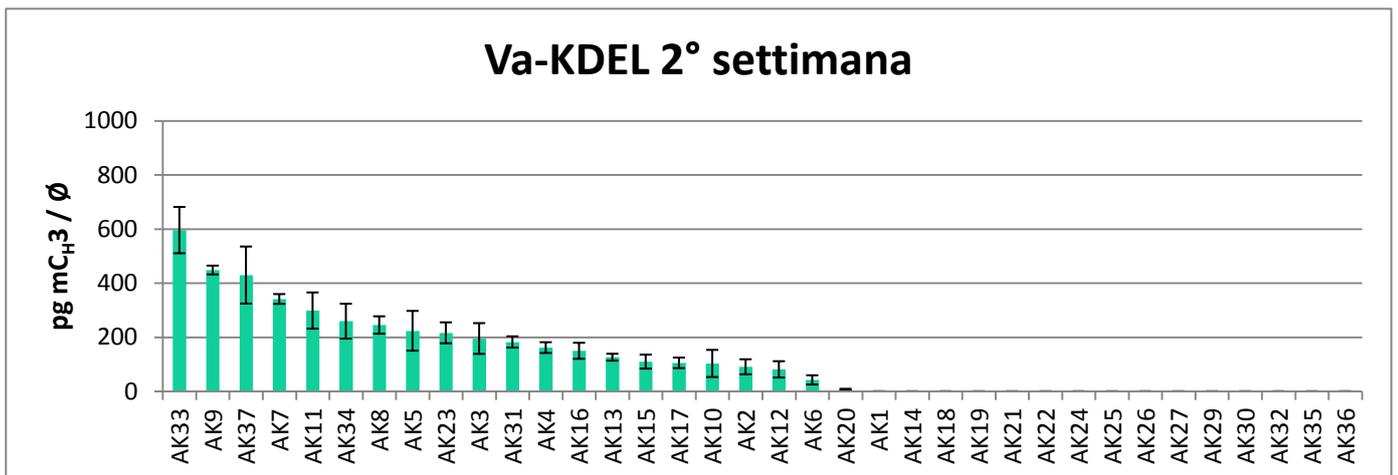


Figura 4.78 ELISA su trasformati Va-KDEL alla 2° settimana

L'ANOVA effettuata per i dati raccolti sulla popolazione trasformata alla seconda settimana mostra una differenza statisticamente significativa fra i due gruppi (Figura 4.79).

RIEPILOGO				
Gruppi	Conteggio	Somma	Media	Varianza
Va 2°	24	2344,691	97,69546	3851,952
VaK 2°	21	4411,08	210,0514	21490,71

ANALISI VARIANZA						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	141387,3	1	141387,3	11,72752	0,001364841	4,067047
In gruppi	518409,1	43	12056,03			
Totale	659796,4	44				

Figura 4.79 ANOVA per Va e Va-KDEL alla 2° settimana dalla messa in idroponica

Alla 4° settimana di allevamento in idroponica, la differenza riscontrata in precedenza si è fatta ancora più marcata: nei migliori espressorì Va-KDEL (Figura 4.81) vi è un livello di espressione tre-quattro volte superiore a quello riscontrato nei migliori espressorì Va (Figura 4.80).

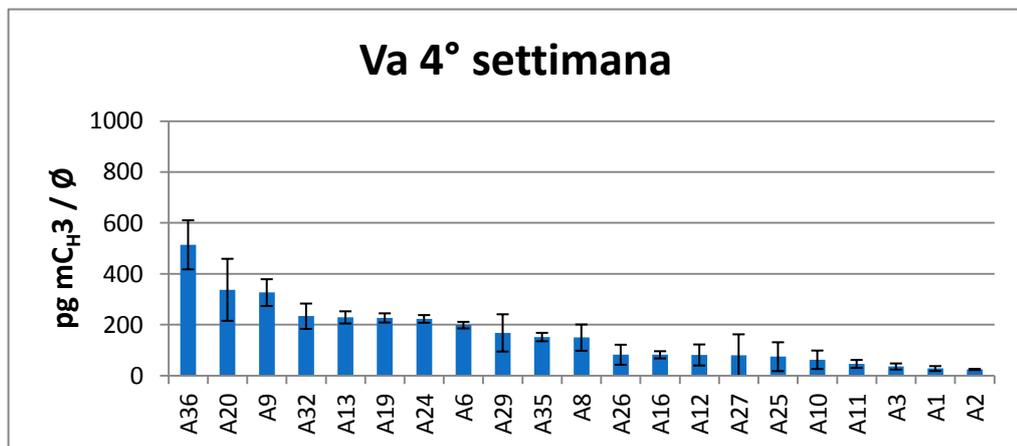


Figura 4.80 ELISA su migliori trasformati Va alla 4° settimana

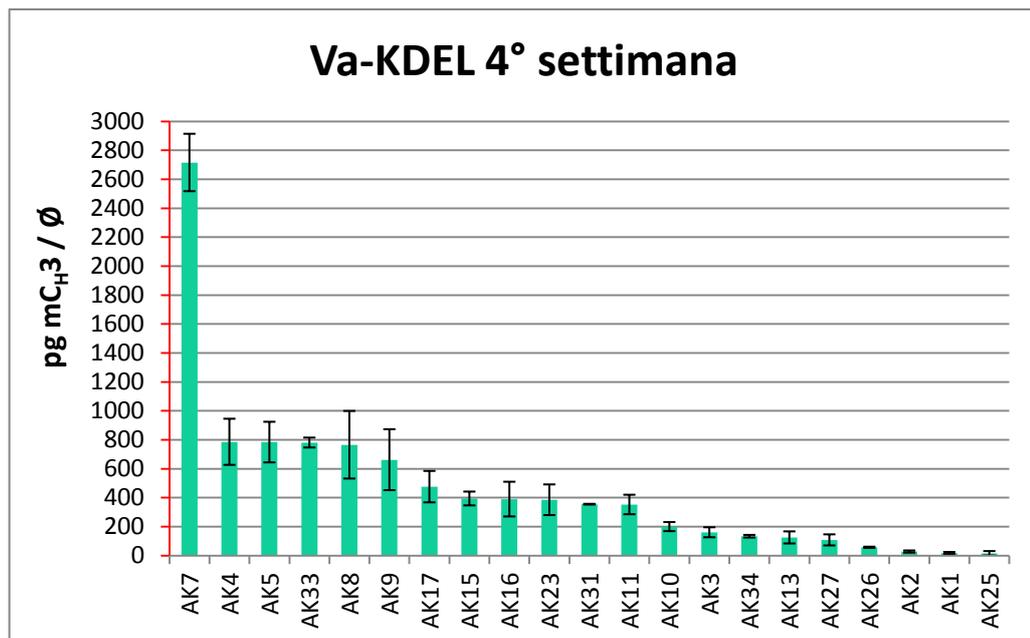


Figura 4.81 ELISA su migliori trasformati Va-KDEL alla 4° settimana

Si noti l'intervallo delle ordinate, molto più ampio rispetto agli altri grafici riportati

Il valore straordinariamente alto riscontrato in AK7 è stato confermato da più prove, si tratta di un espressore già risultato buono nell'analisi a 2 settimane (Figura 4.78), ma in cui l'accumulo di minibody è stato evidentemente particolarmente favorito in seguito.

L'ANOVA effettuata per i dati raccolti sulla popolazione trasformata alla quarta settimana mostra una differenza statisticamente significativa fra Va e Va-KDEL (Figura 4.82).

RIEPILOGO						
Gruppi	Conteggio	Somma	Media	Varianza		
Va 4°	21	3360,34	160,0162	15535,29		
VaK 4°	21	9806,123	466,9582	345303,6		
ANALISI VARIANZA						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	989240,9	1	989240,9	5,483007	0,024269959	4,084746
In gruppi	7216777	40	180419,4			
Totale	8206018	41				

Figura 4.82 ANOVA per Va e Va-KDEL alla 4° settimana dalla posa in idroponica

Poiché il valore estremamente divergente del campione AK7 è da considerarsi un fatto eccezionale (poiché non segue il comportamento della popolazione), è stata eseguita un'ulteriore analisi escludendo questa pianta dalla popolazione Va-KDEL. Come si può vedere in Figura 4.83, la rimozione del dato relativo a AK7 non modifica le conclusioni derivanti dall'analisi statistica, ovvero che esiste una diversa potenzialità produttiva dei due costrutti a favore di quello che determina l'accumulo del vaccino entro l'ER.

RIEPILOGO						
Gruppi	Conteggio	Somma	Media	Varianza		
Va 4°	21	3360,34	160,0162	15535,29		
VaK 4° (no VaK7)	20	7090,633	354,5317	84072,72		
ANALISI VARIANZA						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	387591	1	387591	7,922094	0,007615586	4,091278
In gruppi	1908087	39	48925,32			
Totale	2295678	40				

Figura 4.83 ANOVA per Va e Va-KDEL alla 4° settimana dalla posa in idroponica, no AK7

In seguito a questi risultati, le piante A36, A9, AK7 e AK33, risultate fra le migliori a livello di produzione e presentanti un aspetto morfologico ottimale, sono state portate a fioritura; le capsule sono state asportate e seccate e i semi conservati in vista di una futura semina.

4.4.4 VALUTAZIONE DI PROMOTORE E TERMINATORE RBS

Il confronto fra elementi presenti nel vettore di base pSTART (35S_{LTCK}, nos ter) ed elementi regolatori del gene RuBisCO (RBS_{nat}, RBS_{LTCK}, RB_{Ster}) è avvenuto confrontando due eventi di trasformazione distinti. Per la selezione delle piante trasformate è stato utilizzato un saggio GUS istochimico effettuato su dischetti fogliari prelevati da piante alla prima settimana di coltivazione in idroponica.

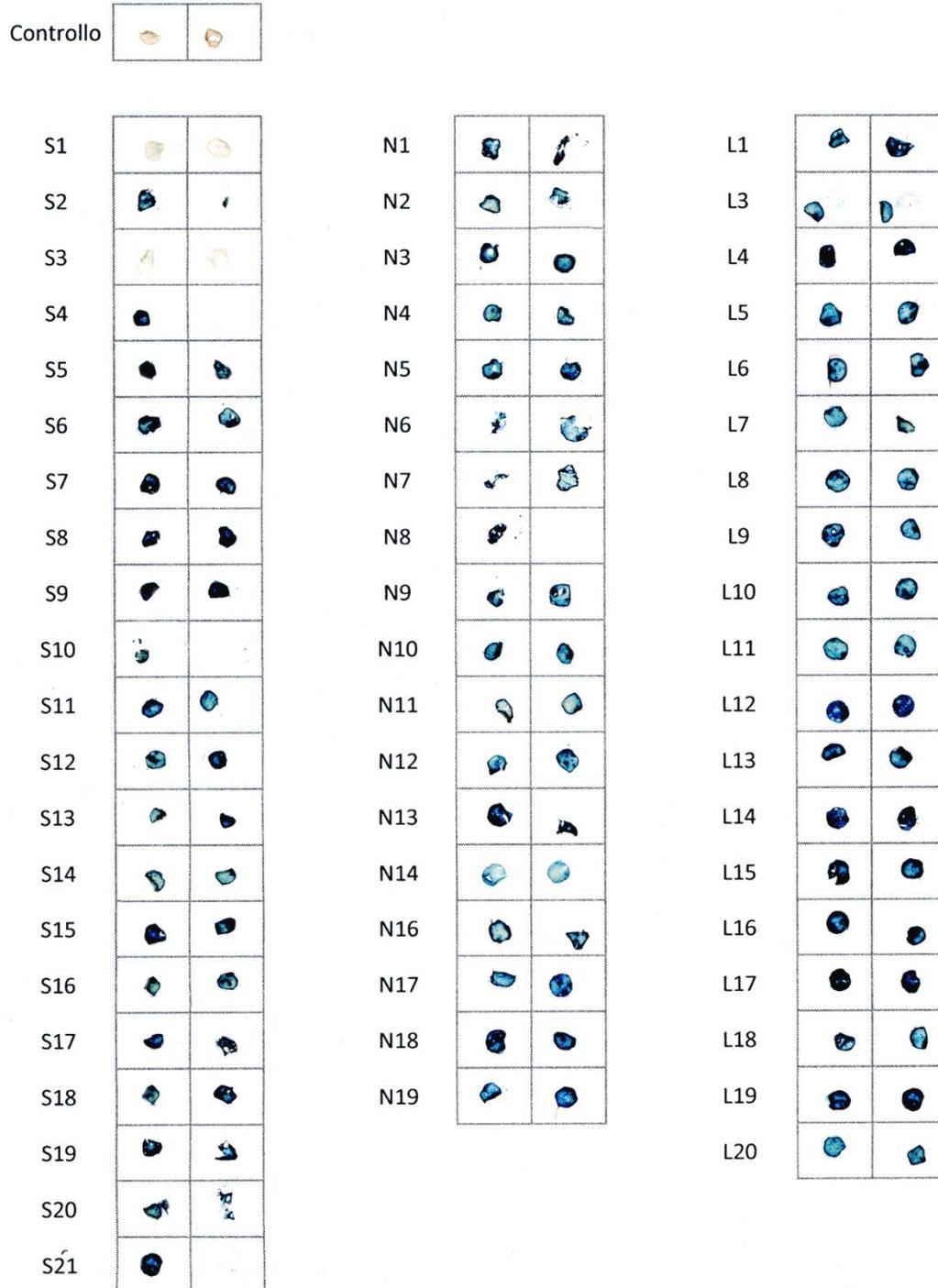


Figura 4.84 Saggio GUS istochimico condotto su dischetti fogliari di piante trasformate con i costrutti pSTART_35S_{LTCK} (S) / RBS_{nat} (N) / RBS_{LTCK} (L)_GUS_nos; i dischetti mancanti sono andati distrutti durante le procedure di manipolazione degli stessi. Il numero a lato del codice di identificazione del costrutto indica la pianta sottoposta a saggio

In Figura 4.84 si riportano i risultati del saggio effettuato su piante trasformate con i costrutti:

- pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos (S)
- pSTART_RBSnat_GUS_nos (N)
- pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_nos (L)

Come si può notare, pochi campioni non presentano la colorazione blu tipica della presenza di β -glucuronidasi in forma attiva, risultando quindi sicuramente trasformati. La forma irregolare dei dischetti è dovuta alla loro parziale essiccazione dopo il trattamento con etanolo per la rimozione dei pigmenti fogliari (cfr. § 3.4.4); in seguito è stato introdotto l'uso di una soluzione di acqua e glicerolo per meglio conservare i dischetti e preservarne la forma.

Il promotore RBS è tessuto specifico e luce inducibile (Dean e Leech, 1982); per mettere a confronto la differenza rispetto a un promotore a più ampio spettro come 35S è stato effettuato un saggio istochimico su campioni di radici provenienti da piante trasformate con i tre costrutti citati.

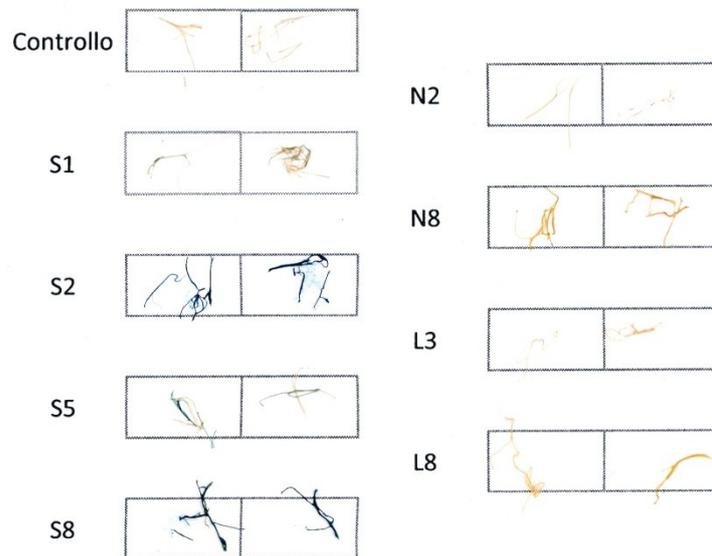


Figura 4.85 Saggio GUS istochimico condotto su radici di piante trasformate

Come atteso, solamente radici appartenenti a piante trasformate dove il gene GUS posto è sotto il controllo del promotore 35S_{LLTCK} (S1, S2, S5, S8) mostrano una colorazione blu, mentre le altre (N2, N8, L3, L8) non mostrano segni di viraggio (Figura 4.85).

Sono stati effettuati saggi GUS istochimici anche per le piante portanti i costrutti:

- pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_RBster (SR)
- pSTART_RBSnat_GUS_RBster (NR)
- pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_RBster (LR)

La Figura 4.86 mostra un saggio istochimico per i costrutti portanti RBster in cui è stato utilizzato un supporto diverso rispetto al saggio mostrato precedentemente. I saggi GUS istochimici sono serviti per valutare qualitativamente lo stato di trasformazione delle piante poste in coltura in idroponica.

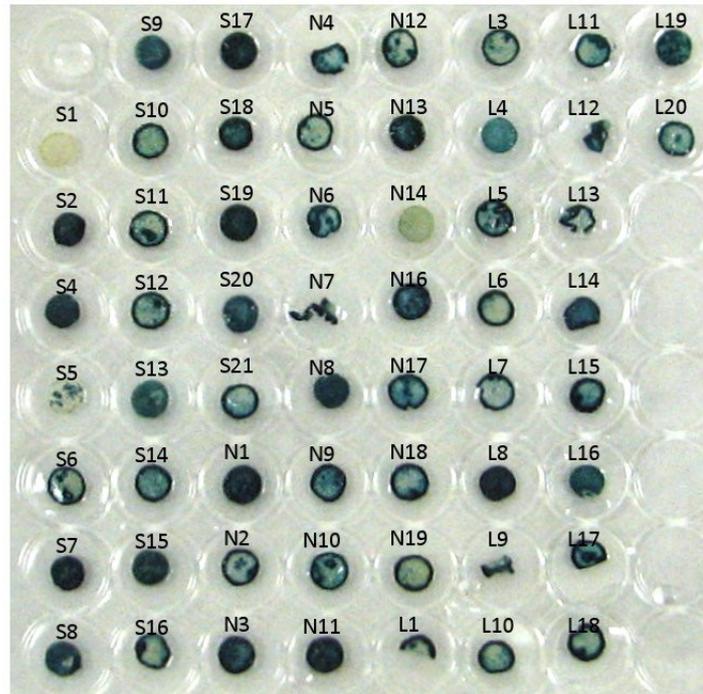


Figura 4.86 Saggio GUS istochimico su dischetti fogliari per piante trasformate con i costrutti pSTART_35S_{LLTCK} / RBSnat / RBS_{LLTCK}_GUS_RBster

Per valutare quantitativamente l'espressione del gene GUS nei trasformati, sono stati condotti saggi fluorimetrici su succo derivato dalla spremitura delle prime tre foglie completamente distese (A, B e C) di piante cresciute in idroponica per tre settimane. I valori di attività specifica per la β -glucuronidasi, espressi in millimoli di 4-MU prodotto (cfr. § 3.4.6), sono stati normalizzati in relazione alla concentrazione proteica totale calcolata mediante saggio Bradford. Di seguito sono presentati i grafici riportanti i dati ottenuti per le singole foglie e per le piante (calcolata come la media dei valori ottenuti per le tre foglie).

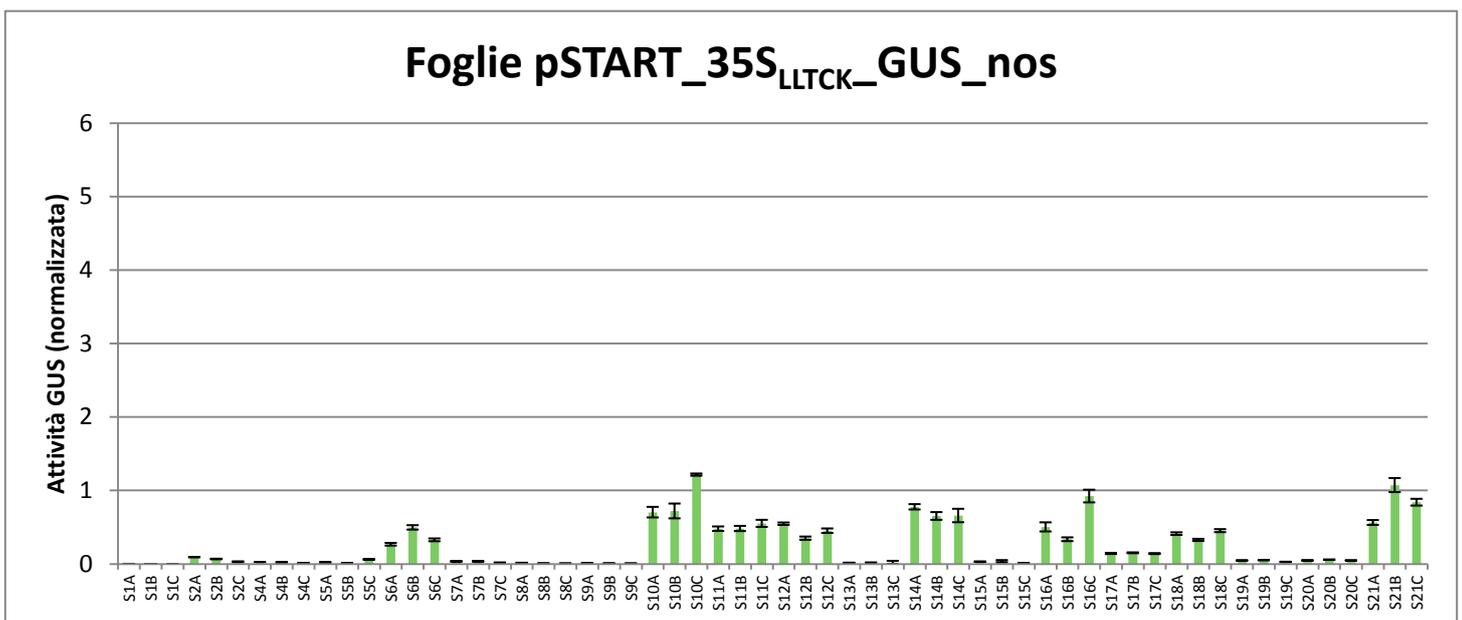


Figura 4.87 Saggio GUS su foglie pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos

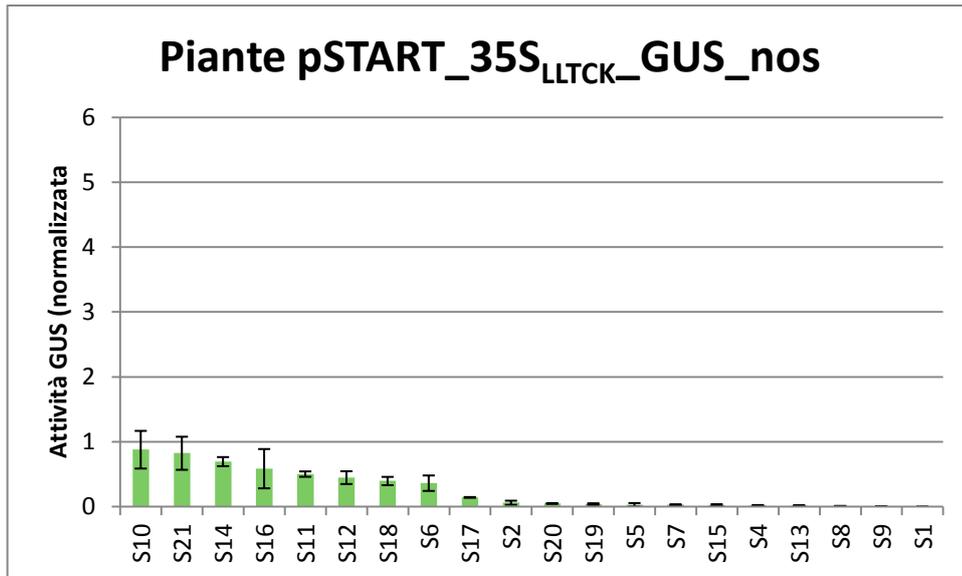


Figura 4.88 Saggio GUS, media per pianta (pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos)

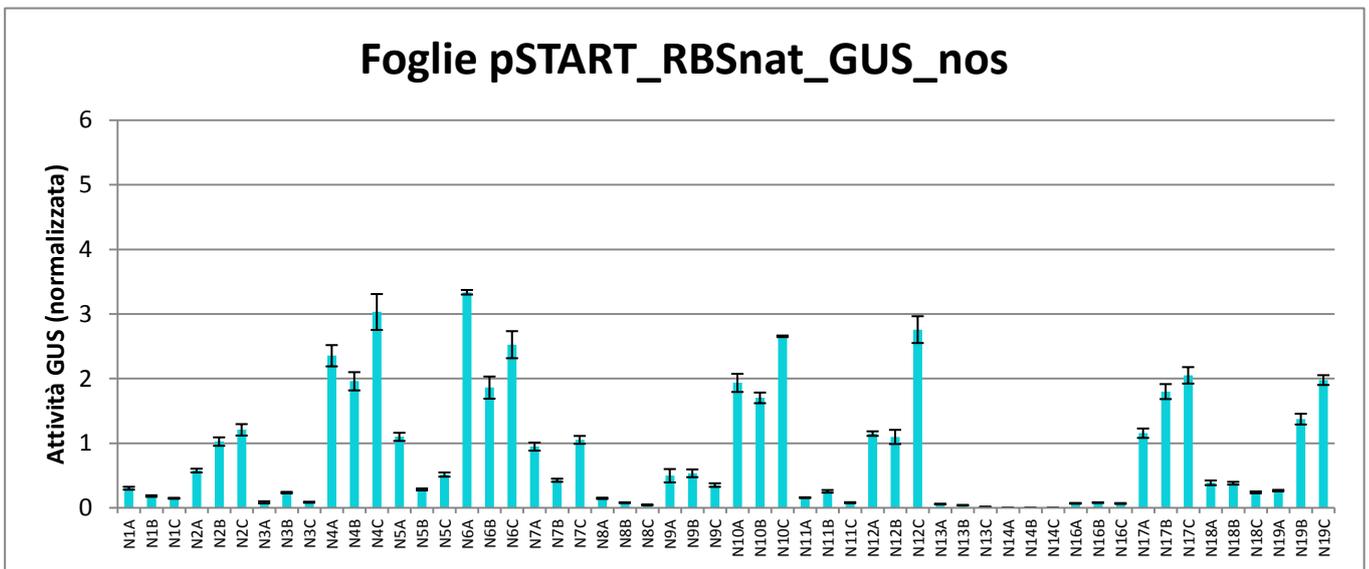


Figura 4.89 Saggio GUS su foglie pSTART_RBSnat_GUS_nos

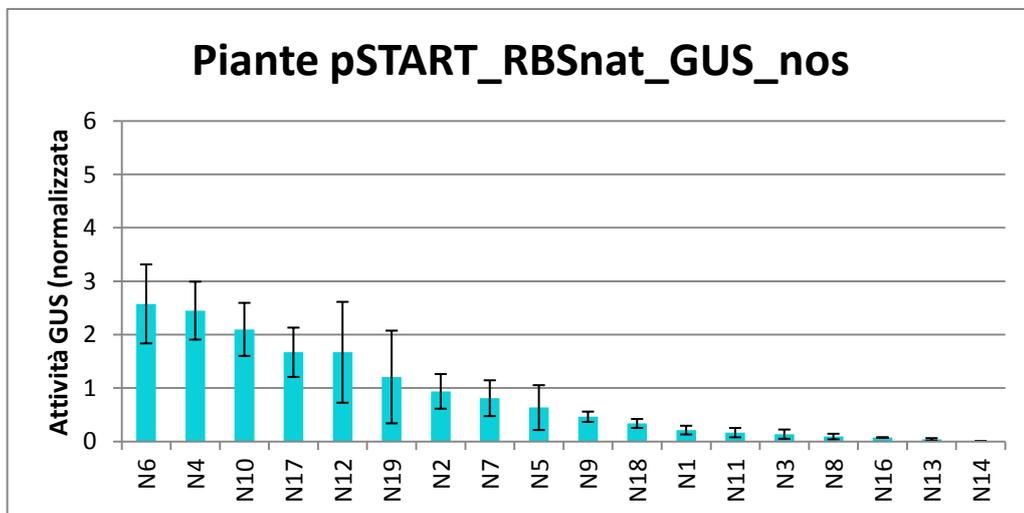


Figura 4.90 Saggio GUS, media per pianta (pSTART_RBSnat_GUS_nos)

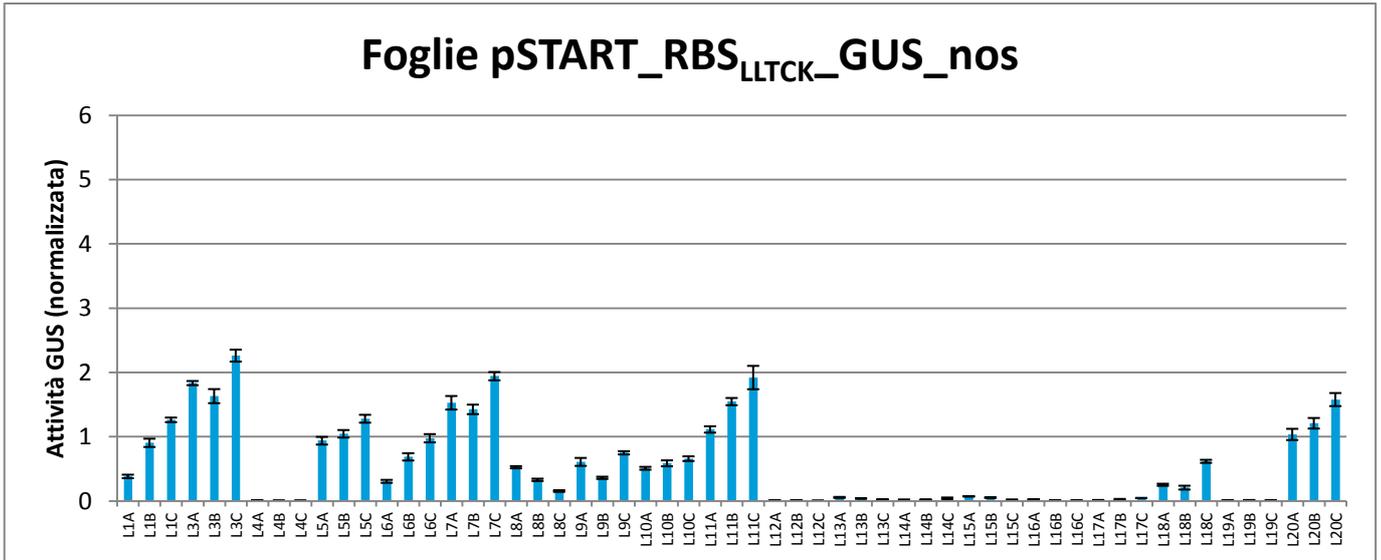


Figura 4.91 Saggio GUS su foglie pSTART_RBS_{LLTK}_GUS_nos

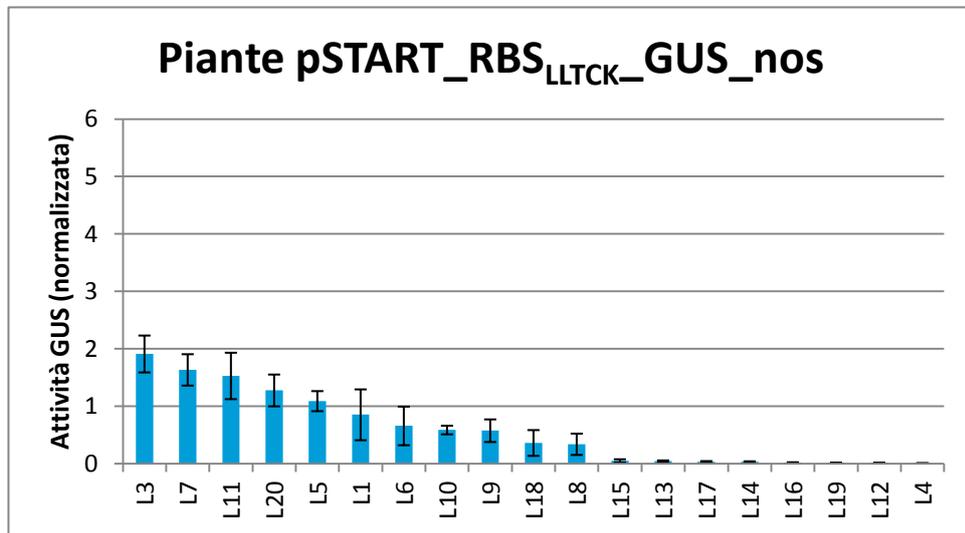


Figura 4.92 Saggio GUS, media per pianta (pSTART_RBS_{LLTK}_GUS_nos)

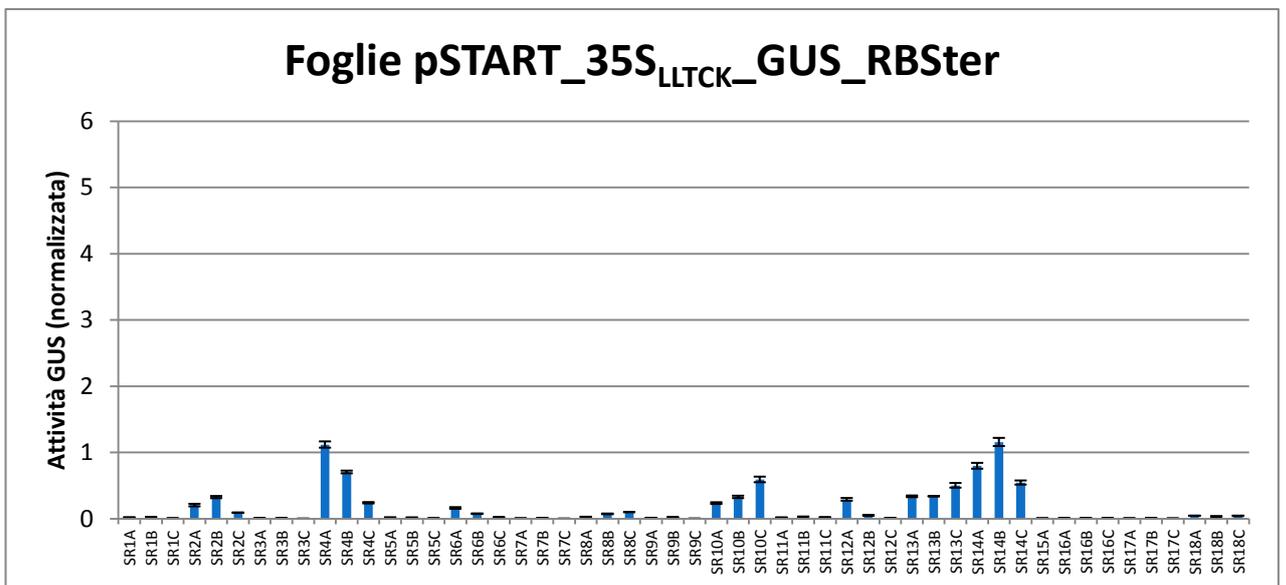


Figura 4.93 Saggio GUS su foglie pSTART_35S_{LLTK}_GUS_RBster

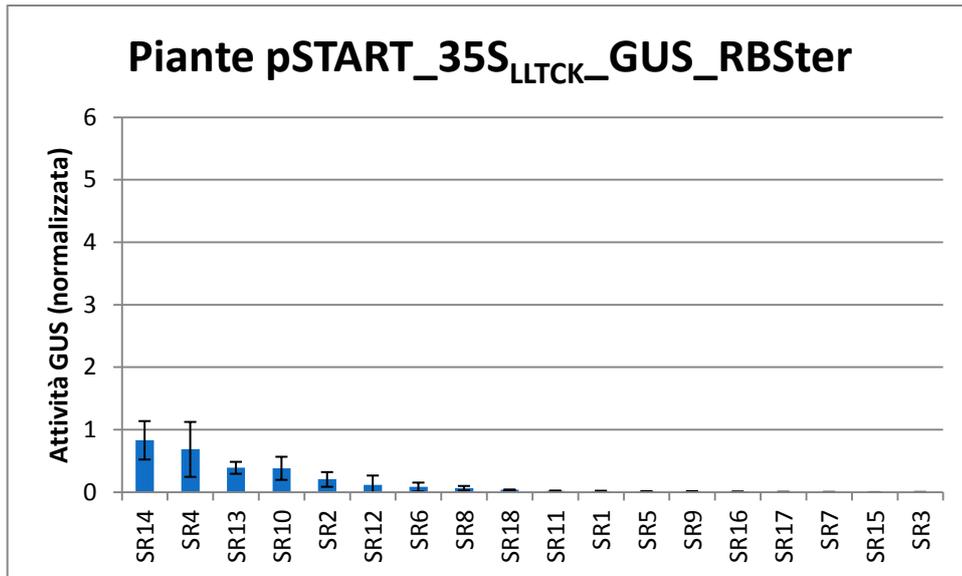


Figura 4.94 Saggio GUS, media per pianta (pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_RBSt)

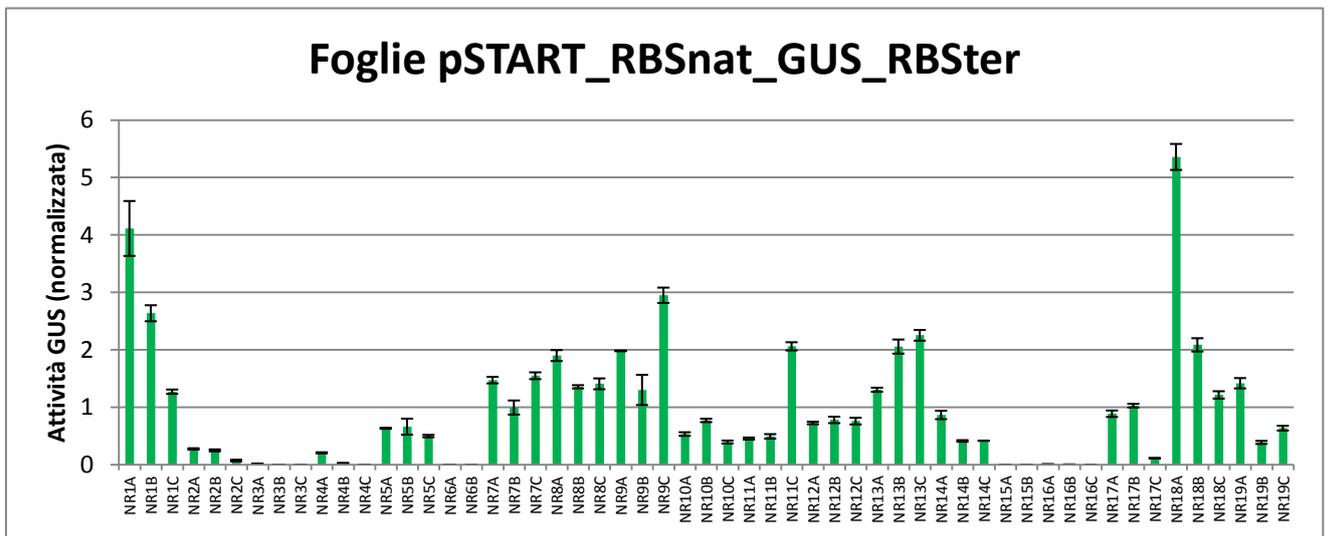


Figura 4.95 Saggio GUS su foglie pSTART_RBSnat_GUS_RBSt

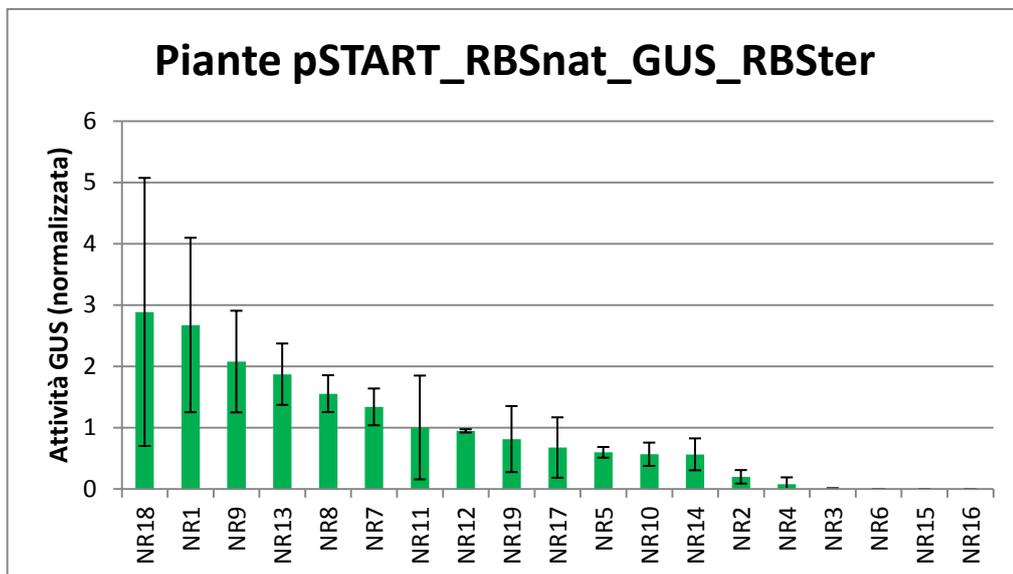


Figura 4.96 Saggio GUS, media per pianta (pSTART_RBSnat_GUS_RBSt)

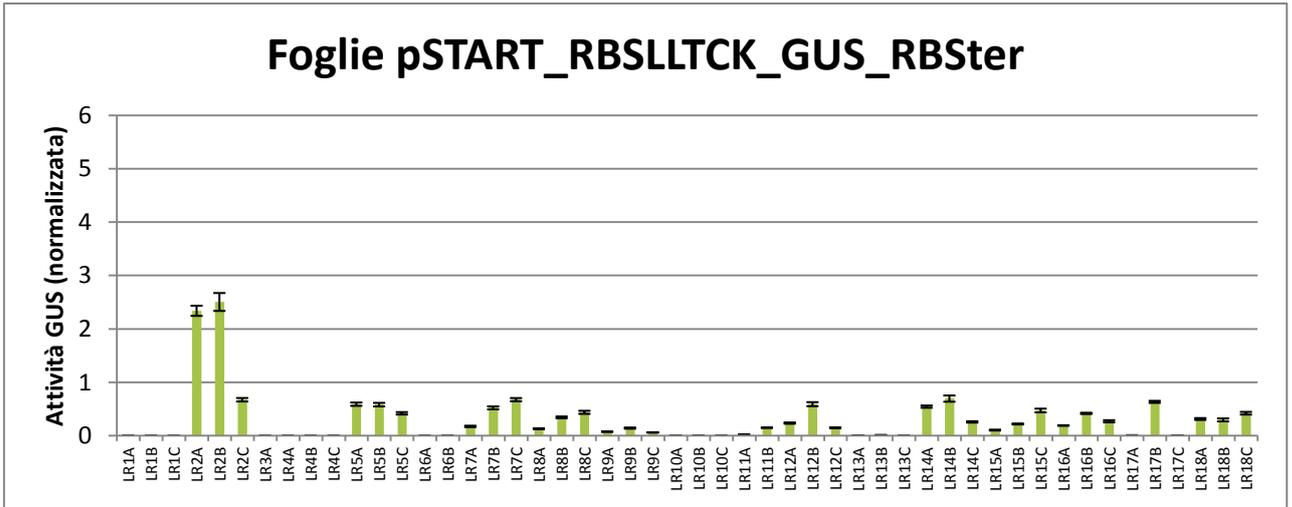


Figura 4.97 Saggio GUS su foglie pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_RBster

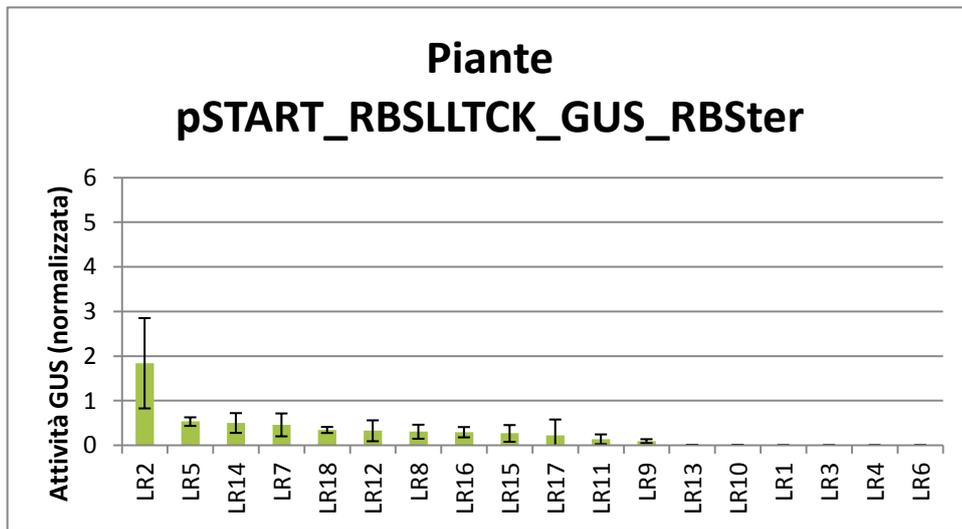


Figura 4.98 Saggio GUS, media per pianta (pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_RBster)

È stata effettuata un'analisi della varianza (ANOVA) considerando popolazioni costituite sia dalle singole foglie trasformate che dalla media per pianta. A causa della mole di dati, si ritiene opportuno riportare nelle comparazioni a coppie di costrutti solamente i valori di correlazione e significatività statistica.

RIEPILOGO						
<i>Gruppi</i>	<i>Conteggio</i>	<i>Somma</i>	<i>Media</i>	<i>Varianza</i>		
Sf	60	15,416	0,256933	0,098021		
Nf	54	46,73434	0,865451	0,861119		
Lf	57	33,01849	0,579272	0,416522		
SRf	52	8,677799	0,166881	0,076855		
NRf	55	52,99087	0,96347	1,139646		
LRf	50	15,8161	0,316322	0,242608		
ANALISI VARIANZA						
<i>Origine della variazione</i>	<i>SQ</i>	<i>gdl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valore di significatività</i>	<i>F crit</i>
Tra gruppi	30,15819	5	6,031639	12,76948	0,0000000000246456	2,242025
In gruppi	152,0961	322	0,472348			
Totale	182,2543	327				

Figura 4.99 ANOVA per popolazioni di dati relativi alle singole foglie (Sf, Nf...) per ciascun costrutto

RIEPILOGO						
<i>Gruppi</i>	<i>Conteggio</i>	<i>Somma</i>	<i>Media</i>	<i>Varianza</i>		
Sp	20	5,138668	0,256933	0,091711		
Np	18	15,57811	0,865451	0,76239		
Lp	19	11,00616	0,579272	0,399038		
SRp	18	2,894922	0,160829	0,06314		
NRp	19	17,8534	0,939653	0,822215		
LRp	18	5,348227	0,297124	0,182829		
ANALISI VARIANZA						
<i>Origine della variazione</i>	<i>SQ</i>	<i>gdl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valore di significatività</i>	<i>F crit</i>
Tra gruppi	10,15956	5	2,031913	5,270312	0,000231037	2,300053
In gruppi	40,86717	106	0,385539			
Totale	51,02674	111				

Figura 4.100 ANOVA per popolazioni di dati relativi alla media per pianta (Sp, Np...) per ciascun costrutto

L'analisi su tutti i gruppi analizzati (ciascuno corrispondente a uno dei sei costrutti "RBS") mostra sia considerando le singole foglie (Figura 4.99) che la media per pianta (Figura 4.100) una diversità statisticamente significativa all'interno della popolazione ($F > F_{crit}$; valore di significatività o P-value < 0.05). Per valutare esattamente gli effetti degli elementi promotore, terminatore e 5'-UTR, sono state effettuate analisi a coppie.

Abbreviazioni:

- pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos → S
- pSTART_RBSnat_GUS_nos → N
- pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_nos → L
- pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_RBster → SR
- pSTART_RBSnat_GUS_RBster → NR
- pSTART_RBS_{LLTCK}_GUS_RBster → LR

Promotori a confronto	F-Value (foglie)	F-crit (foglie)	P-Value (foglie)	F-Value (piante)	F-crit (piante)	P-Value (piante)	Differenza significativa
S + N	22,9219	3,925834	0,000005199	8,5893	4,1132	0,0058408	Sì
S + L	11,99893	3,923598	0,00074871	4,1969	4,1055	0,0476417	Sì
N + L	3,589399	3,928195	0,06079925	1,3153	4,1213	0,2592106	No
SR + NR	27,20579	3,931556	0,00000092452	12,362	4,1213	0,0012328	Sì
SR + LR	3,601251	3,936143	0,06062041119	1,3594	4,13	0,2517541	No
NR + LR	15,38588	3,933336	0,00015827846	7,4582	4,1213	0,0098233	Sì

Tabella 4.10 ANOVA per il confronto fra promotori; si ritiene esistere una diversità significativa fra le due popolazioni se $F > F_{crit}$ e $P\text{-Value} < 0.05$

La comparazione a coppie fra promotori è stata svolta solamente fra costrutti che portano lo stesso terminatore. I risultati ottenuti dall'ANOVA per foglie e per piante hanno dato risultati concordanti. Dalla Tabella 4.10 e dai grafici riportati in precedenza risulta che il promotore RBS porta a livelli di espressione sicuramente maggiori rispetto a $35S_{LLTCK}$ in presenza di terminatore nos, con una differenza più significativa per RBS_{nat}; fra RBS_{nat} e RBS_{LLTCK} non è stata trovata alcuna differenza significativa in presenza di terminatore nos. Paragonando i costrutti portanti RBS_{ter}, il promotore $35S_{LLTCK}$ è risultato ugualmente svantaggiato rispetto a RBS_{nat}; diversamente da quanto visto per nos, RBS_{nat} è significativamente superiore a RBS_{LLTCK}.

Terminatori a confronto	F-Value (foglie)	F-crit (foglie)	P-Value (foglie)	F-Value (piante)	F-crit (piante)	P-Value (piante)	Differenza significativa
S + SR	1,010018	3,940163	0,31742492073	1,1186	4,1132	0,297256	No
N + NR	0,261351	3,929844	0,61024661389	0,1822	4,13	0,672143	No
L + LR	5,491512	3,931556	0,02099259528	2,5026	4,1213	0,122652	No

Tabella 4.11 ANOVA per il confronto fra terminatori; si ritiene esistere una diversità significativa fra le due popolazioni se $F > F_{crit}$ e $P\text{-Value} < 0,05$

La tabella Tabella 4.11 mostra chiaramente come, comparando a coppie costrutti con lo stesso promotore per saggiare la diversità a livello di terminatore, non emergano differenze significative.

4.4.5 CONFRONTO FRA VETTORI pSTART E pCAMBIA

Il confronto fra la serie di vettori pSTART e pCAMBIA ha portato all'analisi a livello genomico dei trasformati, per verificare se alle variazioni riscontrate nella fase di trasformazione (cfr. § 4.3.5) corrispondano problemi a livello di trasferimento e integrazione del T-DNA. Sono quindi state

effettuate estrazioni di DNA genomico e successive analisi per la verifica della presenza del transgene tramite PCR.

La prima comparazione diretta fra i due costrutti è data dalla trasformazione parallela di pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos e pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos. Sulle piante messe in idroponica e sui germogli rigenerati non trasferiti (Tabella 4.8) è stata effettuata l'amplificazione del tratto comune corrispondente alla prima porzione di GUS, per 463 bp. Un secondo evento di trasformazione ha visto invece la comparazione fra pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos, pCAMBIA2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos e pCAMBIA2301. Anche in questo caso è stata effettuata una PCR su DNA genomico, ma solamente sulle plantule radicate (amplificato atteso: 463 bp per GUS, 619 bp per GUSintr portato da pCAMBIA2301).

Come si può vedere in Figura 4.101 e Figura 4.103, tutte le piante trasformate con pSTART portano il transgene; l'amplificato è presente in una singola banda al peso molecolare corretto. È stato invece riscontrato (Figura 4.102, Figura 4.103) che i vettori con backbone pCAMBIA, pur portando all'inserzione della cassetta di interesse nel genoma vegetale nella maggior parte dei casi, danno un profilo di amplificazione anomalo, segno forse di riarrangiamenti a livello del transgene nel genoma della pianta trasformata.

Va osservato che la qualità del DNA amplificato è standard, poiché estratto con kit Promega mediante lo strumento Maxwell® 16 e non con procedimenti manuali.

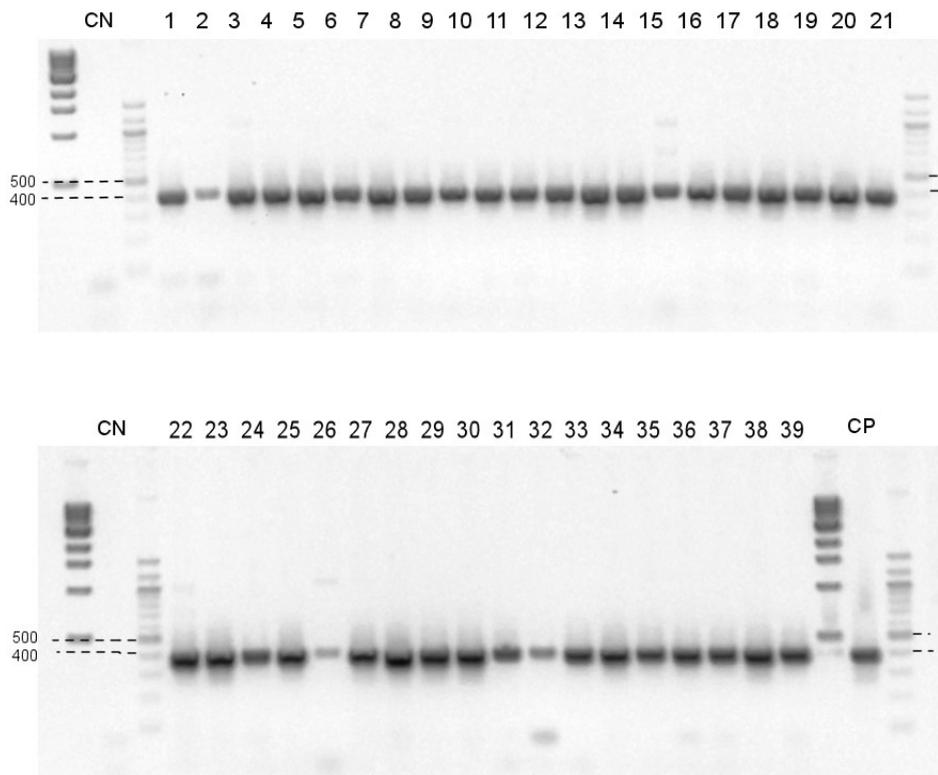


Figura 4.101 PCR su DNA genomico per piante trasformate con pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos

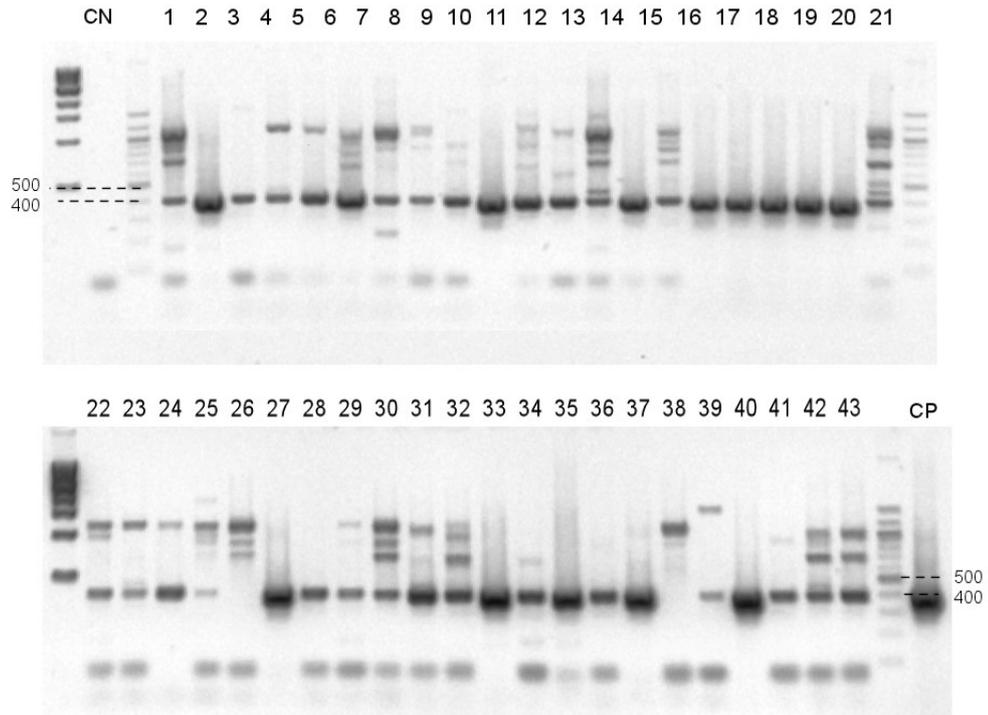


Figura 4.102 PCR su DNA genomico per piante trasformate con **Cambia2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos**

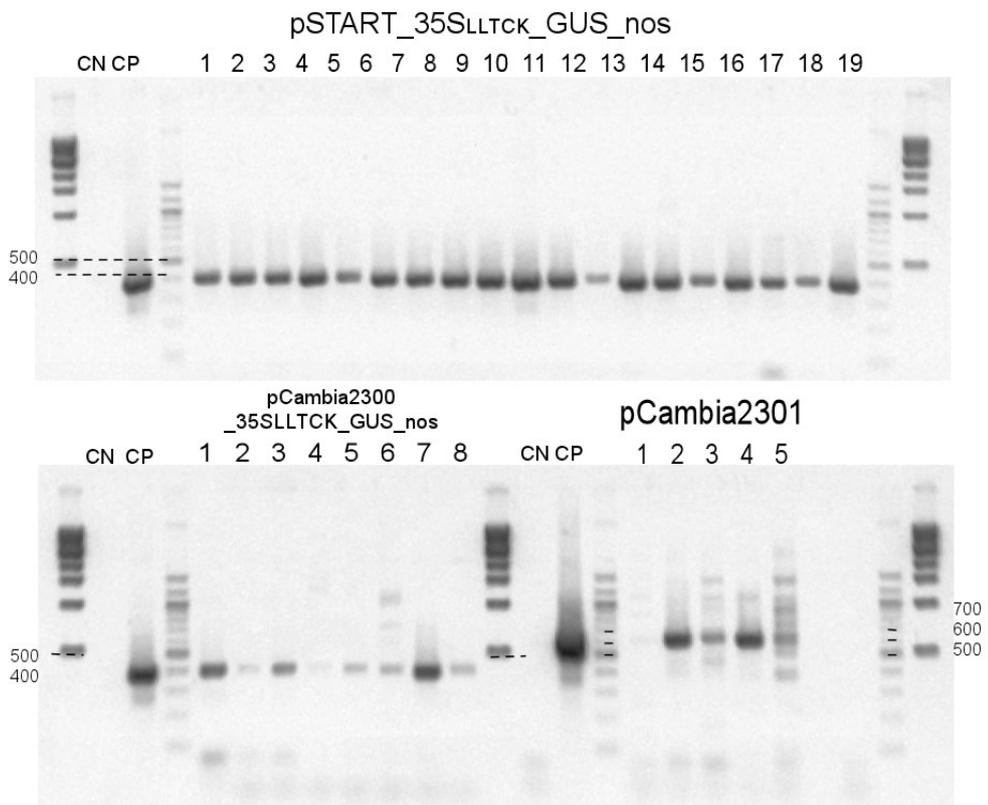


Figura 4.103 PCR su DNA genomico per **pSTART_35S_{LLTCK}_GUS_nos**, **pCambia2300_35S_{LLTCK}_GUS_nos** e **pCambia2301**

Nella prima delle due trasformazioni effettuate per paragonare pSTART e pCAMBIA, le piante trasformate ottenute sono state coltivate in idroponica. Sulle piante in fase di crescita è stato possibile effettuare saggi GUS istochimici (Figura 4.104) ed enzimatici (Figura 4.105, Figura 4.106, Figura 4.107, Figura 4.108) per verificare la presenza della proteina GUS in forma attiva.

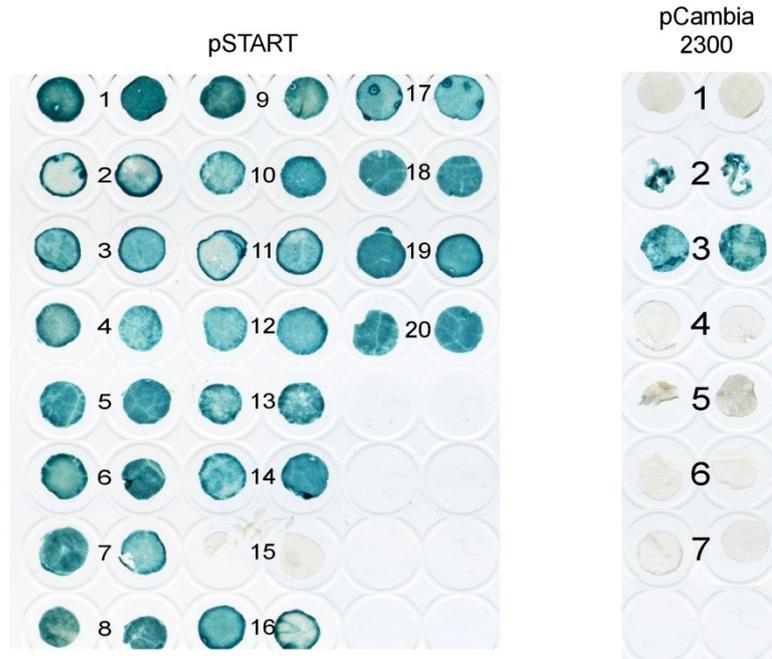


Figura 4.104 Saggio GUS istochimico su dischetti fogliari di piante trasformate con pSTART e pCAMBIA

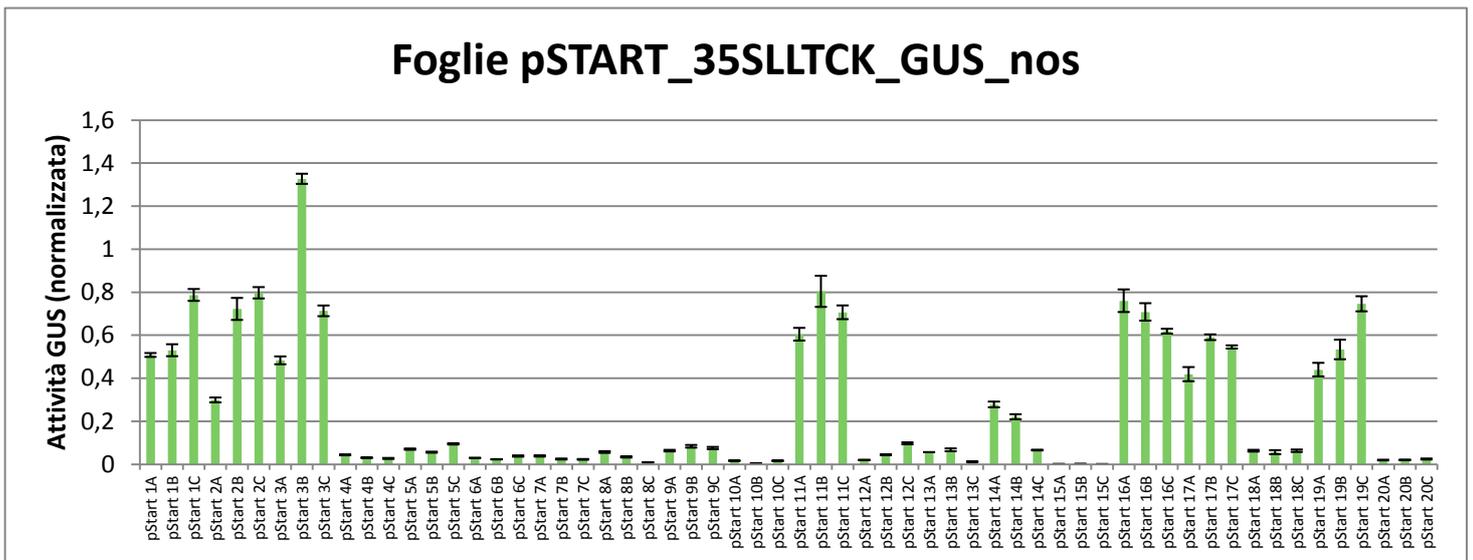


Figura 4.105 Saggio GUS su foglie pSTART_35SLLTCK_GUS_nos

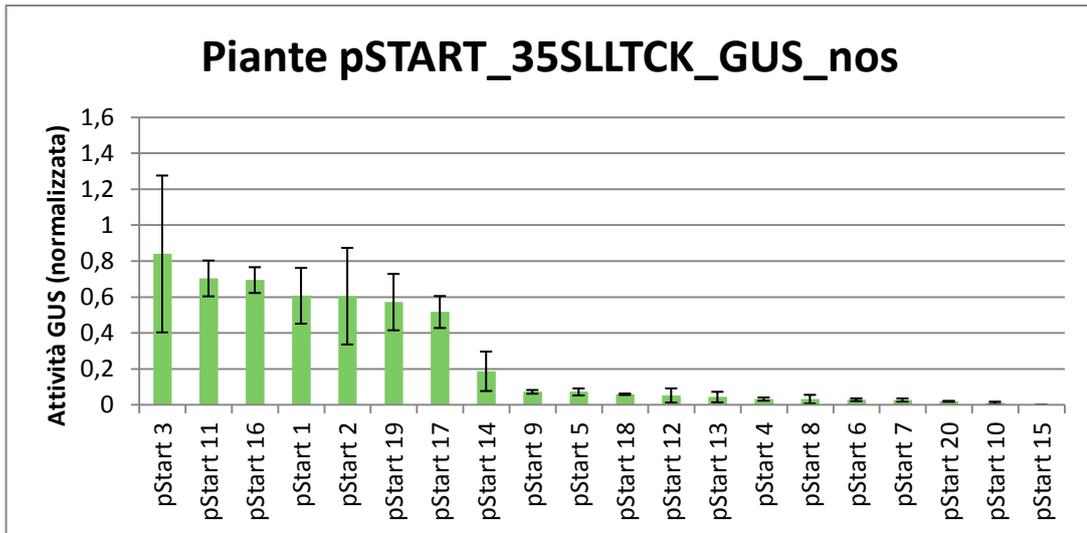


Figura 4.106 Saggio GUS, media per pianta (pSTART_35LLTCK_GUS_nos)

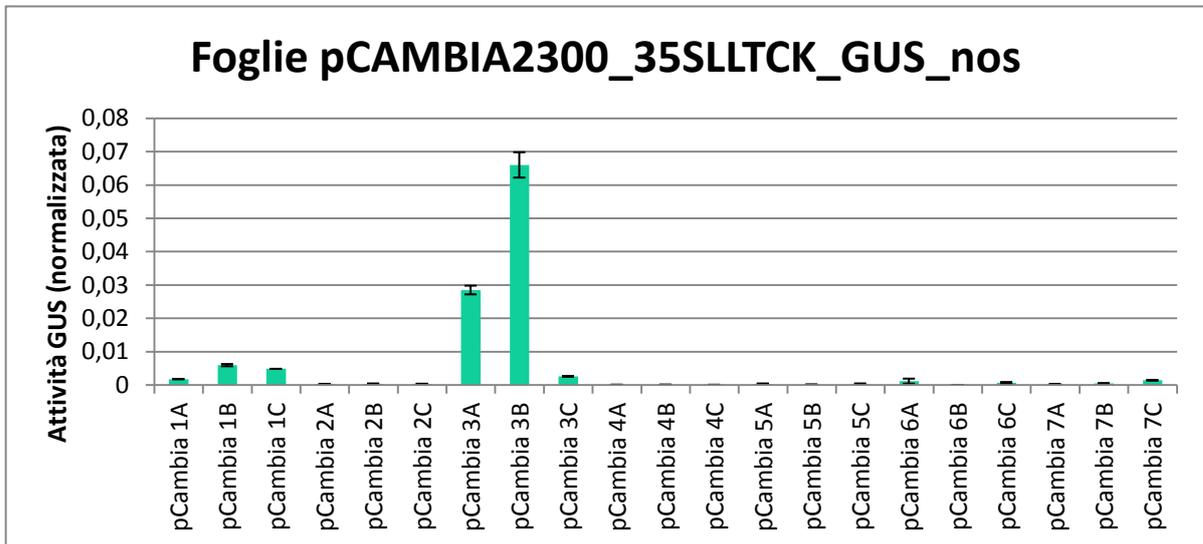


Figura 4.107 Saggio GUS su foglie pCAMBIA2300_35LLTCK_GUS_nos

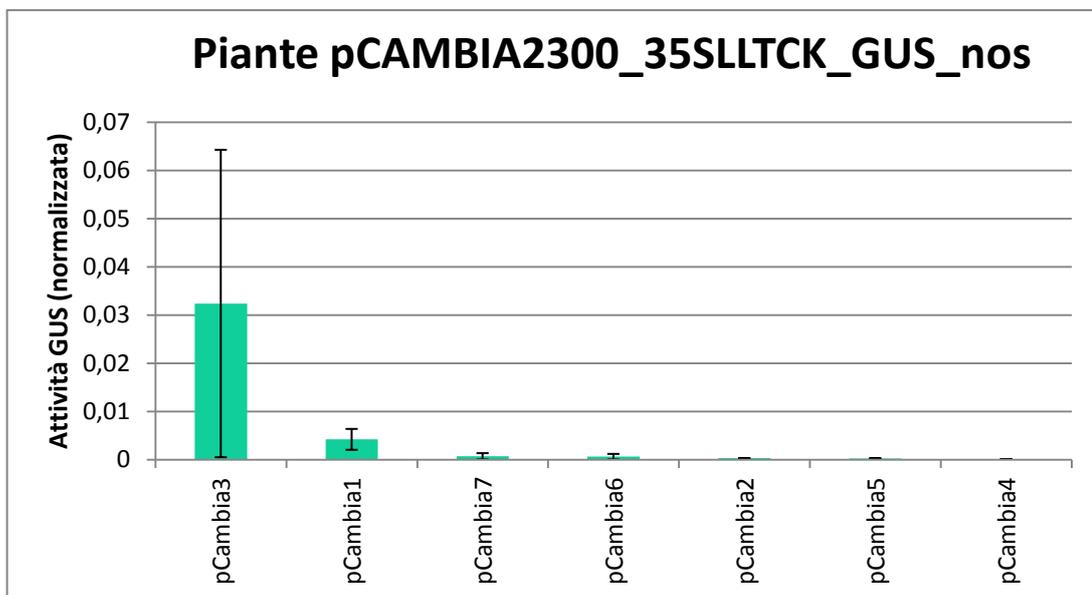


Figura 4.108 Saggio GUS, media per pianta (pCAMBIA2300_35LLTCK_GUS_nos)

Come appare evidente dalle figure e grafici sopra riportati, le piante trasformate con il costrutto pSTART si comportano in saggio rispecchiando i risultati già osservati (cfr. § 4.4.4); pCAMBIA2300 invece mostra, laddove presenti, livelli di espressione estremamente bassi.

Visti i risultati ottenuti in fase di trasformazione, rigenerazione, crescita e analisi dell'espressione dei trasformati, si conclude che il backbone vettoriale migliore è senza dubbio costituito da pSTART.

4.4.6 VALIDAZIONE DI GUSintr

La validazione del funzionamento della versione chimerica di GUS portante l'introne della catalasi di *Ricinus communis* assemblata in questa tesi (cfr. § 4.2.12) è stata verificata su poche piante ottenute da un singolo evento di trasformazione mediante saggio GUS istochimico, puramente qualitativo.

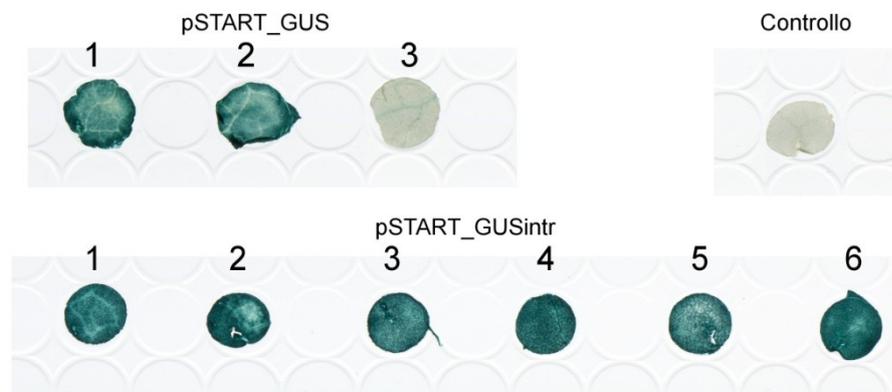


Figura 4.109 Saggio GUS istochimico su trasformati portanti GUS e GUSintr

Come si può vedere in Figura 4.109, i dischetti GUSintr sono indistinguibili da quelli GUS. Si deduce che la proteina viene correttamente espressa dal gene di fusione creato, ed è perfettamente funzionante.

4.4.7 PROVE DI AGROINFILTRAZIONE

I primi saggi GUS fluorimetrici effettuati su estrazioni da singoli dischetti fogliari hanno dato esito negativo; i valori di fluorescenza registrati per i campioni si sono infatti dimostrati molto piccoli, decisamente al di sotto dell'intervallo di calibrazione standard utilizzato per i saggi GUS da estratti totali fogliari. Queste prove da dischetti fogliari sono state effettuate alle stesse condizioni di incubazione dei campioni scelte per i saggi GUS da estratto di foglia totale: 10 μ L di estratto + 130 μ L di soluzione MUG 1.2 mM in incubazione per 1h a 37°C.

Alla luce di ciò sono state effettuate prove di estrazione di GUS e GUSintr da dischetti fogliari prelevati da piante stabilmente trasformate (cfr. § 4.3.6), che hanno però dato i medesimi risultati (Figura 4.110; i campioni transienti saggianti derivano da AI con pSTART_35S_{LLTCK}_GUSintr_nos). Il problema è stato quindi identificato non nella tecnica di agroinfiltrazione, ma nel metodo utilizzato per la rivelazione dell'espressione transitoria.

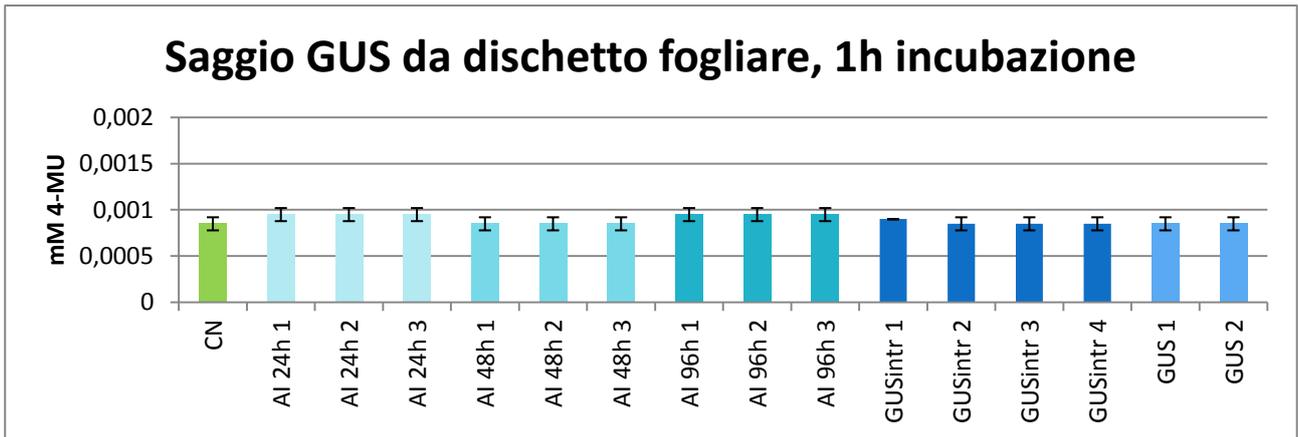


Figura 4.110 Saggio GUS fluorimetrico da dischetti fogliari: da controllo negativo (CN), da agroinfiltrazione (AI) prelevati a 24, 48 o 96h e da trasformazione stabile (GUSintr, GUS)

È stata quindi richiesta innanzitutto una diversa calibrazione delle condizioni di saggio, passando da una curva di riferimento con valori di concentrazioni di 4-MU 1mM e diluizioni successive (range: 0.5 → 0.03125 mM) a un intervallo 160 volte inferiore (range: 0.003125 → 0.0003906 mM) (Figura 4.111).

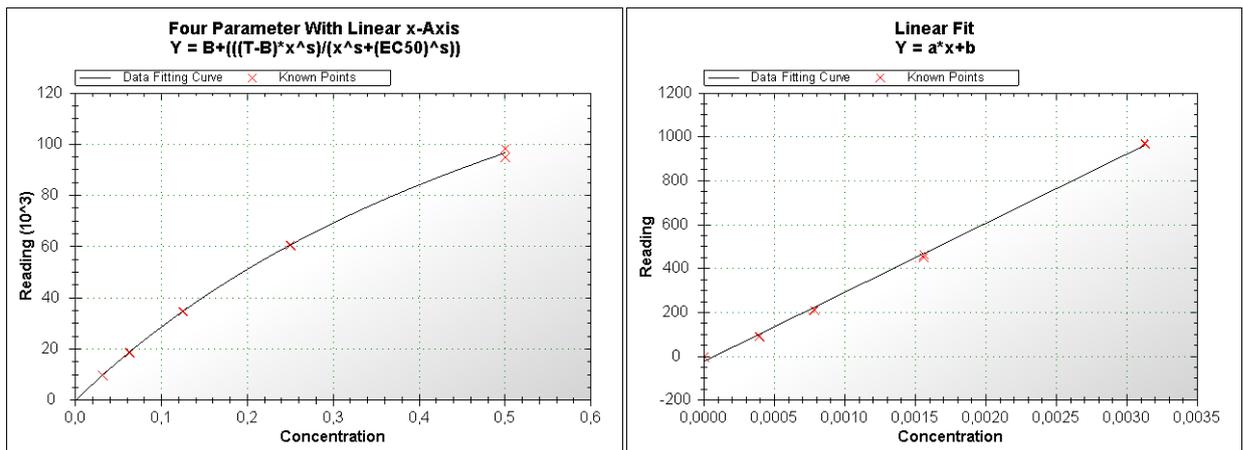


Figura 4.111 Grafici delle curve di calibrazione 4-MU utilizzate per saggi GUS da succo fogliare (a sinistra) e dischetto fogliare (a destra); il tipo di curva è diverso poiché nell'intervallo inferiore si è nel range di linearità della curva 4-MU

Visualizzati in maniera più corretta i valori di saggio, si è visto che i dati relativi ai dischetti provenienti da prelievi fogliari effettuati a 24, 48 e 96h dall'agroinfiltrazione risultavano comunque indistinguibili dai controlli, sia lasciando in incubazione la reazione per 1h sia per 2h.

Il saggio GUS da dischetto fogliare è attualmente in fase di settaggio. Il limite di questo saggio dipende dall'impossibilità, alle condizioni attuali, di risolvere correttamente valori al di sotto dei 0.0005 mM 4-MU, attorno a cui si attestano generalmente le concentrazioni rilevate per i campioni utilizzati.

Le prove che hanno dato finora i migliori risultati prevedono l'utilizzo di dischetti prelevati dopo almeno 48h dall'agroinfiltrazione, quantità maggiori di estratto (dai 10 µL utilizzati prima a 50-100 µL) e tempi di incubazione delle reazioni superiori a 6h (Figura 4.112). Parallelamente, i volumi di

reazione vogliono essere mantenuti bassi (<300 μ L) per poter permettere la fattibilità del saggio su piastra da 96 well.

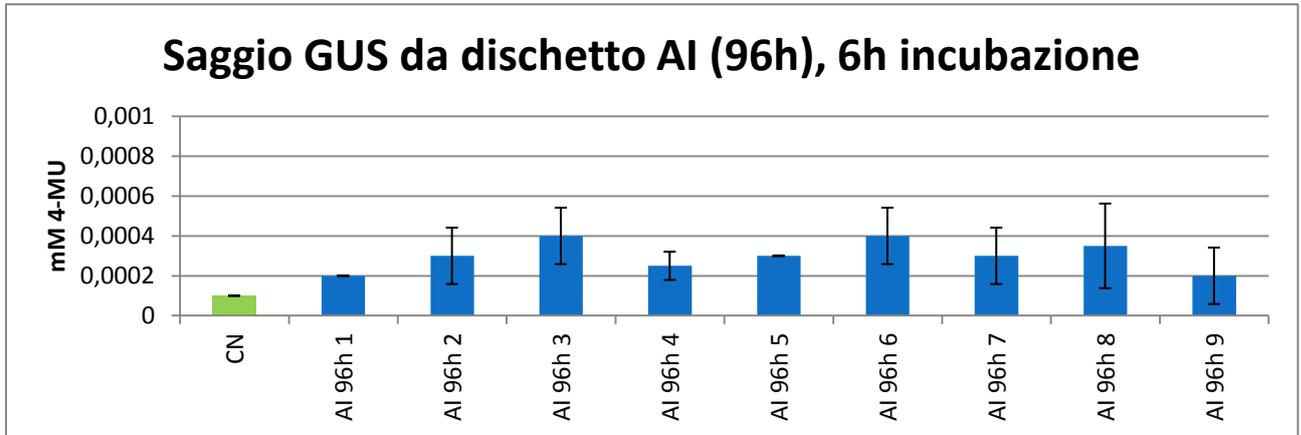


Figura 4.112 Saggio GUS fluorimetrico da dischetti fogliari da controllo negativo (CN) e da agroinfiltrazione (AI) prelevati a 96h; questi risultati sono incoraggianti anche se ancora non validi (si notino le barre di errore presenti nei campioni da AI)

La validità della tecnica di agroinfiltrazione è stata comunque dimostrata tramite una valutazione diretta dei valori di fluorescenza registrati per i campioni prelevati. L'elaborazione dei dati con le curve di calibrazione testate fin'ora tende infatti ad appiattire le reali differenze riscontrate in questi valori, rendendoli poco rappresentativi della condizione reale.

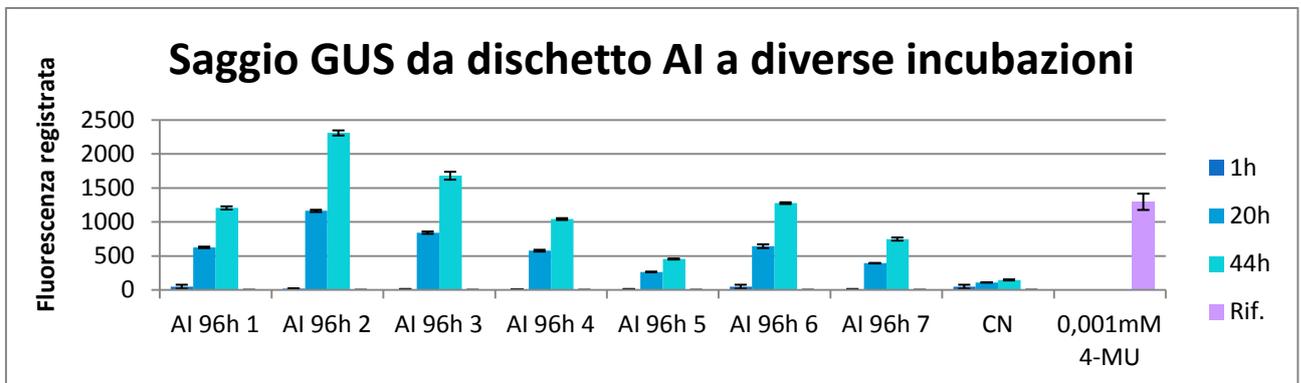


Figura 4.113 Saggio GUS fluorimetrico da dischetti fogliari da controllo negativo (CN) e da agroinfiltrazione (AI) prelevati a 96h; reazioni lasciate in incubazione per 1h, 20h e 44 h

Come si può vedere in Figura 4.113 occorrono tempi di incubazione molto lunghi per poter ottenere livelli di fluorescenza accettabili (attorno a 0.001 mM 4-MU); la presenza di enzima GUS derivato da agroinfiltrazione è comunque convalidata, poiché l'incremento notato a 20 e 44h di incubazione è sicuramente superiore a quello registrato nel controllo negativo (rumore di fondo), dato dall'attività enzimatica basale della componente fogliare.

4.5 VERIFICA DELL'INTEGRITÀ DELLA MOLECOLA PRODOTTA

Sebbene la tecnica ELISA sia, per sensibilità e specificità, adatta a dimostrare la presenza della molecola vaccino nella pianta, per assicurarsi della sua integrità è necessario eseguire un'elettroforesi su gel di poliacrilammide. È stata quindi allestita una tecnica di immunoprecipitazione, che sfrutta un anticorpo specifico per isolare la proteina riconosciuta da una soluzione che contiene una miscela di proteine; qui viene impiegata per isolare una forma di vaccino (Va-KDEL) da un estratto totale da foglia.

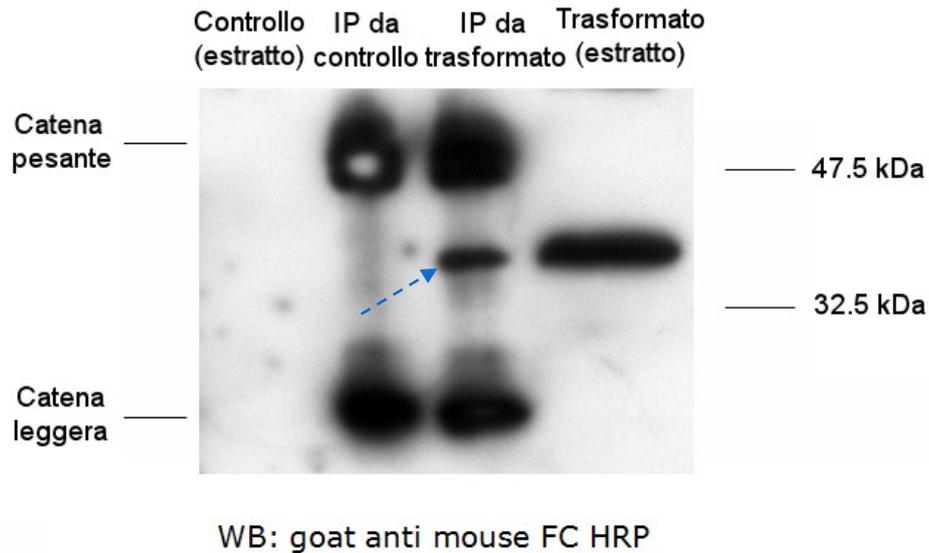


Figura 4.114 Immunoprecipitazione (IP) da estratto Va-KDEL

Come si può vedere (Figura 4.114), l'immunoprecipitazione è riuscita; il minibody immunoprecipitato (freccia) presenta un peso molecolare apparente di ~40 kDa, coerentemente con quanto predetto dall'analisi bioinformatica della sequenza (cfr. § 4.1.2). Si possono notare le catene pesanti e leggere dell'Ig utilizzata per l'immunoprecipitazione, dal peso molecolare rispettivamente di ~55 kDa e ~20 kDa.

4.6 PROVE PRELIMINARI DI PURIFICAZIONE

Procedimenti di purificazione da tabacco per molecole simil-anticorpali sono già stati sviluppati esternamente a questa tesi; in riferimento ai vaccini, è stata messa a punto una procedura di purificazione basata su resine cromatografiche a scambio ionico, ad interazioni idrofobiche e di gel filtration.

Basandosi sulle proprietà di molte molecole batteriche (come la proteina A) di legare selettivamente domini anticorpali, sono state effettuate prove preliminari di purificazione del minibody mediante cromatografia di affinità. Sebbene il legame della proteina A per porzioni costanti anticorpali murine e umane sia noto (cfr. § 3.4.10), essendo il minibody una molecola chimerica si ha la necessità di saggiare nello specifico l'effettivo funzionamento di questa metodologia.

Sono state effettuate tre prove su un estratto chiarificato e filtrato derivato da un trasformato Va-KDEL, in modo da caricare il campione in colonna in diverse condizioni di pH e forza ionica, fattori condizionanti il legame alla resina derivatizzata con proteina A.

Per ogni campione sono state raccolte frazioni cromatografiche relative a:

- il carico in colonna;
- il flow-through (FT), ovvero l'insieme delle sostanze non leganti la colonna, che viene espulso da essa durante la fase di carico;
- l'eluato, ovvero ciò che si era legato alla colonna e perde affinità per essa con la variazione delle condizioni fisico-chimiche del tampone cromatografico utilizzato.

I cromatogrammi registrati per le prove effettuate indicano la fuoriuscita della totalità delle proteine nel flow-through; non è apparso alcun picco evidente in fase di eluizione.

È stato quindi eseguito un saggio ELISA su frazioni cromatografiche relative alla fase di carico, flow-through ed eluizione della colonna.

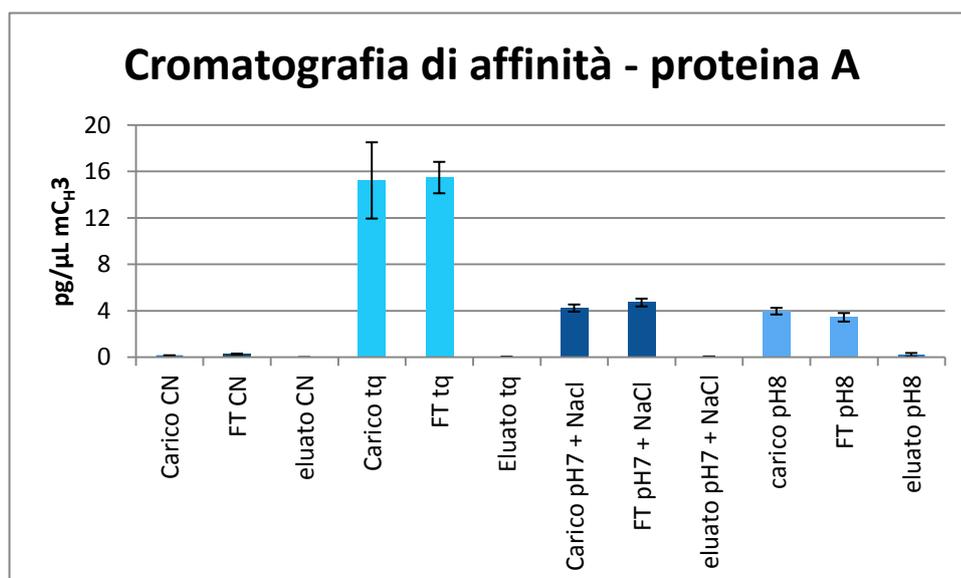


Figura 4.115 ELISA su campioni cromatografici
CN: controllo negativo – tq: tal quale – FT: flow-through

Come si può vedere nella Figura 4.115, ciascuna prova cromatografica effettuata ha dato il medesimo risultato: alle condizioni saggate, il minibody Va-KDEL non si lega alla colonna derivatizzata con proteina A.

5. DISCUSSIONE

5.1 RISULTATI OTTENUTI E PROSPETTIVE FUTURE

Questa tesi ha avuto come obiettivo quello di verificare la possibilità di produzione di molecole simil-anticorpali (minibody) in pianta, ricercare strategie di miglioramento del sistema di espressione e valutarne le potenzialità.

5.1.1 ESPRESSIONE DI MOLECOLE SIMIL-ANTICORPALI IN TABACCO

Le quattro versioni di minibody Va, Vb, Vc e Vd sono state prodotte con successo in *N. tabacum*, come rivelato dai dati ELISA (cfr. § 4.4.2). Il successo dell'espressione di una molecola simil-anticorpale in foglia di tabacco non stupisce, poiché vi è ampia evidenza in letteratura della produzione di molte proteine anticorpali e simil-anticorpali che impiegano questa piattaforma (De Muyenck et al., 2010). Tuttavia, prove di espressione di queste forme di minibody effettuate precedentemente a questa tesi hanno avuto esito negativo; il problema è stato individuato nella forma vettoriale allora utilizzata, in seguito a cui è stato deciso l'assemblaggio delle cassette di espressione nel vettore pSTART, la cui efficienza di trasformazione era nota.

Prove di immunolocalizzazione svolte sulla forma Va hanno inoltre rivelato un peso molecolare apparente corretto, coerente con quello predetto mediante analisi bioinformatica (cfr. § 4.1.2 e 4.5). Sarà necessario effettuare queste analisi anche sulle restanti forme di vaccino, con particolare interesse per Vc e Vd, portanti una porzione C_H3 diversa.

Non si può ancora dire nulla di certo sulla diversità di espressione rilevata fra le forme di vaccino portanti mC_H3 (Va, Vb) e hC_H3 (Vc, Vd): le condizioni di coltura sono state infatti lievemente differenti a causa di problemi legati alla tecnica di coltivazione in idroponica, allora ancora nelle ultime fasi di settaggio, che ha portato a un lieve ritardo di crescita per la seconda trasformazione effettuata (Vc-Vd) rispetto alla prima (Va-Vb). Ciononostante, le piante trasformate con le due coppie di costrutti risultavano morfologicamente sane; la divergenza riscontrata potrebbe essere quindi dovuta alle diversità nelle regioni C_H3 umano e murino, e andrà ulteriormente investigata con nuovi esperimenti di trasformazione.

5.1.2 INTRODUZIONE DI PSLYC

Nella produzione di anticorpi e molecole simil-anticorpali in pianta è stato dimostrato che il peptide segnale (PS) nativo poteva essere sostituito con un PS di origine vegetale senza interferire sulla secrezione della molecola (During et al., 1990). Alla luce di questa evidenza, si è deciso di effettuare una ricerca al fine di trovare sequenze segnale con caratteristiche potenzialmente migliori. L'analisi bioinformatica delle proprietà teoriche della molecola ha portato alla scelta della sostituzione della sequenza di indirizzamento alla via secretoria; il PS originariamente presente, di derivazione murina, nelle prove *in silico* è risultato inferiore ad alcuni PS di origine vegetale (cfr. § 4.1.4). Il nuovo PS scelto, ribattezzato PSLyc, deriva da una proteina PRP di pomodoro (*Lycopersicon esculentum*).

In molte specie vegetali la risposta all'infezione da parte di agenti patogeni come batteri, virus e funghi è accompagnata dalla sintesi di proteine, molte delle quali sono chiamate PRP (Pathogenesis-Related Proteins). Queste proteine presentano proprietà fisico-chimiche che le rendono resistenti a

pH acido e proteolisi, facilitando la loro sopravvivenza negli spazi vacuolari o intercellulari, dove vengono dirette. Basandosi prima sulle proprietà sierologiche e poi su dati di sequenza, le principali PRP di tabacco (*N. tabacum*) sono state classificate in 5 gruppi principali (da PR-1 a PR-5), che vengono ritrovati anche in pomodoro (*L. esculentum*) (Niderman et al., 1995). In *L. esculentum*, una delle PR maggiormente studiate e caratterizzate è una P14 (il termine "P14" indica l'insieme delle proteine isolate da un preciso contesto che mostra un peso molecolare apparente pari a 14 kDa) che presenta un'elevata omologia con la famiglia PR-1 di *N. tabacum* (Lucas et al., 1985).

Sebbene siano presenti in banca dati molte sequenze amminoacidiche derivate dalla caratterizzazione di varie PRP, spesso non sono state depositate le sequenze genomiche relative; ne consegue che la maggior parte delle sequenze disponibili per PRP non dà informazioni riguardo il peptide segnale (assente nella proteina matura). La precisa sequenza nucleotidica da cui è stato ricavato PSlyc (Genbank: A22637.1) è collegata al brevetto WO 1992/020800-A1 "Plant Pathogenesis-related proteins", in scadenza nel 2012, le cui claim coprono l'uso delle proteine mature, ma non delle sequenze segnale. La sequenza corrispondente a PSlyc è comunque stata ritrovata anche in altre accessioni di banche dati disponibili presso il servizio Entrez-NCBI, come ad esempio la sequenza GenBank: GT168669.1 (tratta da una libreria di cDNA).

Le prove *in silico* su PSlyc hanno dimostrato un'ottima efficienza nel riconoscimento come sequenza segnale e nella correttezza del sito di taglio previsto. Il semplice confronto del PS derivato da pomodoro e del PS originale di derivazione murina potrebbe far pensare alla necessità di adottare un PS di derivazione tassonomica vicina all'organismo ospite per ogni proteina eterologa prodotta in pianta (*N. tabacum* e *L. esculentum* sono specie simili, entrambe appartenenti alla famiglia delle Solanacee). Osservando invece l'analisi di molteplici sequenze derivate sia da tabacco che da altre specie vegetali (come riso, fava, soia), si può vedere come i risultati delle predizioni *in silico* siano in alcuni casi peggiori di quelli osservati per il PS nativo, con predizioni in cui il sito preferenziale di taglio non trova corrispondenza nella lunghezza effettiva della sequenza segnale; ciò porta al potenziale rischio di produzione di proteine tronche o con amminoacidi aggiuntivi all'N-terminale.

In questa tesi sono state effettuate trasformazioni stabili di *N. tabacum* con sequenze codificanti per minibody portanti PSlyc. Per valutare effettivamente *in vivo* la bontà del nuovo peptide segnale introdotto è necessario provare che la localizzazione della proteina matura sia quella desiderata (apoplasto / reticolo endoplasmico a seconda dell'assenza o presenza del segnale di ritenzione nell'ER KDEL); è necessario inoltre verificare la correttezza del sito di taglio predetto. Sono attualmente in fase di allestimento prove di immunolocalizzazione su foglia per verificare l'effettivo compartimento di accumulo del minibody (sono state effettuate inclusioni in resina epossidica di frammenti fogliari), che verificheranno la correttezza dell'indirizzamento subcellulare della molecola. Per validare il sito di taglio occorre invece richiedere un'analisi dell'N-terminale della proteina; questo sarà possibile una volta messo a punto il processo di purificazione, in modo da ottenere quantità di minibody privo di contaminanti ed evidente in analisi SDS (prerequisito fondamentale per la fattibilità del saggio). Il corretto indirizzamento della molecola alla via secretoria è comunque indirettamente dimostrato dalle differenze significative riscontrate fra le popolazioni trasformate con lo stesso costrutto portante o meno il tag KDEL: l'indirizzamento all'ER è un passaggio da cui dipende l'intero successivo smistamento della proteina in apoplasto o nei sistemi endomembranosi (ER, Golgi, vacuolo...). Se la proteina non fosse stata indirizzata al RE tramite la presenza del PS sarebbe stata accumulata nel citoplasma e verosimilmente non si sarebbero riscontrate differenze fra presenza o assenza di KDEL.

Non sono state svolte in questa tesi prove di comparazione diretta fra trasformati portanti PSlyc e PSott: inizialmente non sono state ritenute necessarie, data la bontà della predizione *in silico* e la relativa somiglianza dei punteggi ottenuti per le due sequenze (rispetto alle altre confrontate). A posteriori, vista la variabilità esistente all'interno della popolazione trasformata (cfr. § 4.4) e le differenze non significative riscontrate fra proteine espresse sotto il controllo di promotori parzialmente diversi (cfr. § 4.4.4), si ritiene che un'indagine comparativa fra PSlyc e PSott possa allo stato attuale portare a risultati non significativamente divergenti. L'effettuazione di questa analisi è quindi ritenuta sicuramente utile ma non prioritaria; sarà attuata quando sarà stato messo a punto il protocollo di trasformazione transitoria, che è stato dimostrato avere una variabilità minore rispetto a trasformati stabili (cfr. § 5.1.7).

5.1.3 RITENZIONE DEL MINIBODY NEL RETICOLO ENDOPLASMICO

L'indirizzamento alla via secretoria è un elemento comune nell'espressione di anticorpi e molecole simil-anticorpali, poiché l'ambiente citoplasmatico riducente è generalmente sfavorevole alla corretta formazione di ponti disolfuro richiesta per l'assemblaggio di anticorpi interi e scFv.

In riferimento all'espressione in *N. tabacum*, è stato dimostrato che la produzione di anticorpi interi nel citosol è nettamente svantaggiata rispetto a una localizzazione apoplastica, mentre la produzione di scFv può avvenire ugualmente (Schillberg et al., 1999, Fischer et al., 1999). Schouten e coll. (2002) a questo proposito hanno riscontrato la presenza di scFv nel citosol di piante trasformate sia stabilmente sia in modo transiente, ma con risultati non sempre positivi per quanto riguarda l'effettiva formazione di ponti disolfuro, essenziali per il corretto funzionamento della molecola.

Una volta indirizzate alla via secretoria, le molecole simil-anticorpali vengono teoricamente accumulate nello spazio apoplastico, a meno che non presentino ulteriori sequenze di indirizzamento in particolari compartimenti subcellulari, come il segnale di ritenzione (KDEL) nel reticolo endoplasmico (ER). È stato dimostrato che in alcuni casi l'accumulo di scFv in tabacco avviene solamente se ritenuti nell'ER (Fiedler et al., 1997), mentre in altri avviene indifferentemente in apoplasto e in ER (Fischer et al., 1999). La produzione di anticorpi interi in tabacco con entrambe le localizzazioni è stata ampiamente saggiata, e vede la fattibilità di entrambe le strategie; solitamente il compartimento di accumulo viene scelto in base al grado e tipo di glicosilazione desiderato per la molecola: anticorpi ritenuti in ER spesso mancano delle strutture glicaniche complesse (con caratteristiche tipiche vegetali e per questo potenzialmente immunogeniche) che vengono assemblate nel Golgi, ma presentano per contro strutture ad alto contenuto di mannosio sfavorevoli da un punto di vista farmacocinetico (De Muynck et al., 2010).

Quello che traspare dalla letteratura è comunque una vasta eterogeneità nella quantità e qualità delle immunoglobuline prodotte, largamente dipendente dalla piattaforma produttiva utilizzata e dalla natura della proteina stessa (ogni anticorpo può essere infatti considerato una molecola a se stante in virtù della sua regione variabile). Queste evidenze suggeriscono la necessità di un'analisi specifica per ogni nuova molecola simil-anticorpale ideata.

Il minibody è una molecola ibrida, a metà fra un anticorpo intero e un scFv. La preoccupazione relativa alle forme glicaniche presenti negli anticorpi interi non concerne molecole come questa, poiché mancano del dominio C_H2, regione in cui sono presenti i siti di glicosilazione (Abbas et al., 2002). Verificata la possibilità di produzione di un minibody corretto in apoplasto (cfr. § 4.4.2), sono

stati valutati i potenziali vantaggi derivati dall'indirizzamento a un diverso compartimento subcellulare. Dai dati raccolti in questa tesi emerge che una localizzazione nell'ER tenda a favorire l'accumulo del minibody di forma Va (Va-KDEL), con livelli di espressione fino a 3 volte superiori rispetto alla forma secreta (Va). Questi dati andranno confermati con ulteriori esperimenti coinvolgenti anche le 3 rimanenti forme di minibody; costrutti portanti il segnale KDEL anche per Vb, Vc e Vd sono già stati assemblati (cfr. § 4.2.14).

5.1.4 SOSTITUZIONE DEGLI ELEMENTI REGOLATORI NELLA CASSETTA DI ESPRESSIONE

In questa tesi è stato effettuato un esperimento di comparazione fra gli elementi regolatori presenti nella cassetta di espressione del minibody (promotore 35S_{LLTCK}, terminatore nos) e sequenze regolatrici di diversa origine (RBSnat, RBS_{LLTCK}, RBSter).

Il promotore 35S di CaMV è un elemento regolatore "classico", utilizzato universalmente per scopi di ricerca e presente nella maggioranza delle piante transgeniche attualmente coltivate in diverse parti del mondo (Al-Kaff et al., 2000) (Figura 5.1).

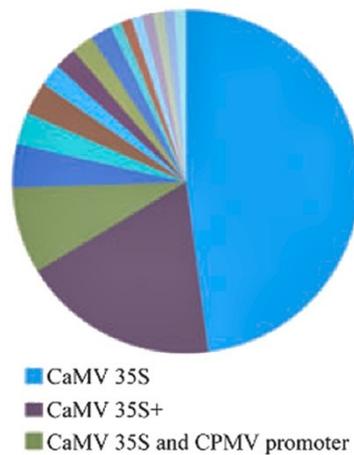


Figura 5.1 Frequenza di impiego di elementi regolatori utilizzati nell'espressione di anticorpi in pianta;
le tre tipologie principali vedono l'uso di promotori 35S (da De Muyneck et al., 2010)

35S è un promotore virale forte, che dirige l'espressione di geni in un'ampia varietà di tessuti; sebbene sia stato ritenuto a lungo un promotore costitutivo (Odell et al., 1985), diversi studi effettuati su piante angiosperme hanno dimostrato che geni reporter posti sotto il suo controllo presentano un pattern di espressione disomogeneo per tessuto e stadio di sviluppo (Saidi et al., 2009). La maggior parte degli studi che hanno valutato il profilo di espressione del promotore 35S si sono basati su metodi istochimici di localizzazione (cfr. § 3.4.4); nonostante questi metodi offrano molti vantaggi, presentano anche diversi limiti: la diffusione dello stesso enzima o dei prodotti di reazione nelle cellule e tessuti circostanti i reali siti di espressione può infatti creare artefatti nella localizzazione dell'attività GUS-relata (Mascahenas e Hamilton, 1992; Sunikumar et al., 2002). Studi di comparazione con veri promotori costitutivi, come il promotore dell'actina-1 di riso e dell'ubiquitina-1 di mais, hanno rivelato che 35S mostra un'attività più debole; sebbene il livello di espressione sia sufficiente per la selezione di piante trasformate, tentativi di sovrapproduzione di proteine di interesse tramite 35S rimangono piuttosto inefficienti in termini di resa (Saidi et al., 2009). Informazioni approfondite sui profili di espressione del 35S rimangono ancora non soddisfacenti e

limitate a poche specie (Williamson et al., 1989; Sunikumar et al., 2002; Govindarajulu et al., 2008; Hraška et al., 2008; Saidi et al., 2009). Hraška e coll. (2008) hanno riportato che il profilo di espressione di 35S in tabacco si è dimostrato dipendente dallo stadio di sviluppo della pianta e tessuto / organo specifico, con la massima espressione in tessuti vascolari; tuttavia la sua attività è stata rilevata in quasi tutti i tessuti e in tutti gli stadi di sviluppo della pianta, in particolare in tutti i tipi di cellule presenti nelle vere foglie, con qualche variabilità evidenziata fra foglie di età differente. 35S dovrebbe essere comunque espresso maggiormente in cellule giovani e tessuti caratterizzati da un forte livello di proteosintesi (Pret'ová et al., 2001).

La ribulosio bifosfato carbossilasi-ossigenasi (RuBisCO, RBS) è l'enzima principale coinvolto nella fissazione del carbonio, costituisce approssimativamente il 50-60% delle proteine fogliari (Dean e Leech, 1982) ed è senza dubbio la proteina più abbondante sulla terra. RBS è composta da 8 subunità piccole di 14 kDa, codificate da geni nucleari, e da 8 subunità grandi di 55 kDa, codificate da un singolo gene presente nel genoma cloroplastico (Outchkourov et al., 2003). L'espressione del gene RBS è luce-dipendente, ed è correlata allo sviluppo dei cloroplasti (Dean e Leech, 1982). È stato calcolato che il gene RBS più abbondantemente espresso contribuisce per il 5-6% della proteina solubile totale, quindi ci si aspetta di ottenere livelli di espressione simili da costrutti utilizzando il suo promotore (Outchkourov et al., 2003). Promotori RBS sono stati valutati attivi in diverse specie vegetali, e la loro espressione generalmente localizzata nei tessuti verdi (Gittins et al., 2000). Outchkourov e coll. (2003) hanno clonato elementi terminatori e promotori (frammenti di 1kb) di geni RBS in vettori di espressione e hanno valutato la forza della nuova cassetta in comparazione al promotore CaMV 35S in tabacco; il confronto fra l'attività GUS media della popolazione RBS con quella 35S ha rivelato un incremento del livello di espressione del gene reporter GUS di 8 volte nei costrutti RBS rispetto al 35S. La rilevanza della presenza del terminatore RBS per un'efficiente espressione è stata suggerita dagli studi di Dean e coll. (1989), che hanno evidenziato un'importanza quantitativa nell'aumento dei livelli di resa. Le sequenze promotrici e terminatrici, nelle loro porzioni 5'- e 3'-UTR, concorrono alla circolarizzazione dell'mRNA (Figura 5.2), meccanismo regolatore che contribuisce a aumentare l'efficienza della traduzione (Mazumder et al., 2001).

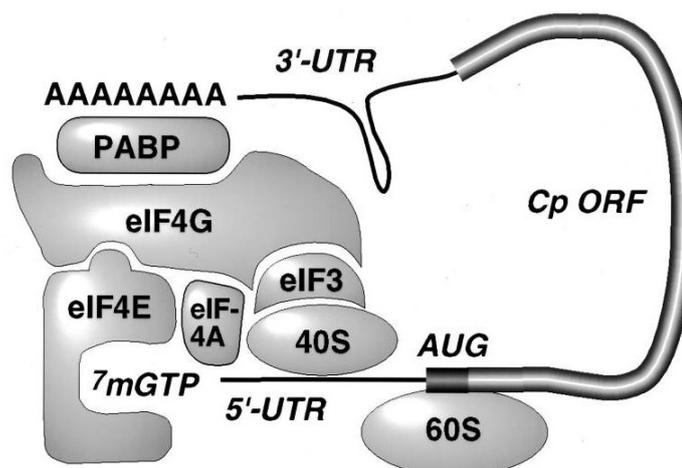


Figura 5.2 Modello di circolarizzazione dell'mRNA, mediato dal legame della Poly-A-Binding Protein (PABP) sia alla coda poli-A che al fattore eIF4G del complesso di inizio della traduzione (da Mazumder et al., 2001)

È stato suggerito che sequenze regolatrici appartenenti allo stesso gene favoriscano l'instaurarsi di questo meccanismo; ciò potrebbe contribuire a giustificare l'aumentato livello di espressione per promotore e terminatore RBS in confronto al sistema costituito da promotore 35S e terminatore nos (Outchkourov et al., 2003).

Alla luce di questi dati, sono stati programmati esperimenti per saggiare un sistema di regolazione dell'espressione diverso dal classico 35S-nos, valutando l'efficacia di promotore e terminatore RBS. Inoltre, poiché il 5'-UTR artificiale LLTCK utilizzato in questa tesi è stato dimostrato aumentare sensibilmente i livelli di espressione del promotore 35S, si è voluto valutare l'efficacia di tale sequenza in sostituzione al leader nativo del promotore RBS, creando le due varianti RBSnat e RBS_{LLTCK}. Infine, poiché è stato ipotizzato un effetto combinato di promotore e terminatore derivati dallo stesso gene, sono stati creati costrutti per saggiare l'effettivo spunto indotto dalla coppia RBSnat-RBSter rispetto ad altre combinazioni promotore / terminatore. Sono state quindi create le cassette geniche rappresentate in Figura 5.3.

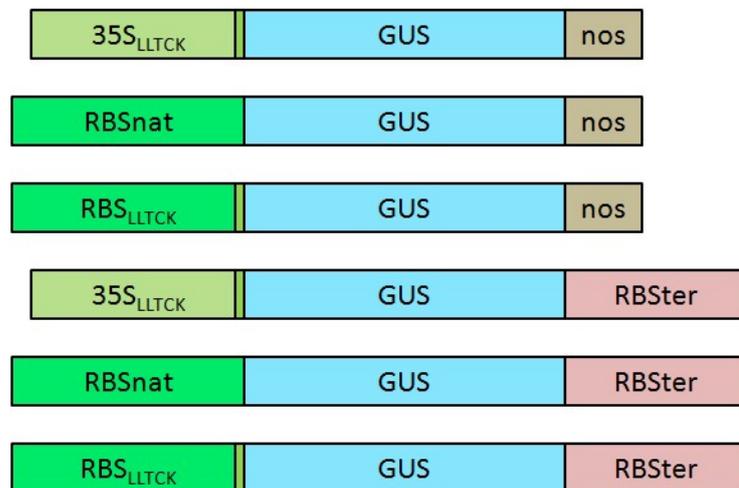


Figura 5.3 Cassette di espressione con varie combinazioni di elementi regolatori

I risultati ottenuti concordano con quanto affermato da Outchkourov e coll. (2003): la coppia RBSnat-RBSter porta a livelli di espressione del gene reporter superiori rispetto a 35S-nos; la differenza riscontrata non è di 8 volte, ma di ~3.7 (rapporto fra le medie delle popolazioni): ciò può essere imputabile alla presenza in questo lavoro del leader LLTCK, che è dimostrato aumentare i livelli di espressione indotti dal promotore 35S (cfr. § 3.2.17). L'effetto positivo di LLTCK su 35S non è stato però confermato sul promotore RBS: in presenza di terminatore nos non è stata riscontrata alcuna differenza significativa (Tabella 4.10). Sembra che al contrario vi sia un piccolo spunto di RBSnat su RBS_{LLCK} in presenza di RBSter, il che farebbe pensare a un effetto sinergico delle due UTR appartenenti allo stesso gene, come ipotizzato in letteratura; comparazioni effettuate a parità di promotore non mostrano però nessuno spunto significativo di RBSter rispetto al terminatore nos, sia in presenza del 5'-UTR LLTCK sia in presenza del leader nativo di RBS.

La variabilità dell'espressione del gene reporter riscontrata fra le foglie saggiate derivanti dalla stessa pianta trasformata (cfr. § 4.3.4) e già osservata anche per i trasformati esperimenti minibody (cfr. § 4.4.1) è visibilmente più alta per i costrutti portanti il promotore RBS (come risulta osservando le barre di deviazione standard riportate per i dati relativi alla media per pianta). Valori così divergenti possono essere dovuti alla natura del promotore RBS stesso: essendo luce-inducibile, è da ritenersi

verosimile che foglie poste in condizione di illuminazione diversa mostrino livelli di espressione diversi. In questa tesi sono state prelevate le prime tre foglie completamente distese di ogni pianta, che trovandosi in posizione apicale dovrebbero essere state favorite nella ricezione della luce artificiale; tuttavia in queste analisi non è stata posta una reale attenzione a questo fattore nella fase di raccolta dei campioni. Per evitare l'ombreggiamento delle foglie da parte delle piante adiacenti e controllare la veridicità di questa ipotesi sarà necessario distanziare maggiormente le piante nella fase di coltivazione in idroponica, e cercare di effettuare analisi su tessuti in condizioni di illuminazione paragonabili.

Come anticipato e contrariamente alle aspettative, non è stata evidenziata alcuna differenza significativa nei livelli di espressione rilevati in presenza di 5'-UTR sintetico LLTCK rispetto al 5'-UTR nativo del promotore RBS. Ciò può essere dovuto a due fattori: un'equivalenza della bontà delle due sequenze leader (RBS è uno dei geni più espressi sulla terra: è facile pensare che i suoi elementi regolatori siano altamente efficienti) oppure un errore nella sostituzione del 5'-UTR in RBSnat. Un'analisi a posteriori della sequenza promotrice del gene RBS di *C. morifolium* (come depositata in banca dati da Outchkourov e coll., 2003) rivela che il sito di consenso per l'iniziazione della trascrizione (YYAN^A/_TYY) (evidenziato in nero) si trova presumibilmente 5 nt a valle rispetto a quanto indicato nelle annotazioni della sequenza (il tratto corrispondente al leader depositato in database è sottolineato), ovvero nella zona da 25 a 35 nt a valle della TATA box (evidenziata in grigio), come tipico di geni eucariotici (Lodish et al., 2000).

ATTTGATTTTGTCCGTTAGATAGCAAACAACATTATAAAAGGTGTGTATCAATAGGAACTAATTCACTCATTGGA
TTCATAGAAGTCCATTCTCTAAGTATCTAAATCTAGAATG

Ciò può aver portato in fase di sostituzione del leader all'avvicinamento della sequenza di iniziazione di LLTCK alla TATA box di RBS a meno di 25nt di distanza. Ulteriori esperimenti devono essere programmati per verificare se questo fattore possa aver contribuito o meno a abbassare l'efficienza del leader sintetico.

Questo lavoro conclude quindi che, viste le prove finora effettuate, il promotore RBSnat si mostra superiore a 35S_{LLTCK}, e verrà impiegato nella creazione di nuovi costrutti vettoriali. RBStier invece non ha mostrato alcun punto di forza rispetto a nos, che non verrà sostituito. Data la variabilità ritrovata in tutte le popolazioni trasformate, a ogni modo, verranno pianificati ulteriori esperimenti sia in trasformazione stabile che transitoria per poter confermare e chiarire maggiormente i risultati ottenuti, nell'ambito dei quali verranno effettuate analisi anche a livello di mRNA per valutare i livelli di trascrizione indotti dagli elementi cis regolatori presi in esame.

5.1.5 PSTART VS. PCAMBIA

L'esigenza di trovare un backbone vettoriale diverso da pSTART, vettore affidabile utilizzato da tempo e realizzato presso il gruppo di ricerca dove è stata svolta questa tesi (De Amicis et al., 2007), è derivata da molteplici fattori. La lunghezza del vettore, superiore alle 14kb, rende difficoltose le normali operazioni di biologia molecolare; in particolare risulta estremamente tedioso il riuscire a distinguere in gel di agarosio diverse forme digerite della molecola. La scarsa concentrazione delle miniprep ottenute, causata dalla sua bassa frequenza di replicazione in *E. coli*, costringe spesso l'operatore ad effettuare più estrazioni per raggiungere le quantità di DNA desiderate. Per quanto riguarda l'efficienza di trasformazione, sebbene sia ormai stato dimostrato in più prove (anche in

questa tesi, cfr. § 4.4.5) che la percentuale di individui escape rilevati nella popolazione trasformata sia estremamente bassa, la scarsa quantità di germogli prodotti nonostante l'alto numero di espianti impiegati (cfr. § 4.3.5) crea un limite nel numero di piante risultanti.

La ricerca di un vettore sostituto ha portato alla scelta della famiglia di vettori pCAMBIA, già utilizzata in questo gruppo di ricerca per la trasformazione di *O. sativa* (pCAMBIA1300) con buoni risultati (Patti, 2008). La scelta è ricaduta su pCAMBIA2300, che similmente a pSTART porta il gene di resistenza alla kanamicina *nptII* per la selezione delle piante trasformate. Per effettuare una comparazione il più corretta possibile, l'intera cassetta di espressione per GUS di pSTART è stata clonata all'interno del T-DNA di pCAMBIA2300, mantenendo l'orientamento in tandem dei due elementi genici presenti fra le sequenze ripetute RBR e LBR (Figura 4.31). I risultati sono stati però deludenti: nonostante la facilità di manipolazione di pCAMBIA2300 e l'elevato tasso di rigenerazione riscontrati *in vitro*, sono state ottenute pochissime piante intere, di cui la maggior parte non sembrava esprimere il gene reporter a livelli rilevabili dalle condizioni di saggio (cfr. § 4.3.5 e 4.4.5).

Prove di amplificazione di un tratto interno al T-DNA hanno mostrato la presenza di pattern mai riscontrati in pSTART, e non dovuti a artefatti di reazione (erano infatti presenti anche a condizioni di amplificazione più stringenti) (cfr. § 4.4.5). Ciò potrebbe far supporre a un riarrangiamento genico a livello del sito di inserzione nel genoma vegetale, con presenza di T-DNA interi o relativi frammenti in tandem e /o in più copie; ciò può aver portato ad una soppressione di entrambi i geni GUS e *nptII* tramite silenziamento omologia-dipendente (Matzke et al., 1994), ma non spiega l'alta percentuale di rigenerazione riscontrata *in vitro* e associata a una successiva mancanza di radicazione.

Un elemento potenzialmente sfavorevole nella struttura di pCAMBIA può essere inoltre la presenza di due promotori 35S vicini: uno a monte della CDS per il gene della resistenza antibiotica (35S_{2x}, con doppio enhancer) e uno a monte del transgene (35S_{LLTCK}). In pSTART, la resistenza all'antibiotico è sotto il controllo di un promotore di diverso tipo (nos). Sono stati effettuati diversi studi sulla presenza di due promotori identici o simili all'interno dello stesso T-DNA, e i risultati sono spesso discordanti fra loro (Weigel et al., 2000; Padidam e Cao, 2001; Eszterhas et al., 2002; Bhullar et al., 2009). Ad esempio è stato descritto che nella famiglia di vettori pPZP, da cui derivano i pCAMBIA, se gli enhancer del 35S si trovano a breve distanza da un piccolo frammento di promotore (da -84 a +43), ciò può impedire agli enhancer stessi di transattivare un gene adiacente; ciononostante, anche in questa condizione l'espressione di un transgene in posizione prossima viene comunque alterata anche se lievemente (Yoo et al., 2005). Sul sito web dell'istituto Cambia viene riportato a questo proposito un comunicato in cui viene rivelato che è nota l'interferenza del promotore 35S_{2x} con gli altri geni presenti nel T-DNA, ma si riferisce a un'interazione di tipo additivo e non distruttivo; il loro consiglio a questo proposito è quello di utilizzare un promotore diverso per l'espressione del transgene.

Alla luce di queste informazioni, sarà presa in considerazione la sostituzione della sequenza 35S_{LLTCK} con RBSnat in pCAMBIA per verificare l'interazione negativa dei due 35S; saranno inoltre valutati nuovi candidati vettoriali di origine diversa dai pCAMBIA.

5.1.6 PROVE DI PURIFICAZIONE

La cromatografia di affinità è una metodica di purificazione che permette di raggiungere un grado di purezza maggiore del 95% in un unico procedimento, sfruttando una proprietà particolare della

molecola target per isolarla da tutti i contaminanti presenti nel campione (GE Healthcare, 2011). In questo caso è stata utilizzata la proteina A, una molecola di origine batterica che riconosce e lega selettivamente la porzione FC anticorpale. Le proprietà della resina commerciale derivatizzata con questa molecola permettono un legame forte con IgG1 umane (hC_H3: Vc, Vd) e più debole con IgG1 murine (mC_H3: Va, Vb). Nonostante la disponibilità di queste informazioni, le prime prove di purificazione mediante affinità sono state effettuate utilizzando la forma di minibody Va, perché per essa era disponibile materiale fogliare fresco (potenzialmente preferibile a quello congelato). I risultati ottenuti finora non hanno mostrato alcun legame alla resina; questo risultato è stato imputato in principio alla scarsa affinità del dominio C_H3 murino per la proteina A oppure alle condizioni di caricamento del campione non ancora ottimali in termini di pH e forza ionica. Un lavoro recente ha però evidenziato l'inapplicabilità di questo metodo per una molecola simile al minibody, costituita da una porzione scFv legata a un dominio C_H3. Molecole di questo tipo mancano dei siti di legame alla proteina A, che si trovano all'interfaccia fra i domini C_H2 e C_H3 (Gagnon et al., 2010). Future metodiche di purificazione dovranno perciò abbandonare questa strategia, concentrandosi sulla ricerca di altre resine per cromatografia di affinità o sull'ottimizzazione di più passaggi cromatografici successivi con resine a interazione idrofobica, a scambio ionico e di gel filtration. Vista in ogni caso l'unicità di ogni molecola simil-anticorpale, nonostante i dati rilevati da Gagnon e coll. (2010) verrà comunque effettuata una prova di legame del minibody presentante C_H3 umano alla proteina A.

5.1.7 PROVE DI AGROINFILTRAZIONE

L'espressione transitoria di proteine è una potenziale alternativa all'espressione stabile in piante transgeniche per la produzione di proteine di alto valore commerciale. Lo sviluppo dell'espressione transitoria in pianta ha seguito tre percorsi principali, ciascuno collegato a un diverso approccio di trasferimento di DNA o RNA. Metodi di trasferimento diretto includono l'approccio biolistico, la trasformazione dei protoplasti, la microiniezione e altri, e si basano sulla distruzione meccanica e/o chimica della parete e/o membrana cellulare per introdurre il DNA di interesse all'interno della cellula. Sistemi a vettori virali sono costituiti da virus infettivi (solitamente a RNA) in cui il genoma virale viene esteso per includere la sequenza codificante la proteina di interesse, che viene prodotta in concomitanza con l'infezione e replicazione del virus nella cellula vegetale (D'Aoust et al., 2009).

I sistemi di infezione batterica come l'agroinfiltrazione sono tecniche che permettono l'infusione meccanica di una sospensione batterica portante il costrutto d'interesse (*A. tumefaciens* modificato) all'interno delle cellule vegetali. Il materiale (generalmente fogliare) viene poi incubato per 2-3 giorni, e la proteina di interesse viene espressa senza necessitare dell'incorporazione del DNA ricombinante all'interno del genoma della pianta. Questo sistema è stato sviluppato nel 1997 da Kapila e coll., ed è stato poi utilizzato con successo nella produzione transitoria di diverse proteine, ad esempio catene anticorpali pesanti e leggere in foglie di tabacco, auto-assemblanti in anticorpi pienamente funzionali (Joh e VanderGheynst, 2006). Con tessuti vegetali compatibili, l'espressione transitoria indotta dall'agroinfiltrazione può produrre livelli di proteina ricombinante più alti dell'espressione stabile in piante transgeniche, ma è usualmente impiegata in piccola scala per la valutazione di costrutti di espressione e la verifica della non tossicità delle proteine di interesse prima di generare piante trasformate stabilmente (Joh e VanderGheynst, 2006).

Le prove di agroinfiltrazione condotte in questo lavoro sono state allestite solamente in base a quanto riportato in letteratura; i livelli di espressione sono di difficile rilevazione a causa del basso intervallo di attività registrata del gene reporter. Sebbene risultati preliminari siano incoraggianti (cfr. § 4.4.7), questa tecnica richiederà ancora diversi test per essere messa a punto, in modo da servire da sistema di elezione per la prova di nuovi costrutti e la comparazione di sistemi regolatori.

5.2 CONCLUSIONI

In questo lavoro è stata valutata l'efficacia di un sistema di produzione per molecole simil-anticorpali in pianta e si sono ricercate strategie per il miglioramento della piattaforma produttiva esistente.

I minibody, molecole a metà fra un anticorpo e un scFv, sono proteine di interesse industriale e farmaceutico che ben rappresentano la vasta categoria delle molecole simil-immunoglobuliniche. Le varianti di minibody qui studiate, progettate per un'applicazione clinica nella terapia di mantenimento dei linfomi non-Hodgkin, costituiscono un valido esempio di farmaco paziente-specifico le cui esigenze ben si confrontano con i molti vantaggi forniti dal plant molecular farming.

Il tabacco è specie modello per le dicotiledoni. Tutti gli elementi regolatori qui studiati (PSlyc da *L. esculentum*, RBSnat e RBster da *C. morifolium*, la stessa ottimizzazione codonica della cassetta di espressione basata su geni alto-espresi in dicotiledoni) possono essere facilmente adattati sia al sistema basato su *N. tabacum* che a altre dicotiledoni.

I risultati e le considerazioni riportati in questa tesi costituiscono un valido punto di partenza per le strategie di sviluppo di nuove molecole simil-immunoglobuliniche di interesse terapeutico impieganti l'espressione in foglia in piante dicotiledoni come piattaforma produttiva.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, 2002. *Immunologia cellulare e molecolare*. Quarta edizione italiana. Ed. Piccin.
- AIMAC, Associazione Italiana malati di Cancro, 2010. *Tipi di cancro – Linfomi Non Hodgkin*. www.aimac.it. Accesso effettuato il 5 novembre 2010.
- Al-Kaff NS, Kreike MM, Covey SN, Pitcher R, Page AM, Dale PJ, 2000. Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene. *Nature Biotechnology* 18:995-9.
- Armitage JO, 1993. Treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *The New England Journal of Medicine* 328:1023-30.
- Armitage JO, Weisenberger DD, 1998. New approach to classifying Non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. *Journal of Clinical Oncology* 16:2780–2795.
- Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM, 1986. The expression of a nopaline synthase — human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology* 6:347-357.
- BaskarS, Kobrin CB, Kwak LW, 2004. Autologous lymphoma vaccines induce human T cell responses against multiple, unique epitopes. *Journal of Clinical Investigation* 113:1498–1510.
- Beckers W, Villa L, Gonfloni S, Castagnoli L, Newton SM, Cesareni G, Ghiara P, 1993. Increasing the immunogenicity of protein antigens through the genetic insertion of VQGEESNDK sequence of human IL-1 beta into their sequence. *The Journal of Immunology* 151:1757-64.
- Beena K, Udgaonkar JB, Varadarajan R, 2004. Effect of signal peptide on the stability and folding kinetics of maltose binding protein. *Biochemistry* 43:3608-3619.
- Bendandi M, Gocke CD, Kobrin CB, Benko FA, Sternas LA, Pennington R, Watson TM, Reynolds CW, Gause BL, Duffey PL, Jaffe ES, Creekmore SP, Longo DL & Kwak LW, 1999. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nature Medicine* 5:1171–1177.
- Bendandi M, 2009. Idiotypic vaccines for lymphoma: proof-of-principles and clinical trial failures. *Nature Reviews Cancer* 9:675–681.
- Benvenuti F, Burrone OR, 2001. Anti-idiotypic antibodies induced by genetic immunisation are directed exclusively against combined V(L)/V(H) determinants. *Gene Therapy* 8:1555-61.
- Benvenuti F, Cesco-Gaspere M, Burrone OR, 2002. Anti-idiotypic DNA vaccines for B-cell lymphoma therapy. *Frontiers in Bioscience* 7: d228–d234 Review.
- Bergman L, Harris E, Kuehl W, 1981. Glycosylation causes an apparent block in translation of immunoglobulin heavy chain. *The Journal of Biological Chemistry* 256:701-706.
- Bhullar S, Chakravarthy S, Pental D, Burma PK, 2009. Analysis of promoter activity in transgenic plants by normalizing expression with a reference gene: anomalies due to the influence of the test promoter on the reference promoter. *Journal of Biosciences* 346:953-62.
- Birch RG, 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:297-326.

- Boraschi D, Tagliabue A, 1999. Interleukin-1 and interleukin-1 fragments as vaccine adjuvants. *Methods* 19:108-13.
- Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M, 1971. Report of the committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Research* 31:1860-1.
- Carroll WL, Thielemans K, Dilley J, Levy R, 1986. Mouse x human heterohybridomas as fusion partners with human B cell tumors. *Journal of Immunological Methods* 89:61-72.
- Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P, 2004. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 104:2635-2642.
- Cel Sci, 2011. Types of Biological Cancer Immunotherapy. http://www.cel-sci.com/types_of_cancer_immunotherapy.html Accesso effettuato il 23 novembre 2011.
- Cerioti G, Armandola D, 1979. *Le piante e l'uomo: moderna enciclopedia del mondo vegetale*. Ed. Bramante.
- Cesco-Gaspere M, Zentilin L, Giacca M, Burrone OR, 2008. Boosting anti-idiotypic immune response with recombinant AAV enhances tumour protection induced by gene gun vaccination. *Scandinavian Journal of Immunology* 68:58-66.
- Chebolu S, Daniell H, 2009. Chloroplast-derived vaccine antigens and biopharmaceuticals: expression, folding, assembly and functionality. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 332:33-54.
- Chen YW, Word CJ, Jones S, Uhr JW, Tucker PW, Vitetta ES, 1986. Double isotype production by a neoplastic B cell line. I. Cellular and biochemical characterization of a variant of BCL1 that expresses and secretes both IgM and IgG1. *The Journal of Experimental Medicine* 164:548-61.
- Chen PY, Wang CK, Soong SC, To KY, 2003. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Molecular Breeding* 4:287-293.
- Chinn AM, Comai L, 1996. Gene Transcription. *Transgenic Plants: a production system for industrial and pharmaceutical proteins*. Ed. John Wiley and Sons, London, UK 27-48.
- Codignola A, Ghidini A, Granziero L, Sforza GGR, Ovadia D, 2011. *Linfoma Non Hodgkin*. AIRC – Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro. <http://www.airc.it/tumori/linfoma-non-hodgkin.asp> Accesso effettuato il 23 novembre 2011.
- Coiffier, B., (2005) State-of-the-art therapeutics: diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 23(26), 6387-6393.
- Conceição A da S, Raikhel NV, 1996. Accumulation of soluble proteins in the endomembrane system of plants In: Owen MRL, Pen J (eds) *Transgenic Plants: a production system for industrial and pharmaceutical proteins* John Wiley & Sons, London, UK 75-97.
- Cramer CL, Boothe JG, Oishi KK, 1999. Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 240:95-118.
- Cramer CL, Weissenborn DL, Oishi KK, Grabau EA, Bennett S, Ponce E, Grabowski GA, Radin DN, 1996. Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Annals of the New York Academy of Sciences* 792:62-71.
- Crossway A, Oakes JV, Irvine JM, Ward B, Knauf VC, Shewmaker CK, 1986. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molecular and General genetics MGG* 2:179-185,

- D'Aoust MA, Lavoie PO, Belles-Isles J, Bechtold N, Martel M, Vézina LP, 2009. Transient expression of antibodies in plants using syringe agroinfiltration. *Methods in Molecular Biology* 483:41-50.
- Daniell H, Singh ND, Mason H, Streatfield SJ, 2009. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends in Plant Science* 14:669-79.
- Datamonitor, 2009. *Stakeholder Insight 2009: Non-Hodgkin's Lymphomas*. <http://www.datamonitor.com/>
Accesso effettuato il 20 agosto 2011.
- Davoodi-Semiromi A, Samson N, Daniell H, 2009. The green vaccine: A global strategy to combat infectious and autoimmune diseases. *Human Vaccines* 5:488-93.
- Davoodi-Semiromi A, Schreiber M, Nalapalli S, Verma D, Singh ND, Banks RK, Chakrabarti D, Daniell H, 2010. Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery. *Plant Biotechnology Journal* 8:223-42.
- De Amicis F, Marchetti S, 2000. Intercodon dinucleotides affect codon choice in plant genes. *Nucleic Acids Research* 17:3339-3345.
- De Amicis F, Patti T, Marchetti S, 2007. Improvement of the pBI121 plant expression vector by leader replacement with a sequence combining a poly(CAA) and a CT motif. *Transgenic Research* 16:731-8
- Dean C, Leech RM, 1982. Genome expression during normal leaf development. *Plant Physiology* 69:904-910.
- Dean C, Favreau M, Bond-Nutter D, Bedbrook J, Dunsmuir P, 1989. Sequences downstream of translation start regulate quantitative expression of two petunia rbcS genes. *The Plant Cell* 1:201-208.
- De Muyneck B, Navarre C, Boutry M, 2010. Production of antibodies in plants: status after twenty years. *Plant Biotechnology Journal* 8: 529-63.
- Deshayes A, Herrera-Estrella L, Caboche M, 1985. Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an Escherichia coli plasmid. *The EMBO Journal* 4:2731-7.
- Di Niro R, Ziller F, Florian F, Crovella S, Stebel M, Bestagno M, Burrone O, Bradbury AR, Secco P, Marzari R, Sblattero D, 2007. Construction of miniantibodies for the *in vivo* study of human autoimmune diseases in animal models. *BMC Biotechnology* 7:46.
- Drummond MH, Chilton MD, 1978. Tumor-inducing (Ti) plasmids of *Agrobacterium* share extensive regions of DNA homology. *Journal of Bacteriology* 136:1178-83.
- During K, Hippe S, Kreuzaler F, Schell J, 1990. Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology* 15:281-293.
- Eager R, Nemunaitis J, 2005. GM-CSF gene-transduced tumor vaccines. *Molecular Therapeutics* 12:18-27.
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H, 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols* 2:953-971.
- Eszterhas SK, Bouhassira EE, Martin DI, Fiering S, 2002. Transcriptional interference by independently regulated genes occurs in any relative arrangement of the genes and is influenced by chromosomal integration position. *Molecular Cell Biology* 22:469-79.
- Giddings G, 2001. Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology* 12:450-454.

- Fiedler U, Phillips J, Artsaenko O, Conrad U, 1997. Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology* 3:205-16.
- Fisher RI, 2003. Overview of Non-Hodgkin's lymphoma; biology, staging and treatment. *Seminars in Oncology* 30:3-9.
- Fischer R, Schumann D, Zimmermann S, Drossard J, Sack M, Schillberg S, 1999. Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. *European Journal of Biochemistry* 262:810-6.
- Fischer R, Emans N, 2000. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research* 9:279-299.
- Franken E, Teuschel U, Hain R, 1997. Recombinant proteins from transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 8:411-416.
- Freedman PM, Autry JR, Tokuda S, Williams Jr RC, 1976. Tumor immunity induced by preimmunization with BALB/c mouse myeloma protein. *Journal of the National Cancer Institute* 56:735-740.
- Gagnon P, Cheung CW, Lepin EJ, Wu AM, Sherman MA, Raubitschek AA, Yazaki PJ, 2010. Minibodies and Multimodal Chromatography Methods: A Convergence of Challenge and Opportunity. *BioProcess International* 8:26-35.
- Ganapathi TR, Suprasanna P, Rao PS, Bapat VA, 2004. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)-A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biotechnology* 3:171-184.
- Gallie DR, 1993. Posttranscriptional regulation of gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44:77-105.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A, 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook* Ed. Humana Press 571-607.
- GE Healthcare, 2011. Ge Healthcare Life Sciences – Affinity Chromatography. http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/protein_purification~affinity Accesso effettuato il 07 ottobre 2011
- Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A, 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology* 18:1151-5.
- Gittins JR, Pellny TK, Hiles ER, Rosa C, Biricolti S, James DJ, 2000. Transgene expression driven by heterologous ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small-subunit gene promoters in the vegetative tissues of apple (*Malus pumila* mill.). *Planta* 210:232-40.
- Glick BR, JJ Pasternak, 1999. *Biotechnologia Molecolare, principi e applicazioni del DNA ricombinante*. 386-389.
- Godijn OJM, Pen J, 1995. Plants as bioreactors. *Trends in Biotechnology* 13:379-387.
- Govindarajulu M, Elmore JM, Fester T, Taylor CG, 2008. Evaluation of constitutive viral promoters in transgenic soybean roots and nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 21:1027-35.
- Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P, 1994. The small versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology* 25:989-994.
- Halaby DM, Mornon JP, 1998. The immunoglobulin superfamily: an insight on its tissular, species, and functional diversity. *Journal of Molecular Evolution* 46:389-400.

Hansen G, MD Chilton, 1999. Lessons in gene transfer to plants by a gifted microbe. *Current topics in Microbiology and Immunology* 240:21-57.

Harris JR, Markl J, 2000. Keyhole limpet hemocyanin: molecular structure of a potent marine immunoactivator. A review. *European Urology* 37:24–33.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink H-K, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke RA, 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms; a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84:1361–1392.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD, 2000. The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the clinical advisory committee meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Modern Pathology* 13:193–207.

Hawkins RE, Winter G, Hamblin TJ, Stevenson FK, Russell SJ, 1993. A genetic approach to idiotypic vaccination. *Journal of Immunotherapy* 14:273–278.

Hawkins RE, Zhu D, Ovecka M, Winter G, Hamblin TJ, Long A, Stevenson FK, 1994. Idiotypic vaccination against human B-cell lymphoma. Rescue of variable region gene sequences from biopsy material for assembly as single-chain Fv personal vaccines. *Blood* 83:3279–3288.

Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K, 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342:76–78.

Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R, Reiser M, Metzner B, Harder H, Hegewisch-Becker S, Fischer T, Kropff M, Reis HE, Freund M, Wörmann B, Fuchs R, Planker M, Schimke J, Eimermacher H, Trümper L, Aldaoud A, Parwaresch R, Unterhalt M, 2005. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 106:3725–3732.

Horsch RB; Fry JE; Hoffmann NL; Eichholtz D; Rogers SG; Fraley RT, 1985. A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. *Science* 227:1229-31.

Hraška M, Rakouský S, Čurn V, 2008. Tracking of the CaMV-35S promoter performance in GFP transgenic tobacco, with a special emphasis on flowers and reproductive organs, confirmed its predominant activity in vascular tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94:239-251.

Hu S, Shively L, Raubitschek A, Sherman M, Williams LE, Wong JY, Shively JE, Wu AM, 1996. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Research* 56:3055-61.

Hudson PJ, Kortt AA, 1999. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of Immunological Methods* 231:177–189.

Hurvitz SA, Timmerman JM, 2005. Recombinant, tumour derived idiotype vaccination for indolent B cell non-Hodgkin's lymphomas: a focus on Favld. *Expert Opinion on Biological Therapy* 5:841–852.

Iturriaga G, Jefferson RA, Bevan MW, 1989. Endoplasmic reticulum targeting and glycosylation of hybrid proteins in transgenic tobacco. *Plant Cell* 1:381-390.

Jefferson RA, 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS fusion gene system. *Plant Molecular Biology Reporter* 4:387-405,

- Jia H, Liao M, Verbelen JP, Vissenberg K, 2007. Direct creation of marker-free tobacco plants from agroinfiltrated leaf discs. *Plant Cell Reports* 26:1961-1965.
- Joh LD, VanderGheynst JS, 2006. Perspective - Agroinfiltration of plant tissues for production of high-value recombinant proteins: an alternative to production in transgenic crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:2002-2004
- Kaleem Z, Zehnbauser BA, White G, Zutter MM, 2000. Lack of expression of surface immunoglobulin light chains in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *American Journal of Clinical Pathology* 113:399-405.
- Kaminski MS, Kitamura K, Maloney DG, Levy R, 1987. Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Inhibition of tumor immunity by free idiotype protein. *Journal of Immunology* 138:1289-1296.
- Kanter G, Yang J, Voloshin A, Levy S, Swartz JR, Levy R, 2007. Cell-free production of scFv fusion proteins: an efficient approach for personalized lymphoma vaccines. *Blood* 109:3393-3399.
- Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G, 1997. An Agrobacterium - mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* 122:101-108 .
- Kim HY, Tsai S, Lo SC, Wear DJ, Izadjoo MJ, 2011. Production and characterization of chimeric monoclonal antibodies against Burkholderia pseudomallei and B. mallei using the DHFR expression system. *PLoS ONE* 6:e19867.
- Klein TM, Harper EC, Svab Z, Sanford JC, Fromm ME, Maliga P, 1988. Stable genetic transformation of intact Nicotiana cells by the particle bombardment process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:8502-5.
- Komarova TV, Baschieri S, Donini M, Marusic C, Benvenuto E, Dorokhov YL, 2010. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert Review of Vaccines* 9:859-76.
- Kosits C, Callaghan M, 2000. Rituximab: a new monoclonal antibody therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Oncology Nursing Forum* 27:51-59.
- Kozak M, 1984. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Research* 12:857-872.
- Kozak M, 1989. The scanning model for translation: an update. *Journal of Cell Biology* 108:229-241.
- Kozak M, 1991a. A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expression* 1:111-115.
- Kozak M, 1991b. Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes *in vitro*. *Gene Expression* 1:117-125.
- Kozak M, 1991c. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *The Journal of Biological Chemistry* 266:19867-19870.
- Küppers R, 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature Reviews Cancer* 5:251-262.
- Kusnadi A, Nikolov ZL, Howard JA, 1997. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical consideration. *Biotechnology and Bioengineering* 56:473-484.
- Kwak LW, Campbell MJ, Zelenetz AD, Levy R, 1990. Combined syngeneic bone marrow transplantation and immunotherapy of a murine B-cell lymphoma: active immunization with tumor derived idiotypic immunoglobulin. *Blood* 76:2411-2417.

Kwak LW, Young HA, Pennington RW, Weeks SD, 1996. Vaccination with syngeneic, lymphoma-derived immunoglobulin idiotype combined with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor primes mice for a protective T-cell response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:10972–10977.

Lai EM, Kado CI, 2000. The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends in Microbiology* 8:361-9.

Landes Bioscience, 2011. *Landes Bioscience Journal: mAbs*

<http://www.landesbioscience.com/journals/mabs/about/>, accesso effettuato a novembre 2011.

Lee ST, Jiang YF, Park KU, Woo AF, Neelapu SS, 2007a. BiovaxID: a personalized therapeutic cancer vaccine for non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Opinion on Biological Therapy* 7:113–122.

Lee ST, Neelapu SS, Kwak LW, 2007b. Therapeutic Vaccin for lymphoma. *Yonsei Medical Journal* 1:1-10.

Leitzgen K, Knittler MR, Haas IG, 1997. Assembly of immunoglobulin light chains as a prerequisite for secretion. *The Journal of Biological Chemistry* 272:3117.

Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-68.

Li E, Pedraza A, Bestagno M, Mancardi S, Sanchez R, Burrone O, 1997. Mammalian cell expression of dimeric small immune proteins (SIP). *Protein Engineering* 10:731-6.

Li J, Menzel C, Meier D, Zhang C, Dübel S, Jostock T, 2007. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies. *Journal of Immunological Methods* 318:113-24.

Lienard D, Sourrouille C, Gomord V, Faye L, 2007. Pharming and transgenic plants. *Biotechnology Annual Review* 13:115–147.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J, 2000. *Molecular Cell Biology* 4th edition Ed. Freeman, New York.

Lombardi R, Circelli P, Villani ME, Buriani G, Nardi L, Coppola V, Bianco L, Benvenuto E, Donini M, Marusic C, 2009. High-level HIV-1 Nef transient expression in *Nicotiana benthamiana* using the P19 gene silencing suppressor protein of Artichoke Mottled Crinkle Virus. *BMC Biotechnology* 20:9-96.

Lucas J, Henriquez AC, Lottspeich F, Henschen A, Sängler HL, 1985. Amino acid sequence of the pathogenesis-related leaf protein p14 from viroid-infected tomato reveals a new type of structurally unfamiliar proteins. *The EMBO Journal* 4:2745-9.

Lutcke HA, Chow KC, Mickel FS, Moss KA, Kern HF, Scheele GA, 1987. Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *The EMBO Journal* 6:43-48.

Ma JK-C, Drake PMW, Christou P, 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Review Genetics* 4:794-804.

Macmillan Cancer Support, 2010. *About Non Hodgkin Lymphoma – Cancer Information*.

<http://www.macmillan.org.uk/Cancerinformation/Cancertypes/Lymphomanon-Hodgkin/AboutNHL/Aboutnon-Hodgkinlymphoma.aspx>. Accesso effettuato il 7 settembre 2011.

Marillonet S, Giritch A, Gils M, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y, 2004. In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by Agroinfiltration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:6852-6857

- Mariuzzi G, 2006. *Anatomia patologica e correlazioni anatomo-cliniche*. Ed. Piccin-Nuova Libreria.
- Marusic C, Nuttall J, Buriani G, Lico C, Lombardi R, Baschieri S, Benvenuto E, Frigerio L, 2007. Expression, intracellular targeting and purification of HIV Nef variants in tobacco cells. *BMC Biotechnology* 26:7-12.
- Mascarenhas JP, and Hamilton, DA, 1992. Artifacts in the localization of GUS activity in anthers of petunia transformed with a CaMV 35S-GUS construct. *The Plant Journal* 2: 405–408.
- Mason H S, Man-Kit Lam D, Arntzen CJ, 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:11745–11749.
- Matzke AJ, Neuhuber F, Park YD, Ambros PF, Matzke MA, 1994. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Molecular & General Genetics: MGG* 244:219-29.
- Mazumder B, Seshadri V, Imataka H, Sonenberg N, Fox PL, 2001. Translational silencing of ceruloplasmin requires the essential elements of mRNA circularization: poly(A) tail, poly(A)-binding protein, and eukaryotic translation initiation factor 4G. *Molecular Cell Biology* 21:6440-9.
- McCormick AA, Kumagai MH, Hanley K, Turpen TH, Hakim I, Grill LK, Tuse D, Levy S, Levy R, 1999. Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:703–708.
- McCormick AA, Reddy S, Reinl SJ, Cameron TI, Czerwinski DK, Vojdani F, Hanley KM, Garger SJ, White EL, Novak J, Barrett J, Holtz RB, Tusé D, Levy R, 2008. Plant-produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:10131-6.
- Monger W, Alamillo JM, Sola I, Perrin Y, Bestagno M, Burrone OR, Sabella P, Plana-Duran J, Enjuanes L, Garcia JA, Lomonosoff GP, 2006. An antibody derivative expressed from viral vectors passively immunizes pigs against transmissible gastroenteritis virus infection when supplied orally in crude plant extracts. *The Plant Biotechnology Journal* 4:623-31.
- Montano RF, Morrison SL, 2002. Influence of the isotype of the light chain on the properties of IgG. *Journal of Immunology* 168:224-231.
- Morrison S, Scharff M, 1975. Heavy chain-producing variants of a mouse myeloma cell line. *Journal of Immunology* 114:655-9.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15:473-497.
- National Comprehensive Cancer Network, 2010. *Non-Hodgkin's lymphoma – Overview*. <http://www.nccn.com/cancer-treatment/non-hodgkins-lymphoma.html> Accesso effettuato il 14 aprile 2010.
- National Cancer Institute, 2010. *Non-Hodgkin Lymphoma Home Page*. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/non-hodgkin> Accesso effettuato a giugno 2010.
- NHS, National Health Service, 2008. *Non-Hodgkin's Lymphoma – Definition*. <http://www.nhs.uk/conditions/non-hodgkins-lymphoma/Pages/Definition.aspx> Accesso effettuato a novembre 2008.

- Niderman T, Genetet I, Bruyère T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fritig B, Möisinger E, 1995. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 108:17-27.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G, 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10:1-6.
- Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, Flynn G, Midgley C, Lane D, Winter G, 1994. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *The EMBO Journal* 13:692-8.
- Odell JT, Nagy F, Chua N-H, 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
- Oi VT, Morrison SL, Herzenberg LA, Berg P, 1983. Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:825-829.
- Okamuro JK, Goldberg RG, 1985. Tobacco single copy DNA is highly homologous to sequences present in genomes of its diploid progenitors. *Molecular Genetics & Genomics* 198:290-298.
- Olafsen T, Betting D, Kenanova VE, Salazar FB, Clarke P, Said J, Raubitschek AA, Timmerman JM, Wu AM, 2009. Recombinant anti-CD20 antibody fragments for small-animal PET imaging of B-cell lymphomas. *Journal of Nuclear Medicine* 50:1500-8.
- Outchkourov NS, Peters J, de Jong J, Rademakers W, Jongsma MA, 2003. The promoter-terminator of chrysanthemum rbcS1 directs very high expression levels in plants. *Planta* 216:1003-12.
- Padidam M, Cao Y, 2001. Elimination of transcriptional interference between tandem genes in plant cells. *Biotechniques* 31:328-30, 332-4.
- Park HJ, Neelapu SS, 2008. Developing idiotypic vaccines for lymphoma: from preclinical studies to phase III clinical trials. *British Journal of Haematology* 142:179-91.
- Pastan I, Pai LH, Brinkmann U, FitzGerald D, 1996. Recombinant immunotoxins. *Breast Cancer Research and Treatment* 38:3-9.
- Paszowski J, Shillito RD, Saul M, Mandák V, Hohn T, Hohn B, Potrykus I, 1984. Direct gene transfer to plants. *The EMBO Journal* 3:2717-22.
- Patti T, 2008. *Progettazione e sviluppo di una piattaforma tecnologica di sintesi di proteine ricombinanti fitotossiche in endosperma di Oryza sativa*. Tesi di dottorato, Università degli studi di Udine.
- Pen J, Molendijk L, Quax WJ, Sijmons PC, van Ooyen AJJ, van den Elzen PJM, Rietveld K, Hoekema A, 1992. Production of Active *Bacillus licheniformis* Alpha-Amylase in Tobacco and its Application in Starch Liquefaction. *Bio/Technology* 10:292-296.
- Peterson E, Owens SM, Henry RL, 2006. Monoclonal antibody form and function: manufacturing the right antibodies for treating drug abuse. *The AAPS Journal* 8:E383-90.
- Pret'ová A, Obert B, Wetzstein HY, 2001. Leaf developmental stage and tissue location affect the detection of β -glucuronidase in transgenic tobacco plants. *Biotechnology Letters* 23:555-558.
- Primrose SB, Twyman RM, Old RW, 2004. *Ingegneria Genetica, principi e tecniche*. Ed. Zanichelli 218-228.

- Robinson CR, Sauer RT, 1998. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 11:5929-5934.
- Ruggiero F, Exposito JY, Bournat P, Gruber V, Perret S, Comte J, Olgarnier B, Garrone R, Theisen M, 2000. Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Letters* 469:132-6.
- Saidi Y, Schaefer DG, Goloubinoff P, Zrýd JP, Finka A, 2009. The CaMV 35S promoter has a weak expression activity in dark grown tissues of moss *Physcomitrella patens*. *Plant Signaling & Behavior* 4:457-9.
- Sakamaki I, Qin H, Kwak LW, 2011. Translational development of vaccination strategies in follicular NHL. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 24:295-304.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanders PR, Winter JA, Barnason AR, 1987. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Research* 15:1543-1558.
- Sanger M, Daubert S, Goodman RM, 1990. Characteristics of strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant Molecular Biology* 14:433-443.
- Senter PD, Saulnier MG, Schreiber GJ, Hirschberg DL, Brown JP, Hellström I, Hellström KE, 1988. Anti-tumor effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:4842-6.
- Shapiro AL, Scharff MD, Maizel JV, Uhr JW, 1966. Synthesis of excess light chains of gamma globulin by rabbit lymph node cells. *Nature* 211:243-245.
- Sheludko YV, Sindarovska YR, Gerasymenko IM, Bannikova MA, Kuchuk NV, 2006. Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale agrobacterium-mediated transient expression. *Biotechnology and bioengineering* 96:608-614.
- Sheng OJ, Citovsky V, 1996. Agrobacterium plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell* 8:1699-710.
- Schillberg S, Zimmermann S, Voss A, Fischer R, 1999. Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. *Transgenic Research* 8:255-263.
- Shillito RD, Saul MW, Müller M, Paszkowski J, Potrykus I, 1985. High efficiency direct gene transfer to plants. *Bio/Technology* 3:1099-1103.
- Schouten A, Roosien J, Bakker J, Schots A, 2002. Formation of disulfide bridges by a single-chain Fv antibody in the reducing ectopic environment of the plant cytosol. *The Journal of Biological Chemistry* 277:19339-45.
- Skvortsov VT, Gurvich AE, 1968. Relative rates of synthesis of immunoglobulins and light chains in rabbit spleen cells during secondary response. *Nature* 218:377-378.
- Sonenshein G, Siekevitz M, Siebert G, Gefter M, 1978. Control of immunoglobulin secretion in the murine plasmacytoma line MOPC 315. *The Journal of Experimental Medicine* 148:301-312.
- Stachel SE, Nester EW, Zambryski PC, 1986. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:379-383.

- Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PT, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, Ward D, Ye G, Russell DA, 2000. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnology* 18:333-8.
- Stevenson GT, Stevenson FK, 1975. Antibody to a molecularly defined antigen confined to a tumour cell surface. *Nature* 254:714-716.
- Stevenson GT, Elliott EV, Stevenson FK, 1977. Idiotypic determinants on the surface immunoglobulin of neoplastic lymphocytes: a therapeutic target. *Federation Proceedings* 36:2268-2271.
- Stoger E, Marcel S, Twyman RM, 2004. Crop plants for molecular farming. *Handbook of Plant Biotechnology*. Ed. John Wiley and Sons Ltd. 747-758.
- Stothard P, 2000. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102-1104.
- Sunilkumar G, Mohr L, Lopata-Finch E, Emani C, Rathore KS, 2001. Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Molecular Biology* 50:463-74.
- Syngelas AD, Chen TT, Levy R, 1996. DNA immunization induces protective immunity against B-cell lymphoma. *Nature Medicine* 2:1038-41.
- Timmerman JM, Singh G, Hermanson G, Hobart P, Czerwinski DK, Taidi B, Rajapaksa R, Caspar CB, Van Beckhoven A, Levy R, 2002b. Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine encoding chimeric idiotype in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Research* 62:5845-5852.
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM, 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* 35:W71-W74.
- Vaghchhipawala Z, Rojas CM, Senthil-Kumar M, Mysore KS, 2011. Agroinoculation and agroinfiltration: simple tools for complex gene function analyses. *Methods in Molecular Biology* 678:65-76.
- Van der Hoorn RAL, Laurent F, Roth R, De Wit PJGM, 2000. Agroinfiltration Is a Versatile Tool That Facilitates Comparative Analyses of Avr9/Cf-9-Induced and Avr4/Cf-4-Induced Necrosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4:439-446.
- Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, Van den Elsacker S, Zaenen I, Schilperoort RA, Schell J, 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing ability. *Nature* 252:169-170.
- Vaquero C, Sack M, Schuster F, Finnern R, Drossard J, Schumann D, Reimann A, Fischer R, 2002. A carcinoembryonic antigen-specific diabody produced in tobacco. *The FASEB Journal* 16:408-10.
- Vitale A, Denecke J, 1999. The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* 11:615-628.
- Walsh G, 1998. Pharmaceuticals, biologics and biopharmaceuticals. *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology* Ed. Wiley, Chichester, UK 1:35.
- Warnke R, Levy R, 1980. Detection of T and B cell antigens hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 28:771-6.
- Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Williamson JD, Hirsch-Wyncott ME, Larkins BA, Gelvin SB, 1989. Differential Accumulation of a Transcript Driven by the CaMV 35S Promoter in Transgenic Tobacco. *Plant Physiology* 90:1570-6.

Winans SC, 1992. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiological Reviews* 56:12-31.

Whitlow M, Bell BA, Feng SL, Filpula D, Hardman KD, Hubert SL, Rollence ML, Wood JF, Schott ME, Milenic DE, et al., 1993. An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Engineering* 6:989-95.

Yang Y, Li R, Qi M, 2000. *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *The Plant Journal* 22:543-51.

Yoo SY, Bomblies K, Yoo SK, Yang JW, Choi MS, Lee JS, Weigel D, Ahn JH, 2005. The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. *Planta* 221:523-30.

Zaenen I, Van Larbeke N, Teuchy H, Van Montagu M, Schell J, 1974. Super-coiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *Molecular Biology* 86:109-27.

Zauli G, Corallini F, Zorzet S, Grill V, Marzari R, Secchiero P, 2010. *In vivo* anti-lymphoma activity of an agonistic human recombinant anti-TRAIL-R2 minibody. *Investigational New Drugs*. [Epub ahead of print]

7. INDICE DELLE FIGURE

Figura 1.1 Elenco esemplificativo di proteine terapeutiche prodotte in pianta (da Lienard et al., 2007)	10
Figura 1.2 <i>Nicotiana tabacum</i> L.	11
Figura 1.3 Un tumore al colletto generato da <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
Figura 1.4 Processo di infezione di <i>A. tumefaciens</i>	13
Figura 1.5 Struttura del plasmide pTi	14
Figura 1.6 Interazione ospite-patogeno: attivazione e ruolo dei geni <i>vir</i> in un'infezione di <i>A. tumefaciens</i>	15
Figura 1.7 Struttura generale di una cassetta di espressione eucariotica. In questo esempio sono mostrate solamente le strutture primarie di acidi nucleici e peptidi; per semplicità è stata considerata una CDS priva di introni	16
Figura 1.8 Immagine al microscopio di una cellula di Reed-Sternberg in comparazione a un linfocita sano	18
Figura 1.9 Caratterizzazione del decorso clinico per i principali sottotipi di NHL (Da Harris et al., 1994)	19
Figura 1.10 Stadi di un NHL secondo la classificazione di Ann Arbor (da Carbone et al., 1971)	19
Figura 1.11 Regimi terapeutici attualmente impiegati per le principali tipologie di NHL DLBCL: Linfoma diffuso a grandi cellule B; FL: linfoma follicolare; R-CHOP: Rituximab, ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina, prednisone; R-CVP: Rituximab, ciclofosfamide, vincristina, prednisone; R-DHAP: Rituximab, desametasone, cisplatino, citarabina, R-ICE: Rituximab, ifosfamide, carboplatino, etoposide (da Coiffier, 2005; Hiddemann et al., 2005; Datamonitor, 2009)	22
Figura 1.12 Rappresentazione di un'immunoglobulina di superficie presente sulle cellule B. Le catene pesanti sono rappresentate in blu, quelle leggere in rosa. C _{H1} , C _{H2} , C _{H3} : regioni costanti della catena pesante; C _L : regione costante della catena leggera; V _L , V _H : regioni variabili della catena leggera e pesante. La zona cerchiata rappresenta la porzione variabile, dove si trova la regione idiotipica	23
Figura 1.13 Strategie di produzione di vaccini idiotipo-specifici IGHV e IGLV: regioni variabili delle catene pesanti (H) e leggere (L) dell'Ig di superficie (da Park e Neelapu, 2008)	24
Figura 1.14 Struttura di un'immunoglobulina. In rosa le regioni variabile e costante della catena leggera (V _L , C _L); in blu quelle della catena pesante (V _H , C _{H1} , C _{H2} , C _{H3}); Fv: frammento variabile, V _L +V _H ; Fab: frammento legante l'antigene (Fragment, antigen binding), C _{H1} +V _H e C _L +V _L ; Fc: frammento costante con tendenza a formare aggregati (Fragment, crystalizable), C _{H2} + C _{H3}	25
Figura 1.15 Rappresentazione grafica della struttura dei diversi sottotipi di Ig	26
Figura 1.16 Mab e frammenti derivati (da Landes Bioscience, 2011; Michael Hust, Technical University of Braunschweig)	28

Figura 1.17 Struttura del minibody	30
Figura 1.18 Dimerizzazione di un minibody (da Hu et al., 1996)	31
Figura 1.19 Quattro varianti base del minibody; m: murino, h: umano	32
Figura 3.1 NCBI website http://www.ncbi.nlm.nih.gov	34
Figura 3.2 The Sequence Manipulation Suite website http://www.bioinformatics.org/sms2/	35
Figura 3.3 ExpASy website http://www.expasy.org/	35
Figura 3.4 Interfaccia grafica di Primer3Plus http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi	39
Figura 3.5 Marcatori di peso molecolare (NEB) utilizzati.....	44
Figura 3.6 Elaborazione delle immagini acquisite dei gel di agarosio; da sinistra a destra: immagine tal quale, in scala di grigi, immagine negativa, elaborazione finale.....	45
Figura 3.7 Struttura del vettore pGEM [®] -T	49
Figura 3.8 Struttura del vettore pUC18 (www.fermentas.com)	50
Figura 3.9 Struttura del vettore pSTART	51
Figura 3.10 Struttura del vettore pCAMBIA2300	52
Figura 3.11 Struttura del vettore pCAMBIA2301	52
Figura 3.12 Sistema di coltivazione in idroponica.....	58
Figura 3.13 Schema di funzionamento di un saggio ELISA - Double Antibody Sandwich	62
Figura 3.14 Immissione dei dati nel programma	65
Figura 3.15 Grafico della curva di calibrazione dei campioni.....	65
Figura 3.16 Risultati dell'elaborazione (nella metà superiore)	66
Figura 3.17 Affinità di proteina A e G per anticorpi di diversa provenienza (GE Healthcare)	71
Figura 4.1 Struttura primaria, secondaria, terziaria e quaternaria delle proteine (dal servizio didattico del Brooklin College di New York, http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/).....	73
Figura 4.2 Domini conservati e funzioni specifiche secondo Scan prosite	78
Figura 4.3 Domini conservati secondo BLASTn (NCBI Conserved Domains database)	79
Figura 4.4 Struttura di un tipico dominio Ig-like; a) motivo a chiave greca; b) e c) rappresentazione rispettivamente in 2 e 3 dimensioni di un dominio Ig-like; le strutture β strand sono indicate con frecce, rappresentando anche la direzionalità della sequenza dall'N- al C-terminale	79
Figura 4.5 Analisi delle sequenze con ELM per Va, Vb, Vc e Vd.....	80

Figura 4.6 Rappresentazione grafica della cassetta di espressione base per minibody; in evidenza i siti di restrizione importanti per il lavoro di manipolazione dei costrutti. In alto la struttura generica per Va e Vc (portanti il nonamero), in basso per Vb e Vd	109
Figura 4.7 PCR di controllo per pGA_PSlc_ΔV _L	110
Figura 4.8 Digestione di controllo per pSTART_35S _{LLTCK} _PSlcy_Va_nos A sinistra le miniprep non digerite	111
Figura 4.9 Rappresentazione grafica dei costrutti pSTART_35S _{LLTCK} _PSott_Va_nos (a sinistra) e pSTART_35S _{LLTCK} _PSlcy_Va_nos (a destra)	112
Figura 4.10 Digestione di Vb, Vc e Vd; sono evidenziati i punti di recupero della banda a basso PM da gel: si noti la differenza della forma Vc, che presenta il nonamero	113
Figura 4.11 PCR di controllo per PSlcy Va, Vb e Vc	114
Figura 4.12 PCR di controllo per colonie di agrobatterio portanti PSlcy.....	115
Figura 4.13 Schema rappresentante le 2 PCR sequenziali	116
Figura 4.14 1° e 2° PCR allestite per inserire KDEL in Va.....	116
Figura 4.15 PCR su colonia per pGEM [®] -T_ΔV _L _mC _{H3} _9aa-KDEL	117
Figura 4.16 PCR di controllo per pSTART_35S _{LLTCK} _PSlcy_Va-KDEL_nos	118
Figura 4.17 Rappresentazione del vettore pSTART_35S _{LLTCK} _PSlcy_Va-KDEL_nos.....	118
Figura 4.18 PCR da <i>A. tumefaciens</i> per pSTART_35S _{LLTCK} _PSlcy_Va-KDEL_nos.....	119
Figura 4.19 PCR per la creazione di <i>Hind</i> III-RBSnat- <i>Xba</i> I	120
Figura 4.20 PCR su colonia per pGEM [®] -T_ <i>Hind</i> III-RBSnat- <i>Xba</i> I	121
Figura 4.21 PCR su colonia per pSTART_RBSnat_GUS_nos CP/2: miniprep CP utilizzata come stampo in quantità minore; in CP si nota una banda a ~3000 bp corrispondente al vettore stampo (pGEM [®] -T_ <i>Hind</i> III-RBSnat- <i>Xba</i> I).....	122
Figura 4.22 Digestioni di controllo per pSTART_RBSnat_GUS_nos.....	122
Figura 4.23 PCR su colonia per pSTART_RBS _{LLTCK} _GUS_nos	123
Figura 4.24 Digestione di controllo per pSTART_RBS _{LLTCK} _GUS_nos.....	124
Figura 4.25 Digestione di confronto fra i tre costrutti con diverso promotore	125
Figura 4.26 PCR per la creazione di <i>Sac</i> I-RBster- <i>Eco</i> RI	127
Figura 4.27 PCR su colonia per pGEM [®] -T_ <i>Sac</i> I-RBster- <i>Eco</i> RI	127
Figura 4.28 PCR su colonia per i costrutti con RBster	129
Figura 4.29 Digestione di controllo per i costrutti con RBster.....	129

Figura 4.30 PCR di controllo per colonie di <i>A. tumefaciens</i>	130
Figura 4.31 Schema rappresentante la conformazione del T-DNA dei vettori pSTART, pCAMBIA2300 e pCAMBIA2300 portante la cassetta di espressione per GUS derivata da pSTART.....	131
Figura 4.32 Digestioni di controllo per pCAMBIA2300_35S _{LLTCK} _GUS_nos.....	132
Figura 4.33 Digestione di controllo per pCAMBIA2300_35S _{LLTCK} _GUS_nos in <i>A. tumefaciens</i>	132
Figura 4.34 PCR per la creazione di Δ GUSintr	134
Figura 4.35 PCR su colonia per pGEM [®] -T_ Δ GUSintr	135
Figura 4.36 PCR su colonia per pUC18_35S_GUSintr_nos	136
Figura 4.37 Digestioni di controllo per pUC18_35S_GUSintr_nos; per ciascuna colonia sono state caricate la miniprep tal quale (mp) e il prodotto di digestione (dig).....	136
Figura 4.38 PCR su colonia per pSTART_35S _{LLTCK} _GUSintr_nos	137
Figura 4.39 Digestione di controllo per GUSintr; i frammenti da 12 bp sono troppo piccoli per poter essere visualizzati in gel di agarosio e vengono persi durante la corsa; questo gel è stato calibrato per risolvere bene frammenti a basso PM ma non ad alto PM, che infatti appaiono appiattiti nella parte alta delle corsie	138
Figura 4.40 PCR di controllo per costrutti con GUSintr in EHA105	139
Figura 4.41 PCR su colonia per pSTART_35S _{LLTCK} _PSlyc_Vc-KDEL_nos.....	140
Figura 4.42 Digestioni di controllo per pSTART_35S _{LLTCK} _PSlyc_Vc-KDEL_nos	140
Figura 4.43 1° e 2° PCR per Vb-KDEL	141
Figura 4.44 PCR su colonia per pGEM [®] -T_ Δ V _H _mC _{H3} -KDEL.....	142
Figura 4.45 PCR di verifica per pSTART_35S _{LLTCK} _PSlyc_Vb-KDEL_nos.....	143
Figura 4.46 PCR di controllo per pSTART_35S _{LLTCK} _PSlyc_Vd-KDEL_nos.....	144
Figura 4.47 PCR da <i>A. tumefaciens</i> per pSTART_35S _{LLTCK} _PSlyc_Vb/c/d-KDEL_nos	145
Figura 4.48 Plantule di tabacco in Baby jar al momento del prelievo dei dischetti fogliari per la trasformazione. Materiale fogliare giovane favorisce una miglior rigenerazione <i>in vitro</i>	146
Figura 4.49 Dischetti fogliari disposti su substrato MS10 al momento dell'inoculo con le colture di <i>A. tumefaciens</i> ; nei successivi trasferimenti su substrato di selezione il numero di dischetti per piastra viene progressivamente ridotto.....	146
Figura 4.50 Dischetti fogliari in fase di selezione su MS10-Cefotaxime-Kanamicina.....	147
Figura 4.51 Calli formati da dischetti fogliari mantenuti su substrato selettivo; sono evidenti i germogli (verdi) originatisi in più zone di ciascun callo	147

Figura 4.52 Plantule putativamente trasformate in substrato per la radicazione (in contenitore Magenta a sinistra e Sarstedt a destra)	147
Figura 4.53 Processo di rimozione del substrato gelificato e posa in idroponica della plantula radicata; nell'accomodare la giovane pianta nel supporto le foglie più vecchie, alla base, vengono rimosse .	148
Figura 4.54 Piantine in crescita in idroponica, a un giorno (a sinistra) e otto giorni (a destra) dal trasferimento. L'adattamento dal vitro all'idroponica avviene in poche ore.....	148
Figura 4.55 Piante di tabacco trasformate dopo 3 settimane di crescita in idroponica	149
Figura 4.56 Foglia di tabacco di medie dimensioni appartenente a una pianta trasformata cresciuta in idroponica per 3 settimane. Le foglie possono arrivare facilmente a una lunghezza di 50 cm. Il foro presente nella parte apicale è indice di un prelievo di una piccola quantità di tessuto per scopi analitici	149
Figura 4.57 Strumento portatile con funzioni di pHmetro e conduttimetro, nella foto è utilizzato nella calibrazione del pH in una vasca in fase di allestimento.....	150
Figura 4.58 Differenze morfologiche fra germogli derivati da espianti trasformati con pSTART (a sinistra) e pCAMBIA2300 (a destra)	153
Figura 4.59 Agroinfiltrazione: infezione con una coltura di <i>A. tumefaciens</i> (in alto) misurazione della superficie agroinfiltrata e prelievo di dischetti fogliari (in basso)	155
Figura 4.60 Schema rappresentante la localizzazione dei prelievi effettuati nella pianta di tabacco	156
Figura 4.61 Grafico rappresentante le quantità di vaccino Va riscontrate nei diversi prelievi (a, b, c) in ciascuna foglia analizzata. K1, K2, K3: piante trasformate con costrutto portante Va-KDEL	157
Figura 4.62 ANOVA per gruppi K1, K2, K3	157
Figura 4.63 ANOVA per gruppi K1↑, K1·, K1↓	158
Figura 4.64 ANOVA per gruppi a, b, c (K1)	158
Figura 4.65 ANOVA per gruppi random1 e random2 (K1)	158
Figura 4.66 ANOVA per gruppi K2↑, K2·, K2↓	158
Figura 4.67 ANOVA per gruppi a, b, c (K2)	159
Figura 4.68 ANOVA per gruppi random1 e random2 (K2)	159
Figura 4.69 ANOVA per gruppi K3↑, K3·, K3↓(A7)	159
Figura 4.70 ANOVA per gruppi a, b, c (K3)	159
Figura 4.71 ANOVA per gruppi random1 e random2 (K3)	160
Figura 4.72 ANOVA per gruppi random provenienti da K1, K2 e K3	160
Figura 4.73 Selezione dei migliori trasformati Va	161

Figura 4.74 Selezione dei migliori trasformati Vb.....	162
Figura 4.75 Selezione dei migliori trasformati Vc	162
Figura 4.76 Selezione dei migliori trasformati Vd.....	162
Figura 4.77 ELISA su trasformati Va alla 2° settimana	163
Figura 4.78 ELISA su trasformati Va-KDEL alla 2° settimana	163
Figura 4.79 ANOVA per Va e Va-KDEL alla 2° settimana dalla messa in idroponica	164
Figura 4.80 ELISA su migliori trasformati Va alla 4° settimana	164
Figura 4.81 ELISA su migliori trasformati Va-KDEL alla 4° settimana Si noti l'intervallo delle ordinate, molto più ampio rispetto agli altri grafici riportati	164
Figura 4.82 ANOVA per Va e Va-KDEL alla 4° settimana dalla posa in idroponica.....	165
Figura 4.83 ANOVA per Va e Va-KDEL alla 4° settimana dalla posa in idroponica, no AK7	165
Figura 4.84 Saggio GUS istochimico condotto su dischetti fogliari di piante trasformate con i costrutti pSTART_35S _{LLTCK} (S) / RBSnat (N) / RBS _{LLTCK} (L)_GUS_nos; i dischetti mancanti sono andati distrutti durante le procedure di manipolazione degli stessi. Il numero a lato del codice di identificazione del costrutto indica la pianta sottoposta a saggio	166
Figura 4.85 Saggio GUS istochimico condotto su radici di piante trasformate.....	167
Figura 4.86 Saggio GUS istochimico su dischetti fogliari per piante trasformate con i costrutti pSTART_35S _{LLTCK} / RBSnat / RBS _{LLTCK} _GUS_RBster.....	168
Figura 4.87 Saggio GUS su foglie pSTART_35S _{LLTCK} _GUS_nos	168
Figura 4.88 Saggio GUS, media per pianta (pSTART_35S _{LLTCK} _GUS_nos).....	169
Figura 4.89 Saggio GUS su foglie pSTART_RBSnat_GUS_nos.....	169
Figura 4.90 Saggio GUS, media per pianta (pSTART_RBSnat_GUS_nos)	169
Figura 4.91 Saggio GUS su foglie pSTART_RBS _{LLTCK} _GUS_nos	170
Figura 4.92 Saggio GUS, media per pianta (pSTART_RBS _{LLTCK} _GUS_nos).....	170
Figura 4.93 Saggio GUS su foglie pSTART_35S _{LLTCK} _GUS_RBster	170
Figura 4.94 Saggio GUS, media per pianta (pSTART_35S _{LLTCK} _GUS_RBster).....	171
Figura 4.95 Saggio GUS su foglie pSTART_RBSnat_GUS_RBster.....	171
Figura 4.96 Saggio GUS, media per pianta (pSTART_RBSnat_GUS_RBster)	171
Figura 4.97 Saggio GUS su foglie pSTART_RBS _{LLTCK} _GUS_RBster.....	172
Figura 4.98 Saggio GUS, media per pianta (pSTART_RBS _{LLTCK} _GUS_RBster)	172

Figura 4.99 ANOVA per popolazioni di dati relativi alle singole foglie (Sf, Nf...) per ciascun costruito	173
Figura 4.100 ANOVA per popolazioni di dati relativi alla media per pianta (Sp, Np...) per ciascun costruito.....	173
Figura 4.101 PCR su DNA genomico per piante trasformate con pSTART_35S _{LLTCK} _GUS_nos	175
Figura 4.102 PCR su DNA genomico per piante trasformate con Cambia2300_35S _{LLTCK} _GUS_nos....	176
Figura 4.103 PCR su DNA genomico per pSTART_35S _{LLTCK} _GUS_nos, pCAMBIA2300_35S _{LLTCK} _GUS_nos e pCAMBIA2301	176
Figura 4.104 Saggio GUS istochimico su dischetti fogliari di piante trasformate con pSTART e pCAMBIA	177
Figura 4.105 Saggio GUS su foglie pSTART_35S _{LLTCK} _GUS_nos	177
Figura 4.106 Saggio GUS, media per pianta (pSTART_35S _{LLTCK} _GUS_nos).....	178
Figura 4.107 Saggio GUS su foglie pCAMBIA2300_35S _{LLTCK} _GUS_nos	178
Figura 4.108 Saggio GUS, media per pianta (pCAMBIA2300_35S _{LLTCK} _GUS_nos).....	178
Figura 4.109 Saggio GUS istochimico su trasformati portanti GUS e GUSintr	179
Figura 4.110 Saggio GUS fluorimetrico da dischetti fogliari: da controllo negativo (CN), da agroingiltrazione (AI) prelevati a 24, 48 o 96h e da trasformazione stabile (GUSintr, GUS)	180
Figura 4.111 Grafici delle curve di calibrazione 4-MU utilizzate per saggi GUS da succo fogliare (a sinistra) e dischetto fogliare (a destra); il tipo di curva è diverso poiché nell'intervallo inferiore si è nel range di linearità della curva 4-MU.....	180
Figura 4.112 Saggio GUS fluorimetrico da dischetti fogliari da controllo negativo (CN) e da agroinfiltrazione (AI) prelevati a 96h; questi risultati sono incoraggianti anche se ancora non validi (si notino le barre di errore presenti nei campioni da AI)	181
Figura 4.113 Saggio GUS fluorimetrico da dischetti fogliari da controllo negativo (CN) e da agroingiltrazione (AI) prelevati a 96h; reazioni lasciate in incubazione per 1h, 20h e 44 h	181
Figura 4.114 Immunoprecipitazione (IP) da estratto Va-KDEL.....	182
Figura 4.115 ELISA su campioni cromatografici CN: controllo negativo – tq: tal quale – FT: flow-through.....	183
Figura 5.1 Frequenza di impiego di elementi regolatori utilizzati nell'espressione di anticorpi in pianta; le tre tipologie principali vedono l'uso di promotori 35S (da De Muynck et al., 2010).....	188
Figura 5.2 Modello di circolarizzazione dell'mRNA, mediato dal legame della Poly-A-Binding Protein (PABP) sia alla coda poli-A che al fattore eIF4GG del complesso di inizio della traduzione (da Mazumder et al., 2001).....	189

Figura 5.3 Cassette di espressione con varie combinazioni di elementi regolatori..... 190

8. INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1.1 Proprietà della produzione di proteine ricombinanti in diversi sistemi di espressione (da Fischer e Emans, 2000).....	9
Tabella 1.2 Metodi di trasformazione genetica utilizzati in tabacco	12
Tabella 1.3 Molecole di interesse farmaceutico prodotte in piante di tabacco transgenico FW: fresh weight, peso fresco; SLP: soluble leaf protein, proteina solubile da foglia; SP: seed protein, proteina di seme; NR: dato non riportato	12
Tabella 1.4 Fattori considerati nell'indice IPI LDH: lattato deidrogenasi; ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status.....	20
Tabella 1.5 Immunofenotipi caratteristici delle principali tipologie di NHL ** antigeni espressi nel >90% dei casi; * immunoglobulina di superficie (da Harris et al., 1994)	20
Tabella 1.6 Isotipi degli anticorpi umani, caratteristiche e funzioni (da Abbas et al., 2002).....	26
Tabella 3.1 Composizione del substrato MS10 per litro di soluzione senza la presenza di ormoni	53
Tabella 3.2 Ormoni presenti nel substrato MS10	53
Tabella 3.3 Antibiotico presente nella composizione MS10 Cefotaxime.....	53
Tabella 3.4 Antibiotici presenti nel substrato MS10 Cef-Kana.....	53
Tabella 3.5 Composizione substrato "mezza forza"	54
Tabella 3.6 Soluzione salina Murashige e Skoog.....	54
Tabella 3.7 Materiale occorrente per la trasformazione	56
Tabella 3.8 Composizione del concime 15-5-30.....	57
Tabella 3.9 Composizione del concime ME.....	57
Tabella 3.10 Concentrazione di concime presente nel substrato di coltura e conducibilità elettrica corrispondente in relazione al tempo di coltivazione in idroponica.....	58
Tabella 3.11 Composizione del substrato di induzione per AI	59
Tabella 3.12 Composizione del substrato di infiltrazione per AI.....	60
Tabella 3.13 Composizione del tampone di estrazione	61
Tabella 3.14 Composizione del tampone di diluizione per ELISA	61
Tabella 3.15 Composizione del tampone PBS (Phosphate Buffer Saline).....	62
Tabella 3.16 Composizione della soluzione di coating.....	63
Tabella 3.17 Composizione della soluzione di lavaggio	63

Tabella 3.18 Composizione della soluzione di blocking	64
Tabella 3.19 Composizione della soluzione contenente anticorpo coniugato	64
Tabella 3.20 Composizione della soluzione X-Gluc	67
Tabella 3.21 Composizione del tampone fosfato 2x (pH 7.0)	67
Tabella 3.22 Composizione del tampone di estrazione per GUS	68
Tabella 3.23 Composizione della soluzione MUG	68
Tabella 3.24 Composizione del tempone di lisi per immunoprecipitazione	69
Tabella 3.25 Composizione del Laemmli Buffer	69
Tabella 4.1 Analisi con Compute pI/Mw tool e ProtParam.....	78
Tabella 4.2 Sommario dei risultati dell'analisi bioinformatica per i PS selezionati (vedi testo)	107
Tabella 4.3 Tempi di svolgimento di un evento di trasformazione.....	150
Tabella 4.4 Dati relativi al processo di trasformazione e rigenerazione per le 4 forme base di minibody	151
Tabella 4.5 Dati relativi al processo di trasformazione e rigenerazione per Va e Va-KDEL	151
Tabella 4.6 Dati relativi al processo di trasformazione e rigenerazione per i costrutti "RBS" portanti terminatore nos	152
Tabella 4.7 Dati relativi al processo di trasformazione e rigenerazione per i costrutti "RBS" portanti terminatore RBSter	152
Tabella 4.8 Monitoraggio della trasformazione per pSTART e pCAMBIA2300; Ø: n. dischetti.....	153
Tabella 4.9 Monitoraggio della trasformazione per pSTART, pCAMBIA2300 e pCAMBIA2301; Ø: n. dischetti.....	154
Tabella 4.10 ANOVA per il confronto fra promotori; si ritiene esistere una diversità significativa fra le due popolazioni se $F > F_{crit}$ e $P\text{-Value} < 0.05$	174
Tabella 4.11 ANOVA per il confronto fra terminatori; si ritiene esistere una diversità significativa fra le due popolazioni se $F > F_{crit}$ e $P\text{-Value} < 0,05$	174

9. RINGRAZIAMENTI

Voglio ringraziare il prof. Marchetti per avermi dato l'occasione di svolgere questo percorso formativo e per la fiducia sempre dimostrata nei miei confronti.

Desidero ringraziare in particolar modo i prof. Roberto Tuberosa e Maria Teresa Conconi per la disponibilità dimostrata e gli utili commenti forniti nella revisione di questo lavoro.

Ringrazio inoltre il prof. Spanghero per la dedizione e l'impegno con cui ha sempre seguito i dottorandi.

Grazie al gruppo di Difesa delle Piante per la gentilezza e la disponibilità nell'utilizzo delle loro attrezzature.

Grazie infinite ai miei colleghi per gli impagabili consigli e il prezioso aiuto forniti, in particolare alla dr.ssa Tamara Patti per avermi già in passato insegnato tutto sulla biologia molecolare, alla dr.ssa Carla Pappalardo per avermi introdotto al mondo delle trasformazioni di tabacco, al dr. Emanuele Cettul per avermi svelato i segreti dell'idroponica, alla dr.ssa Flavia Mazzarol per essere impazzita fra dischetti e ELISA e avermi trasmesso il suo sapere, al dr. Piero Cristin per aver condiviso con me la gioia di essere una purification (e agroinfiltration) unit, e ai dr. Maurizio Martinuzzi, Serena Versolatto, Erika Secco e Fernanda V.R. De Almeida per aver assieme agli altri ascoltato preoccupazioni, sfoghi, battute e nonostante tutto essere stati ancora in grado di supportarmi con preziose conversazioni e ottime pause caffè. Noi sì che siamo gente che conta!

Grazie alla mia famiglia, da ormai più di un quarto di secolo felicemente rassegnata al mio desiderio di voler diventare una scienziata.

Grazie ai miei amici, largamente sparsi per il mondo ma sempre vicini al momento giusto.

Grazie a Marco, che mi permette di non prendermi mai troppo sul serio.