



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

---

**Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie Agrarie  
Ciclo XXIV  
Coordinatore: Prof. Mauro Spanghero**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA**

**SVILUPPO DI PIANTE BIOREATTORE PER LA  
PRODUZIONE DI POLIPEPTIDI ELASTINO-  
SIMILI**

**DOTTORANDO  
Dott. Maurizio Martinuzzi**

**SUPERVISORE  
Prof. Stefano Marchetti**

---

**ANNO ACCADEMICO 2010/2011**

*A mio Padre e a mia Madre*

## SUMMARY

Recombinant elastin-like polypeptides (ELPs) represent one of the most fascinating example of extracellular matrix (ECM)-mimicking materials, due to their unique biochemical and physical properties. In previous work, a recombinant Human Elastin-Like Polypeptide (HELP) was expressed in a prokaryotic system and its enzymatically cross-linked matrices studied for mechanical properties and interaction with human hepatoblastoma cells.

This work was aimed at designing and producing HELP by recombinant DNA technology in plants. Molecular farming in plant seed is particularly attractive in view of the low investments and running costs and the possibility to obtain a pathogen-free human product which can be inexpensively stored for prolonged time.

Besides a cross-linking domain exploitable for the enzymatic preparation of hydrogel matrices, the monomer includes several repeats of the most structurally regular motif (VAPGVG) of human tropoelastin. The host plant was the rice (*Oryza sativa* L., ssp. japonica) variety CR W3, unsuitable for food purposes due to the presence of a waxy endosperm.

A codon-optimized gene (HELP-R) was synthesized and cloned in a pCAMBIA-1300 ([www.cambia.org](http://www.cambia.org)) derivative under the control of the rice GluB-4 glutelin promoter to give a seed-specific expression. In order to achieve the co-translational transfer of HELP into the lumen of endoplasmic reticulum, the nucleotide sequence coding for the signal peptide of GluB-4 was fused in frame with the HELP-R gene. The phosphomannose isomerase (PMI) gene was used as marker for selection.

The vector was electroporated into strain EHA105 of *Agrobacterium tumefaciens*; the engineered strain was used for transformation of pre-conditioned, scutellum-derived rice calluses. Crude seed extracts from transgenic plants were analyzed by Western blotting using an anti human beta-elastin raised in rabbit (GenWay). Quantitative determination of HELP in a solution was achieved by DAS-ELISA, using a mouse anti-elastin monoclonal antibody (Sigma E4013) for coating and a rabbit anti-elastin polyclonal antibody for detection (Davids Biotechnologie GmbH).

153 putatively transformed plants were regenerated under selective conditions. PCR analyses showed that the T-DNA was actually present in total DNA extracted from the leaves of these plants.

For 91 out of 130 tested plants an immunoreactive band of the expected mass was detected in total seed protein by Western blotting.

Transformant selection was carried out through progeny testing by Western blotting. Best lines were advanced to the next generation and further selected with DAS-ELISA. The latter procedure was developed in a study carried out with different antibody combinations and tested for reliability using samples obtained by different mixing of CR W3 whitened rice flour with a transformed seed flour.

Moreover, the seed from some selected lines was bulked, dehulled, whitened and milled to produce a flour lot eventually used to develop a methods for HELP-R extraction. For this purpose, several buffers, pHs, incubation times and temperatures were tested allowing a first characterization of the recombinant protein and of the productive lines. With this background knowledge, HELP-R purification was attempted by inversion transition cycling. Rice crude extracts and all fractions derived therefrom were analyzed by DAS-ELISA, Western blotting, SDS-PAGE and spectrophotometric reading at 280 nm. Quantitative data were submitted to statistical analysis for proper interpretation of the results. On the basis of experimental work, the following could be established: 1. with the molecular construct we used, the content of HELP-R is up to 0.2 g per kg of polished rice flour; 2. about 30% of this quantity can be currently recovered by inversion transition cycling; 3. HELP-R behaves according to the expectations, namely it precipitates at 42°C in the presence of NaCl concentrations equal or above 0.5 M and re-dissolves in Tris-HCl buffer at low temperatures; 4. rice storage proteins can be eliminated successfully by inversion transition cycling whereas losses of HELP-R throughout the process are contained; 5. HELP-R cannot be effectively visualized in SDS-PAGE with Coomassie blue staining differently from a His-tagged protein of similar composition produced in *Escherichia coli* (HELP-E); 6. both HELP-R and HELP-E are sensitive to freeze-and-thawing and maybe prone to a self-disassembly into oligomers at specific sites where lysine residues are present.

Despite further studies at biochemical and functional levels are necessary, data collected so far on HELP-R are very promising and the molecular farming approach for the industrial production of elastin-like polymers appears quite feasible.

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>8</b>
1.1 ELASTINA E FIBRE ELASTICHE .....	8
1.1.1 MORFOLOGIA DELLE FIBRE ELASTICHE.....	9
1.2 LA TROPOELASTINA.....	9
1.2.1 SECREZIONE E MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI.....	12
1.3 BIOSINTESI DELLE FIBRE ELASTICHE.....	13
1.3.1 DEGRADAZIONE DELL'ELASTINA.....	14
1.4 MALATTIE CHE COLPISCONO LE FIBRE ELASTICHE.....	15
1.5 INTERAZIONI CELLULARI E RUOLO DELL'EBP.....	17
1.6 I BIOMATERIALI.....	18
1.6.1 I BIOMATERIALI COSTITUITI DA POLIPEPTIDI.....	19
1.7 I POLIPEPTIDI ELASTINO-SIMILI (Elastin-Like).....	20
1.8 LA TRANSIZIONE DI FASE INVERSA.....	21
1.9 IL POLIPEPTIDE HELP (Human Elastin-Like Polypeptide).....	22
1.9.1 PROPRIETA' DI HELP.....	23
1.9.2 LE MATRICI HELP RETICOLATE.....	26
1.10 APPLICAZIONI DI HELP.....	27
1.11 IL MOLECULAR FARMING.....	28
1.12 PRODUZIONE DI POLIPEPTIDI ELASTIN-LIKE IN PIANTA.....	29
1.13 PRODUZIONE DI HELP IN ENDOSPERMA DI RISO.....	30
1.14 SCOPO DELLA TESI.....	31
<b>2. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>32</b>
2.1 PROGETTAZIONE DEL POLIPEPTIDE HELP.....	32
2.2 DESIGN DEL GENE SINTETICO HELP-R.....	32
2.3 METODICHE COMUNI DI BIOLOGIA MOLECOLARE.....	35
2.4 SINTESI DEL GENE HELP-R.....	35
2.5 PRODUZIONE DEL VETTORE pCAMBIA1300/PMI/HELP-R.....	36
2.6 TRASFORMAZIONE DI <i>Oryza sativa</i> L.....	39
2.6.1 PREPARAZIONE E SVILUPPO DI CALLI EMBRIOGENICI DA SCUTELLO DI RISO.....	39

2.6.2 CO-COLTURA DEI CALLI CON <i>A. tumefaciens</i> .....	40
2.6.3 SELEZIONE DELLE CELLULE TRASFORMATE.....	40
2.6.4 RIGENERAZIONE DI PIANTINE DI RISO DA CALLI TRASFORMATI....	41
2.7 ANALISI MOLECOLARI SUI TRASFORMATI PRIMARI.....	42
2.7.1 ESTRAZIONE DEL DNA.....	42
2.7.2 AMPLIFICAZIONE CON PRIMER UNIVERSALI.....	42
2.7.3 VERIFICA DELLA TRASFORMAZIONE DELLE PIANTE DI RISO.....	43
2.8 METODICHE COMUNI DI ANALISI PROTEICA.....	43
2.9 ANALISI WESTERN BLOT.....	44
2.10 SELEZIONE DEI TRASFORMATI PRIMARI (GENERAZIONE T1).....	44
2.11 MESSA A PUNTO DEL SAGGIO DAS-ELISA.....	45
2.11.1 SAGGIO DAS-ELISA .....	46
2.11.2 VALIDAZIONE DEL SAGGIO ELISA.....	47
2.12 SCELTA DEL TAMPONE DI ESTRAZIONE.....	48
2.13 ANDAMENTO DELL' ESTRAZIONE NEL TEMPO.....	48
2.14 EFFICIENZA DEL PROCESSO DI ESTRAZIONE.....	49
2.15 SELEZIONE INTERNA ALLA GENERAZIONE T2.....	50
2.15.1 STIMA DELLA RESA DI HELP-R.....	50
2.16 TRANSIZIONE DI FASE INVERSA DI HELP-R.....	51
2.17 CARATTERIZZAZIONE DI HELP-R.....	52
2.17.1 TEMPERATURA.....	52
2.17.2 FORZA IONICA.....	53
2.17.3 pH.....	53
2.17.4 TEMPO DI PRECIPITAZIONE.....	54
2.18 ANALISI STATISTICA DEI DATI.....	54
2.19 IMMUNOLOCALIZZAZIONE DI HELP-R IN ENDOSPERMA DI RISO.....	54
2.19.1 PREPARAZIONE DELLE SEZIONI.....	54
2.19.2 IBRIDAZIONE E OSSERVAZIONE DEI CAMPIONI AL TEM.....	55
<b>3. RISULTATI.....</b>	<b>56</b>
3.1 DESING DEL GENE SINTETICO HELP-R.....	56
3.2 PRODUZIONE DEL VETTORE pCAMBIA1300/PMI/HELP-R.....	59
3.3 TRASFORMAZIONE DI <i>Oryza sativa</i> .....	62
3.4 ANALISI MOLECOLARI SUI TRASFORMATI PRIMARI.....	64

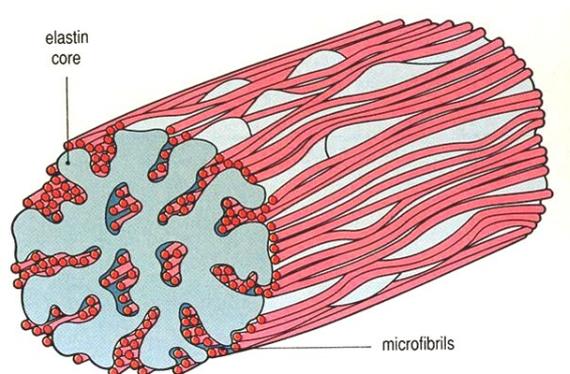
3.4.1 AMPLIFICAZIONE CON PRIMER UNIVERSALI.....	65
3.4.2 VERIFICA DELLA TRASFORMAZIONE DELLE PIANTE DI RISO.....	65
3.5 SELEZIONE DEI TRASFORMATI PRIMARI.....	66
3.6 MESSA A PUNTO DEL SAGGIO DAS-ELISA.....	66
3.6.1 VALIDAZIONE DEL SAGGIO ELISA.....	69
3.7 SELEZIONE DEI TRASFORMATI PRIMARI MEDIANTE ELISA.....	70
3.8 SCELTA DEL TAMPONE DI ESTRAZIONE.....	71
3.9 ANDAMENTO DELL' ESTRAZIONE NEL TEMPO .....	72
3.10 SELEZIONE DELLA PROGENIE T2.....	74
3.11 EFFICIENZA DEL PROCESSO DI ESTRAZIONE.....	76
3.12 STIMA DELLA RESA DI HELP-R.....	77
3.13 TRANSIZIONE DI FASE INVERSA DI HELP-R.....	78
3.14 CARATTERIZZAZIONE DI HELP-R.....	81
3.14.1 TEMPERATURA.....	82
3.14.2 FORZA IONICA.....	84
3.14.3 pH.....	88
3.14.4 TEMPO DI PRECIPITAZIONE.....	91
3.15 IMMUNOLOCALIZZAZIONE DI HELP-R IN ENDOSPERMA DI RISO.....	91
<b>4. DISCUSSIONE.....</b>	<b>93</b>
4.1 SELEZIONE DEI TRASFORMATI PRIMARI E PROBLEMATICHE CONNESSE CON I SAGGI IMMUNOLOGICI.....	94
4.2 STIMA DELLA RESA DI HELP-R.....	98
4.3 TRANSIZIONE DI FASE INVERSA DI HELP-R.....	99
4.4 CARATTERIZZAZIONE DI HELP-R.....	100
4.5 IMMUNOLOCALIZZAZIONE DI HELP-R IN ENDOSPERMA DI RISO.....	101
4.6 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE.....	101
<b>5. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>102</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 ELASTINA E FIBRE ELASTICHE

Molti tessuti animali, come pelle, vasi sanguigni, cartilagini dei legamenti, polmoni, vescica, per espletare al meglio le proprie funzioni, richiedono resistenza ed elasticità. Queste proprietà sono garantite da una fitta rete di fibre elastiche, presenti nella matrice extracellulare, che consentono il rilassamento di tali tessuti dopo una loro deformazione dovuta a stiramenti o contrazioni (Alberts et Al., 2002). Le fibre elastiche sono costituite principalmente da due elementi: elastina amorfa, che costituisce il *core* centrale, e da una guaina di microfibrille (Fig. 1.1), quest'ultime di diametro attorno ai 10nm e composte principalmente da glicoproteine (Rosenbloom et Al., 1993).

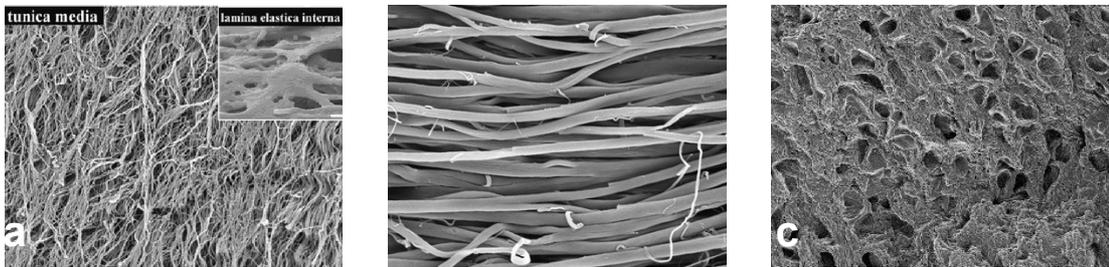
L'elastina è una proteina fibrosa presente nella matrice extracellulare della maggior parte degli organismi vertebrati, altamente idrofobica, ricca di prolina e glicina; diversamente dal collagene, non è glicosilata e contiene idrossiprolina anziché idrossilisina (Alberts et Al., 2002). Rappresenta oltre il 50% della componente extracellulare delle grandi arterie (aorta), il 30% dei polmoni e il 2-3% della pelle (Ayad et Al., 1994; Chrzanowski et Al., 1980; Rosenbloom et Al., 1993). La principale caratteristica di questa proteina, da cui il nome, è quella di conferire elasticità agli organi e tessuti in cui essa è presente.



**Fig. 1.1** Schema di una fibra elastica costituita da un core centrale di elastina amorfa e da una guaina di microfibrille.

### 1.1.1 MORFOLOGIA DELLE FIBRE ELASTICHE

Le fibre elastiche possiedono morfologie diverse, a seconda del tipo di tessuto in cui sono presenti (Daamen et Al., 2007). Nel caso delle grandi arterie (aorta e arterie polmonari), in cui è necessaria una certa elasticità per smorzare la pressione sanguigna, le fibre elastiche compongono la lamina elastica interna, costituita dalla fusione di fibre elastiche disposte longitudinalmente a formare lamelle (Fig. 1.2 a). Nei legamenti, le fibre elastiche sono generalmente organizzate come grossi fasci orientati in senso parallelo (Fig. 1.2 b), mentre nelle cartilagini elastiche, presenti a livello di padiglione auricolare e di epiglottide, le fibre elastiche sono organizzate in strutture a forma di favo (Fig. 1.2 c).



**Fig. 1.2** Immagini al TEM di **a)** tunica media delle grandi arterie; **b)** legamenti; **c)** cartilagini elastiche.

## 1.2 LA TROPOELASTINA

Il precursore dell'elastina è la tropoelastina, una proteina solubile con massa pari a 72 kDa, secreta nella matrice extracellulare dalle cellule tissutali in particolari momenti dello sviluppo (Daamen et Al., 2007).

L'espressione inizia durante la gestazione, raggiunge il picco durante lo sviluppo neonatale e, in condizioni normali, viene completamente repressa entro il decimo anno di vita (Davidson e Giro, 1986; Degterev e Foster, 1999).

Una delle principali caratteristiche della tropoelastina è la presenza di domini idrofobici alternati a domini idrofilici (Fig. 1.3).

```

MAGLTAAAPR  PGVLLLLLSI  LHPSRPGGVP  GAIPGGVPGG  VFYPGAGLGA  LGGGALPGGG
KPLKVPVPGGL  AGAGLGAGLG  AFPVAVTFPGA  LVPGGVADAA  AAYKAAKAGA  GLGGVPGVGG
LGVSAGAVVP  QPGAGVKPGK  VPGVGLPGVY  PGGVLPGARF  PGVGVLPGVV  TGAGVKPKAP
GVGGAFAGIP  GVGPFGGPQP  GVPLGYPIKA  PKLPGGYGLP  YTTGKLPYGY  GPGGVAGAAG
KAGYPTGTGV  GPQAAAAAAAA  KAAAKFGAGA  AGVLPVGGGA  GVPGVPGAIP  GIGGIAGVGT
PAAAAAAAAA  AKAAKYGAAA  GLVPGGPGFG  PGVVGVPGAG  VPGVGVPGAG  IPVVPGAGIP
GAAVPGVVSP  EAAAKAAAKA  AKYGARPGVG  VGGIPTYGVG  AGGFPGFVGV  VGGIPGVAGV
PSVGGVPGVG  GVPGVGISPE  AQAAAAAKAA  KYGVGTPAAA  AAKAAAKAAQ  FGLVPGVG
VAPGVG  VAPGVG  VAPGVG  LAPGVG  VAPGVG  VAPGVG  VAPGIG  PGGVAAAAKS
AAKVAAKAQL  RAAAGLGAGI  PGLGVGVGVP  GLGVGAGVPG  LGVGAGVPGF  GAGADEGVRR
SLSPELREGD  PSSSQHLPST  PSSPRVPGAL  AAKAAKYGA  AVPGVLGGLG  ALGGVGIPGG
VVGAGPAAAA  AAKAAAKAA  QFGLVGAAGL  GGLGVGGLGV  PGVGGGGIP  PAAAKAAKY
GAAGLGGVLG  GAGQFPLGGV  AARPGFGLSP  IFPGGACLGK  ACGRKRK
    
```

**Fig. 1.3** *Struttura primaria della tropolastina umana (NCBI, NP\_000492). I vari colori evidenziano: il peptide segnale (grigio); le regioni idrofobiche della proteina (azzurro); il dominio codificato dall'esone 24 (blu scuro)(gli amminoacidi evidenziati in grassetto corrispondono alla regione idrofobica della proteina che si distingue per il suo carattere regolare e ripetitivo); i domini idrofilici di cross-linking (rosso)(in grassetto sono messi in evidenza gli amminoacidi codificati dall'esone 23); il C-terminale (nero).*

I domini idrofobici sono costituiti quasi interamente da amminoacidi non polari quali glicina (G), valina (V), prolina (P) e alanina (A), mentre i domini idrofilici, detti anche di cross-linking, sono costituiti prevalentemente da motivi di alanina con interspersi residui di fenilalanina (Q) e/o lisina (K). Quest'ultimi rappresentano il sito bersaglio dell'enzima lisilossidasi responsabile della reticolazione della tropoelastina durante l'elastogenesi (Daamen et Al., 2007). Nella figura 1.3 si può notare un dominio evidenziato in blu (codificato dall'esone 24) che si trova più o meno al centro della sequenza della proteina ed è costituito da un motivo amminoacidico esapeptidico -VAPGVG- ripetuto in successione sette volte con piccole variazioni in corrispondenza della quarta (V → L) e settima ripetizione (V → I). La particolarità che contraddistingue questa zona è la regolarità con cui il motivo esapeptidico si ripete nella sequenza.

Nella molecola, oltre ai domini idrofobici e ai domini idrofilici, è presente una zona C-terminale basica (Fig. 1.3), codificata dall'esone 36 (Fig. 1.4). La regione carbossiterminale contiene sequenze amminoacidiche uniche della proteina; sono presenti, infatti, gli unici due residui di cisteina di tutta la molecola e una coda

formata da residui di lisina e arginina che generano un loop tetrapeptidico carico positivamente (Brown et Al., 1992). Questo sito permette il legame covalente tra la tropoelastina e le microfibrille MAGP-1 a seguito di intervento dell'enzima transglutaminasi (Brown et Al., 1994).

L'esone 36 è fortemente conservato tra le diverse specie e non è in alcun caso soggetto a fenomeni di splicing proteico, suggerendo un ruolo fondamentale di questa regione per la tropoelastina durante il processo di elastogenesi (Brown et Al., 1996; Hinek et Al. 1993; Hsiao et Al., 1999) e trasporto della molecola neosintetizzata alla superficie cellulare.

Infine, nella tropoelastina umana è presente una regione N-terminale, codificata dall'esone 1, ricca in serina in cui è presente l'unico residuo di istidina di tutta la molecola (Fig. 1.3).

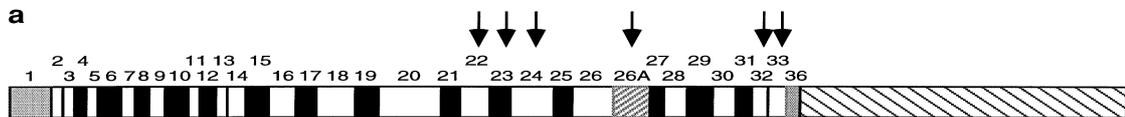
Una caratteristica peculiare della tropoelastina è rappresentata dalla capacità di attuare la cosiddetta transizione di fase inversa, ovvero un processo reversibile che in particolari condizioni di temperatura, pH e forza ionica, permette di ottenere coacervati tra le molecole di tropoelastina (Bandiera et Al., 2010).

La coacervazione della tropoelastina è molto importante durante il processo di elastogenesi, in quanto concentra e allinea le molecole di tropoelastina in vista della successiva reticolazione (Daamen et Al., 2007). Questo processo avviene a seguito di legami non covalenti a carico dei domini idrofobici presenti nella molecola.

La sequenza della tropoelastina è altamente conservata all'interno dei mammiferi, a livello sia nucleotidico, sia amminoacidico.

La tropoelastina umana è codificata da un singolo gene localizzato sul cromosoma 7 (q11.1-21.1) del genoma (Olliver et Al., 1987). Esiste una forte omologia di sequenza (attorno al 70%) tra i geni di diverse specie codificanti tropoelastina. Generalmente, i maggiori allineamenti si rinvengono in corrispondenza delle regioni contenenti l'informazione relativa ai domini di cross-linking (Debelle e Alix, 1998; Hisao et Al., 1999). Va tuttavia rilevato che alcuni tratti di sequenza appaiono essere specie-specifici, nel senso che risultano essere completamente assenti in determinati organismi. Un esempio a tale proposito è fornito dagli esoni 34 e 35 presenti nel gene per l'elastina bovina e assenti invece in quello per l'elastina umana (Fig. 1.4). Quest'ultimo a sua volta, contiene l'esone 26A codificante per un

particolare dominio idrofobico non descritto in altre specie ed espresso solamente in particolari stati patologici come ad es. l'ipertensione polmonare (Bisaccia et Al., 1998; Ostini et Al., 2002) .



**Fig. 1.4** *Struttura del cDNA codificante la tropoelastina umana. I riquadri neri raffigurano gli esoni codificanti i domini di cross linking, quelli bianchi gli esoni codificanti domini idrofobici (esone 24: dominio idrofobico centrale che si distingue per il suo carattere regolare e ripetitivo). Si riportano in grigio gli esoni 1 e 36, relativi al peptide segnale e alla regione C-terminale della proteina, rispettivamente. La zona contraddistinta dalle barre oblique identifica la porzione 3'-UTR.*

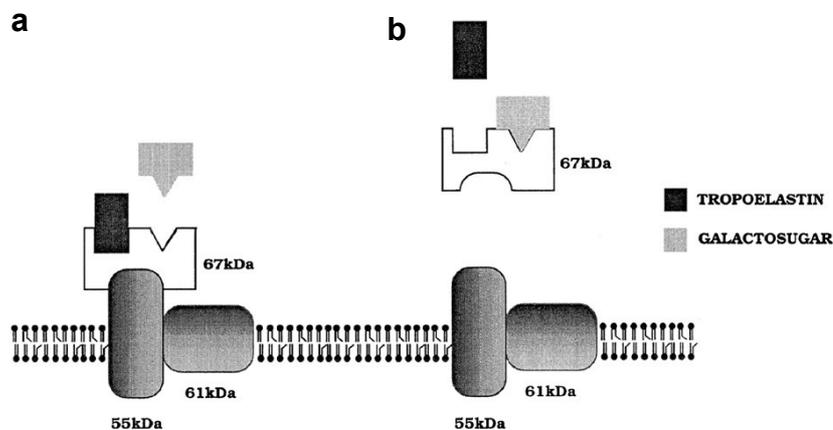
### 1.2.1 SECREZIONE E MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI

I trascritti della tropoelastina vengono tradotti a livello di reticolo endoplasmico rugoso e la catena polipeptidica nascente viene liberata nel lume del reticolo, con rilascio del peptide segnale; successivamente, la proteina matura viene secreta dalla membrana cellulare attraverso vescicole secretorie (Saunders, 1985).

Se si eccettua la rimozione del peptide segnale, la tropoelastina subisce poche modificazioni post-traduzionali e non ci sono evidenze di una sua glicosilazione. L'idrossilazione dei residui di prolina, reazione effettuata dall'enzima prolil-ossidasi, può avvenire a carico di una frazione di residui variabile da 0 a 20% (Uitto et Al., 1991). In ogni caso, sembra che questo processo non sia indispensabile, ma che al contrario un'eccessiva idrossilazione della prolina possa destabilizzare la struttura secondaria della tropoelastina, al punto da inibire la coacervazione e diminuire la capacità di sintesi delle fibre elastiche a temperatura fisiologica (Urry et Al., 1979).

### 1.3 BIOSINTESI DELLE FIBRE ELASTICHE

A livello cellulare, la tropoelastina, dopo la sua sintesi, viene immediatamente riconosciuta e legata da una *elastin-binding protein* (EBP) avente massa di 67 kDa (Hinek et Al., 1994) (Fig. 1.5 a). E' stato dimostrato che EBP lega la tropoelastina umana in corrispondenza del motivo VAPGVG (Mecham et Al., 1989) sebbene siano stati osservati anche altri siti di legame. Va rilevato che EBP funziona da chaperone molecolare proteggendo la tropoelastina neoformata dall'azione di proteasi intracellulari o da coacervazione inappropriata. Assieme ad altre due subunità proteiche legate alla membrana da 55 e 61 kDa, EBP costituisce un recettore di membrana (Mecham et Al., 1989) comprendente un sito per l'aggancio della tropoelastina e un sito per l'attacco di uno zucchero galattoside (ad es. lattosio o un glicosamminoglicano come condroitin solfato o dermatan solfato). Legando il carboidrato, EBP riduce drammaticamente l'affinità per la tropoelastina, la quale viene riversata nella matrice extracellulare, contemporaneamente al distacco dell'EBP dalle due subunità di membrana (Fig 1.5 b).

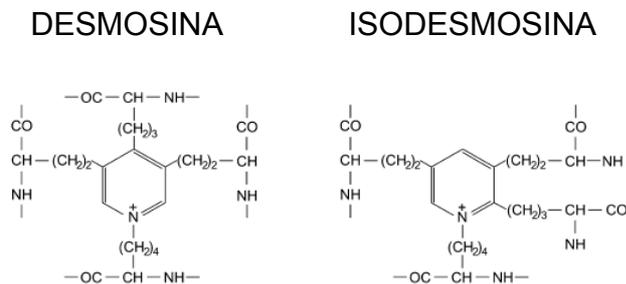


**Fig. 1.5** Schema del processo di rilascio della tropoelastina nello spazio extracellulare: **a)** EBP è legata ai due complessi di membrana di 55 e 61 kDa e lega la tropoelastina nello specifico sito di legame; **b)** all'arrivo del galattoside l'affinità di legame tra tropoelastina ed EBP viene drammaticamente ridotta con il rilascio della tropoelastina nello spazio extracellulare e il distacco di EBP dal complesso di membrana.

La deposizione della tropoelastina nella matrice extracellulare avviene in specifiche regioni della superficie cellulare, dove essa è rapidamente incorporata nelle fibre elastiche senza subire proteolisi (Bressan e Prockop, 1977).

Nella matrice extracellulare le componenti microfibrillari fungono da scheletro per il deposito delle molecole di tropoelastina e sembra che permettano un loro corretto orientamento in vista della successiva reticolazione.

La genesi dell'elastina tissutale avviene grazie a una reazione operata dall'enzima lisil-ossidasi (che necessita di cofattori  $\text{Cu}^{2+}$  e vitamina B6) a carico delle lisine presenti nei domini di cross-linking. Inizialmente avviene una deaminazione ossidativa dei residui di lisina che sono convertiti in allisine (Vrhovski e Weiss, 1998). Queste, combinandosi con residui di lisina non ossidati, danno origine a un legame tetrafunzionale tra due diversi filamenti di tropoelastina, formando un intermedio denominato desmosina o isodesmosina (Fig. 1.6), che sta alla base del reticolo elastinico vero e proprio, insolubile ed estremamente stabile (Daamen et Al., 2007).



**Fig. 1.6** *Desmosina e isodesmosina. Quattro residui di lisina appartenenti a due diversi domini di cross-linking generano il nucleo formativo del reticolo elastinico.*

### 1.3.1 DEGRADAZIONE DELL'ELASTINA

L'elastina è una proteina molto stabile, difficilmente degradabile da enzimi proteolitici, tanto che nei tessuti subisce un lento turnover. L'unico gruppo di enzimi che è in grado di degradare questa molecola è conosciuto con il nome di elastasi (Vrhovski e Weiss, 1998). Questa classe di enzimi comprende diversi sottogruppi

come le elastasi a serina rappresentate da elastasi pancreatiche, elastasi prodotte da neutrofili e catepsina G, ovvero gli enzimi degradativi dell'elastina più abbondantemente presenti nei mammiferi (Stone et Al., 1982).

La degradazione dell'elastina è necessaria durante diversi processi fisiologici come: crescita, guarigione da ferite, gravidanza e durante l'accrescimento dei tessuti (Werb et Al., 1982). Un aumento inappropriato dell'attività elastolitica può condurre a stati patologici che interessano gli organi e i tessuti dove è maggiormente presente la proteina, come pelle, polmoni e arterie. La lenta proteolisi dell'elastina è invece un fenomeno naturale che avviene normalmente nei tessuti durante l'intero arco della vita benché si osservi con maggiore evidenza nei soggetti anziani (Hall, 1976; Braverman e Fonferko, 1982).

I tessuti danneggiati possono essere riparati, ma l'elastina che viene prodotta in età adulta non è della stessa qualità di quella prodotta durante le prime fasi di crescita; le fibre formate risultano infatti altamente disordinate e non pienamente funzionali (Rucker e Dubick, 1994). Durante questa fase, possono anche essere riutilizzati peptidi derivanti dalla degradazione dell'elastina. Infatti, piuttosto che degradare completamente un tessuto danneggiato e resintetizzare una nuova fibra, il meccanismo di riparazione predilige il riutilizzo dei peptidi nella ricostruzione delle fibre danneggiate (Tinker et Al., 1990). L'espressione del gene codificante la tropoelastina aumenta a seguito di eventi traumatici, come ad es. lesioni muscolari, a dimostrazione che la molecola viene effettivamente coinvolta in processi riparatori.

## **1.4 MALATTIE CHE COLPISCONO LE FIBRE ELASTICHE**

Le malattie che colpiscono le fibre elastiche, compromettendone l'integrità, possono essere di natura genetica o insorgere con l'invecchiamento dei tessuti (Vrovski e Weiss, 1998).

Tra le patologie legate a malformazioni genetiche troviamo la stenosi aortica sopravvalvolare (SVAS), la sindrome di Williams, lo pseudoxantoma elastico, la cutix laxa e la sindrome di Marfan; tra le patologie legate all'invecchiamento dei tessuti (dette anche malattie acquisite) si annoverano l'enfisema polmonare e l'arteriosclerosi.

SVAS e sindrome di Williams sono state direttamente collegate ad alterazioni del gene della tropoelastina. In particolare, la SVAS può derivare da tre tipi di mutazioni (Ewart et Al., 1994):

- delezione di 30 kb che coinvolge gli esoni 2 e 27;
- delezione a carico dell'esone 28 (terminale 3' del gene), con la conseguente produzione di una proteina tronca al C-terminale;
- mutazioni puntiformi diverse, molte delle quali comportano un danneggiamento del C-terminale o la formazione di codoni di stop spuri entro la sequenza del gene.

Anche la sindrome di Williams è una malattia provocata da delezioni; in questa patologia, i tratti deleti risultano generalmente molto estesi (fino a 114 kb) e possono includere l'intero gene dell'elastina ma anche geni ad esso adiacenti (Ewart et Al., 1993).

Lo pseudoxantoma elastico è un disordine autosomico ereditario (sia dominante, sia recessivo) del tessuto connettivo caratterizzato dall'accumulo anormale di fibre elastiche morfologicamente anomale nel derma e nei tessuti cardiovascolare e oculare. L'eziologia è legata a mutazioni del cromosoma 16 (p13.1) (Germani 2001).

Cutis laxa è una malattia genetica rara in cui si ha la formazione di fibre elastiche difettose, frammentate e in numero inferiore. Quello che ne risulta è una perdita di elasticità della pelle e una lassità dei legamenti. Una forma autosomica recessiva di cutis laxa è associata a gravi complicanze cardiorespiratorie e morte precoce.

La sindrome di Marfan è una patologia autosomica dominante (Uitto e Ryhänen, 1987) a carico del tessuto connettivo causata da mutazioni nel gene della fibrillina. Le manifestazioni della sindrome interessano molte parti del corpo, specialmente il sistema scheletrico, gli occhi, il cuore e i vasi sanguigni, i polmoni e le membrane fibrose che ricoprono il cervello e la colonna vertebrale.

Per la maggior parte di queste patologie non esistono terapie specifiche. Si può intervenire per rallentare il progredire di alcuni sintomi, come nel caso della cardiopatia congenita riguardante la sindrome di Williams. L'unica eccezione è rappresentata da cutis laxa in cui si può ricorrere alla chirurgia estetica.

Malattie acquisite che comportano una degradazione delle fibre elastiche sono rappresentate da enfisema, in cui si ha una degradazione delle fibre elastiche a livello polmonare, e da arteriosclerosi, dove si osserva una perdita di elasticità dei

maggiori vasi sanguigni, accompagnato da deposizioni di calcio e lipidi. La degradazione dell'elastina è operata da metalloproteinasi ed elastasi.

Alcune di queste malattie, come cutix laxa, sono state collegate a disordini nel metabolismo del rame e quindi al malfunzionamento dell'enzima lisil-ossidasi, oppure a malformazioni delle proteine microfibrillari, come nel caso della sindrome di Marfan. Ciò indica che alterazioni delle molecole coinvolte nella sintesi delle fibre elastiche si riflettono in un danneggiamento delle fibre stesse e in una generale disfunzionalità del tessuto od organo colpito.

## **1.5 INTERAZIONI CELLULARI E RUOLO DELL'EBP**

L'elastina può interagire con le cellule sia sottoforma di tropoelastina, sia attraverso i suoi frammenti generatisi dalla degradazione delle fibre elastiche a opera di proteasi in condizioni patologiche (Fulop et Al., 1998). I prodotti derivanti dalla degradazione delle fibre elastiche sono in grado di attivare cellule fagocitarie, ad es. monociti, e vengono denominati matrikine per la loro capacità di indurre risposte cellulari (Rodgers et Al., 2004).

La tropoelastina come tale influenza molte importanti funzioni, regolando la chemiotassi cellulare, la stimolazione della vasodilatazione, la mobilitazione del calcio, l'adesione e la proliferazione cellulare. Poiché la tropoelastina interagisce con le cellule soltanto durante l'elastogenesi, è molto probabile che i suoi effetti vengano esercitati mediante un controllo a feedback sul processo di elastogenesi stesso.

L'EBP gioca un ruolo importante nel modulare le risposte cellulari sia nel caso della tropoelastina, sia nel caso di frammenti derivanti dalla degradazione dell'elastina (Rodgers et Al., 2004). Specifiche sequenze amminoacidiche entro peptidi derivanti dalla degradazione dell'elastina influenzano l'attività cellulare sfruttando il meccanismo mediato dal recettore di membrana dell'elastina. Nel caso dell'elastina umana, l'esapeptide VGVAPG, che rappresenta il sito di riconoscimento e di attacco per EBP, mostra un potente effetto regolatorio sull'attività cellulare (Kamoun et Al., 1995; Senior et Al., 1984), aumentando la proliferazione e chemiotassi di monociti e fibroblasti, come pure l'aumento dei livelli intracellulari del calcio (Hauck et Al., 1995;

Sarfati et Al., 1996). Altri peptidi derivati dalla degradazione dell'elastina, contenenti residui di valina, prolina e glicina, possono indurre risposte cellulari, anche se il loro effetto non è così efficace come quello del motivo esapeptidico VGVAPG (Hauck et Al., 1995).

Legando questi peptidi, il recettore provoca una moltitudine di segnali intracellulari, come ad esempio l'attivazione della proteina G e l'apertura dei canali del calcio attivando alcune proteino-chinasi (come FAK, PDGF-chinasi, tirosina-chinasi) e le relative cascate fosforilative.

## 1.6 I BIOMATERIALI

I biomateriali sono composti sintetici o naturali, solidi o liquidi, comunemente utilizzati per la produzione di dispositivi biomedici come protesi, giunti ossei, valvole cardiache artificiali, ecc. e in ingegneria tissutale per la rigenerazione di tessuti umani. Caratteristica fondamentale dei biomateriali è la biocompatibilità, ovvero la capacità del materiale di interagire con un sistema biologico, sia esso un tessuto umano o una coltura cellulare, senza dare fenomeni di rigetto (Williams, 1989).

I biomateriali utilizzati in ingegneria tissutale, grazie alla loro natura porosa, forniscono un supporto meccanico alle cellule tissutali, permettendo un loro sviluppo tridimensionale. Ciò permette una migliore comunicazione tra le cellule e una loro espansione e organizzazione utile alla rigenerazione in vitro e in vivo di nuovi tessuti (Furth et Al., 2007).

I biomateriali degradabili più utilizzati fino ad oggi in ingegneria tissutale comprendono una classe di poliesteri, come il poly (L-lactic acid) (PLLA) o il poly (L-glycolic acid) (PLGA) e/o polimeri naturali come alginato, chitosano, collagene e fibrina (Langer and Tirrell, 2004). Sia i poliesteri che i polimeri naturali possono essere utilizzati come tali o coniugati a molecole bioattive come materiali ceramici (ad es. idrossiapatite) per migliorarne le proprietà (Beccaccini e Blaker, 2005).

Lo *scaffold* fornito per la crescita e lo sviluppo delle cellule deve essere un surrogato della matrice extracellulare o di un suo elemento (Rosso et Al., 2005). In passato, componenti della matrice extracellulare (come fibre collagene o fibre elastiche),

utilizzate come biomateriali in ingegneria tissutale, sono state ricavate dall'estrazione diretta da tessuti animali. Le matrici ottenute per estrazione diretta presentano due inconvenienti principali quali la presenza incontrollata di contaminanti (es. ormoni) e/o la diversità intrinseca tra tessuti animali tratti da individui della medesima specie o specie diverse (Furth et Al., 2007). Il design di polipeptidi sintetici e l'ingegneria genetica hanno permesso di ovviare a questi inconvenienti e hanno permesso di creare biomateriali "intelligenti" in grado di auto-assemblarsi fornendo matrici biomimetiche come *scaffold* per la crescita e lo sviluppo, in vitro e in vivo, delle linee cellulari inseminate (Anderson et Al., 2004).

### **1.6.1 I BIOMATERIALI COSTITUITI DA POLIPEPTIDI**

I biomateriali costituiti da polipeptidi possono essere prodotti sia per sintesi chimica, sia per via ricombinante sfruttando l'espressione eterologa in un determinato ospite. La sintesi chimica si avvale delle tecniche di polimerizzazione che utilizzano gli amminoacidi, o loro derivati monomerici, come nel caso della polimerizzazione mediante l'N-carbossianidride (NCA) (Deming, 2006). I metodi di sintesi chimica sono di difficile controllo sia per quanto riguarda la lunghezza delle catene polipeptidiche, sia riguardo la loro stereochimica. Questo metodo di sintesi solitamente viene utilizzato quando si desidera creare ibridi che combinino motivi peptidici con polimeri sintetici (Chow et Al., 2008).

La produzione di biopolimeri ottenuti per via ricombinante fornisce una valida alternativa alla sintesi chimica, garantendo un'elevata specificità di sequenza, nonché una corretta stereochimica. Non tutti i polipeptidi possono comunque essere prodotti per via ricombinante o essere legati a composti non peptidici se non attraverso processamento chimico a valle (Chow et Al., 2008).

I biomateriali costituiti da polipeptidi trovano il loro impiego nella produzione di materiali soffici e idratati. L'idratazione è fondamentale nel mantenere la struttura e l'integrità funzionale, rappresentando tuttavia un limite nell'utilizzo di questi polimeri. Essi, infatti, non sono idonei a impieghi che non tollerino l'acqua. Al contrario possono essere proficuamente sfruttati in applicazioni che necessitano l'utilizzo di ambienti acquosi, come la produzione di matrici idrogel.

## 1.7 I POLIPEPTIDI ELASTINO-SIMILI (*Elastin-Like*)

I polipeptidi elastino-simili (ELP: elastin-like polypeptides) sono macromolecole che si basano sulla ripetizione del motivo pentapeptidico VPGVG, che ricalca il dominio idrofobico più regolarmente ripetuto della tropoelastina bovina (Floss et Al., 2009). Più in particolare la sequenza ripetuta è  $(VPGXG)_n$ , dove X può essere qualsiasi amminoacido tranne la prolina e dove n indica il numero di ripetizioni (Chow et Al., 2008).

Dai primi studi effettuati su ELP ottenuti per sintesi chimica (Urry et Al., 1974), è stato evidenziato che essi conservano la proprietà della tropoelastina nativa di attuare in opportune condizioni una transizione di fase inversa. Questo processo è correlato alla presenza di domini idrofobici nella proteina: i peptidi costituiti solamente da domini idrofobici, quali le ripetizioni pentapeptidiche VPGVG, sono in grado di passare da una fase perfettamente solubile a una fase solida, formando per interazioni idrofobiche e in funzione della temperatura (Cox et Al., 1974) prodotti di coacervazione.

Gli ELP, essendo peptidi, possono essere codificati da una sequenza nucleotidica. Sfruttando la capacità di sintetizzare geni artificiali e di trasformare un'ampia gamma di specie, è da alcuni anni possibile la produzione eterologa di polipeptidi caratterizzati da dimensioni notevolmente maggiori rispetto a quelli ottenibili attraverso sintesi chimica. In questo modo vengono prodotte vere e proprie proteine che per loro struttura regolare e ripetitiva hanno un carattere polimerico e quindi possono essere definite biopolimeri anche in senso stretto.

I biopolimeri elastin-like, in virtù della loro capacità di rispondere a stimoli termici possono essere impiegati in molte applicazioni biotecnologiche (ad es. come proteine di fusione per la purificazione di altre proteine) e biomediche come il veicolamento di farmaci, la produzione di biomateriali, ecc. (Chilkoti et Al., 2002; Lim et Al., 2007).

Esistono diverse varianti di ELP in cui il motivo pentapeptidico è rappresentato dalla sequenza KGGVG, oppure LGGVG; sono state prodotte varianti anche sulla base del numero di amminoacidi che costituiscono il dominio idrofobico, con motivi esapeptidici, eptapeptidici e nonapeptidici (Chow et Al., 2008). Una sottoclasse della famiglia ELP è rappresentata dai polipeptidi HELP (*Human Elastin-Like*

*Polypeptides*) costituiti da domini esapeptidici con composizione mutuata dalla tropoelastina umana (Fig. 1.4, Fig. 1.7).

## 1.8 LA TRANSIZIONE DI FASE INVERSA

Una caratteristica che contraddistingue i polipeptidi ELP è la capacità di subire modificazioni di stato in funzione della temperatura (Urry, 1997). All'aumentare della temperatura, queste molecole subiscono una transizione di fase, passando da uno stato di soluzione a uno di aggregazione. In particolare, al di sotto di una certa soglia di temperatura, definita temperatura di transizione ( $T_t$ ), queste proteine sono presenti nel mezzo in soluzione, mentre al di sopra di questa soglia, si separano dal mezzo formando aggregati. L'aumento della temperatura favorisce le interazioni idrofobiche intra- e intermolecolari tra domini idrofobici, fenomeno noto come coacervazione.

La transizione di fase è reversibile, infatti, abbassando la temperatura al di sotto della  $T_t$ , i biopolimeri coacervati possono ritornare allo stato solubile di partenza (Riberlo et Al., 2006). Solitamente il passaggio da una fase all'altra è molto repentino e tipicamente avviene in un *range* di appena 2°C (Chilkoti et Al., 2002).

Le tecniche di diffusione dinamica della luce (*Dinamic Light Scattering*, DLS) e di microscopia elettronica a trasmissione (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) hanno permesso di identificare una natura micellare degli aggregati, i quali presentano una parte interna idrofobica e una esterna idrofilica (MacEwan et Al., 2009).

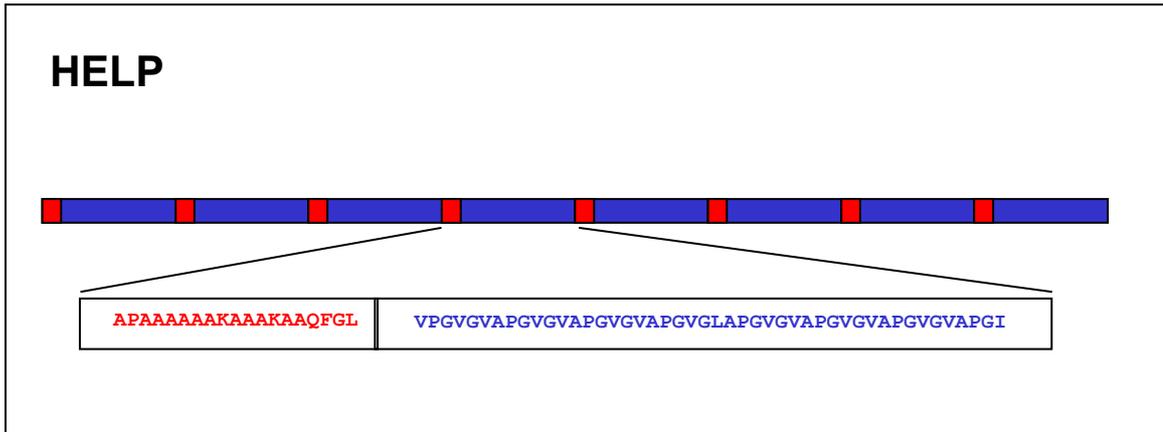
La  $T_t$  varia in funzione della natura e della struttura del biopolimero sintetico. I fattori che la influenzano e da cui essa dipende sono: la lunghezza del polipeptide, il suo peso molecolare, la natura dell'amminoacido ospite (l'amminoacido X presente nel motivo pentapeptidico VPVXG), la concentrazione nel mezzo solvente, come pure la presenza o meno di co-soluti (sali, proteine plasmatiche, ecc.) eventualmente presenti nel mezzo acquoso (Yeo et Al., 2010; Chilkoti et Al., 2002). In generale, più la sequenza del polipeptide è corta, più alta è la  $T_t$  e viceversa. A parità di peso molecolare, più alta è l'idrofobicità dell'amminoacido X presente nel motivo pentapeptidico VPVXG, più bassa è la  $T_t$ . Come detto, infatti, l'amminoacido

in quarta posizione indicato con X, può essere qualsiasi residuo tranne prolina. La natura di questo amminoacido non influenza la capacità transiente della macromolecola (Yamaoka et Al., 2003), ma influisce soltanto sulla sua Tt (Meyer e Chilkoti, 2004). Anche la concentrazione di ELP nel mezzo solvente influenza la Tt, infatti, all'aumentare della concentrazione si ha un abbassamento della Tt secondo una funzione logaritmica (Mackay e Chilkoti, 2008).

I polipeptidi ELP possono essere utilizzati anche come complessi di fusione. Alcuni studi hanno dimostrato che in generale essi non perdono le loro proprietà, nonostante la fusione con altre proteine o l'inserimento di *linker* peptidici fra le sequenze ripetute o la formazione di co-polimeri. La transizione di fase può così essere sfruttata per purificare proteine legate ai biopolimeri ELP, ma anche per veicolare altri composti legati a ELP come ad es. sostanze attive (Chilkoti et Al., 2002; Furgeson et Al., 2006).

## **1.9 IL POLIPEPTIDE HELP (Human Elastin-Like Polypeptide)**

Il polipeptide HELP può essere considerato un vero e proprio composto biomimetico dell'elastina umana poiché mantiene un'analogia strutturale che consiste nell'alternanza regolare di regioni di cross-linking e di domini idrofobici (Fig. 1.7) che ricalcano una precisa zona della tropoelastina umana. Nel gene nativo, il dominio di cross-linking è codificato dall'esone 23, mentre il dominio idrofobico, che presenta il motivo esapeptidico VAPGVG regolarmente ripetuto, è codificato dall'esone 24 (Fig. 1.3, Fig. 1.4).



**Fig. 1.7** *Rappresentazione schematica del polipeptide HELP. In rosso sono raffigurati i domini di cross-linking, mentre in blu sono rappresentati i domini idrofobici. Nell'ingrandimento è indicata la composizione amminoacidica di un monomero.*

Come si può vedere dalla Figura 1.7, il biopolimero è costituito da otto unità monomeriche perfette: i domini di cross-linking sono costituiti da ripetizioni di residui di alanina alternati a residui di lisina, mentre i domini idrofobici presentano inizialmente un motivo pentapeptidico VPGVG seguito da sette motivi esapeptidici VAPGVG, che presentano piccole variazioni in corrispondenza della quarta (V → L) e settima ripetizione (V → I), come nella sequenza nativa (§ 1.2). Dalla composizione amminoacidica, è possibile prevedere che HELP abbia un peso molecolare uguale a 43.163 kDa.

### 1.9.1 PROPRIETA' DI HELP

Come visto in precedenza, la struttura primaria del polipeptide HELP presenta un'alternanza di domini idrofobici e di cross-linking. Un'analisi informatica mediante programmi di previsione strutturale, permette di predire la struttura secondaria della proteina in base alla composizione amminoacidica. Visti i domini presenti nell'ottamero HELP, in accordo con gli studi effettuati sulla struttura della tropoelastina (Bandiera et Al., 2010), è possibile prevedere che per circa il 26% della sua estensione HELP abbia una struttura ad  $\alpha$ -elica, corrispondente ai domini di

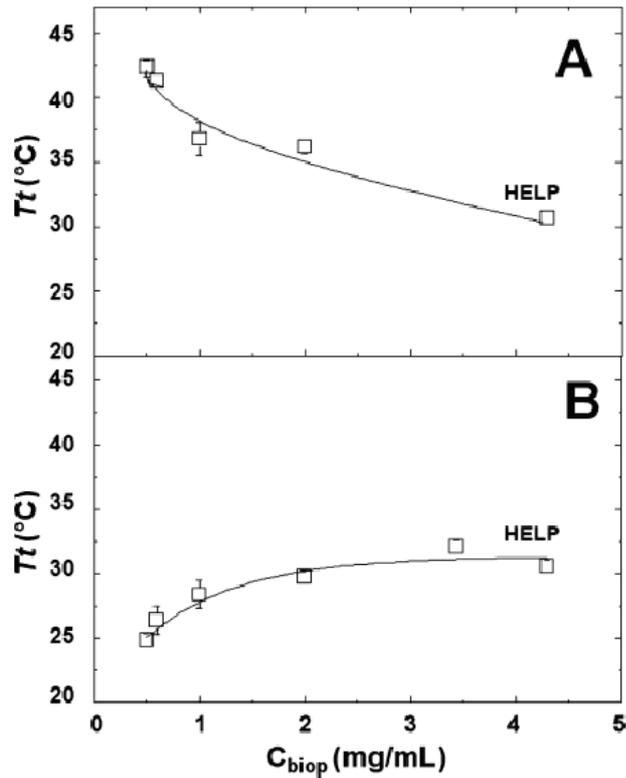
cross-linking, mentre per circa il 70% abbia prevalentemente una struttura disordinata (*random coil*), con inserimenti di strutture a  $\beta$ -foglietto, corrispondenti ai domini idrofobici.

Utilizzando la tecnica del dicroismo circolare (*Circular Dichroism*, CD), che sfrutta la diversa deviazione della luce polarizzata da parte delle molecole chirali, è possibile effettuare ulteriori studi sulla struttura secondaria della molecola. In particolare, utilizzando CD su campioni di HELP sciolti in acqua e mantenuti a una temperatura inferiore a  $T_t$ , è stato possibile confermare (Bandiera et Al., 2010) la presenza di una regione ad  $\alpha$ -elica e di una regione *random coil* con il contributo di strutture a  $\beta$ -foglietto.

Conoscendo la composizione amminoacidica è possibile calcolare anche il punto isoelettrico che, nel caso di HELP, risulta essere pari a 11.18.

Un'altra previsione possibile riguarda l'indice di idropacità del polimero (proposto per la prima volta da Kyte e Doolittle nel 1982). Questo indice è rappresentato da un valore numerico che definisce l'idrofobicità e l'idrofilicità delle proteine. A ogni amminoacido viene assegnato un valore numerico che corrisponde alla sua caratteristica idrofobica o idrofilica determinata dalla catena laterale. Se il valore assegnato è di segno positivo, nella maggior parte dei casi l'amminoacido è idrofobico, al contrario un valore di segno negativo corrisponde a un amminoacido idrofilico (Biro, 2006). È stato notato che per i polimeri ELP l'indice di idropacità è correlato con la transizione di fase (Urry et Al., 1991).

Infine, lo studio delle proprietà chimico-fisiche di HELP ha permesso di mettere in evidenza che la  $T_t$  varia in funzione della concentrazione del biopolimero e del sale (NaCl) presenti in soluzione (Bandiera et Al., 2010) (Fig. 1.8).



**Fig. 1.8** Andamento della  $T_t$  di HELP in funzione dell'aumento di concentrazione del polimero in soluzione in presenza di NaCl in condizioni fisiologiche (A) e in assenza di NaCl (B). Grafico da Bandiera 2010 (modificato).

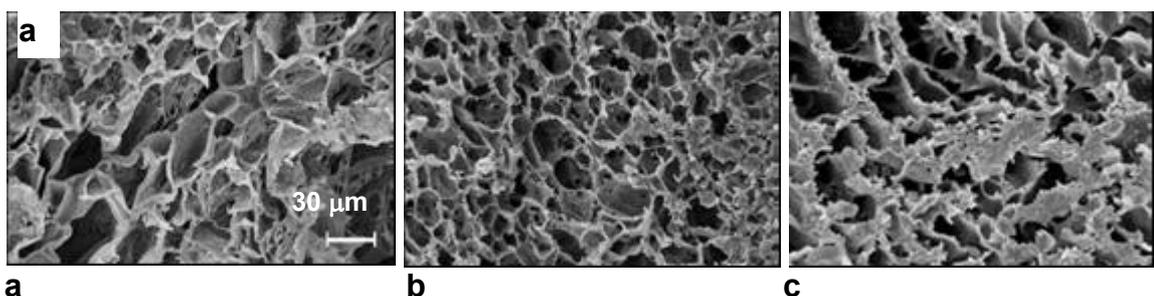
Come illustrato in Figura 1.8, in presenza di una concentrazione fisiologica di NaCl (0.15 M) (A) la temperatura di transizione diminuisce all'aumentare della concentrazione di HELP (espressa in mg/mL), in accordo con quanto descritto per tutti i biopolimeri ELP. Al contrario, in assenza di sale (B), il comportamento di HELP varia notevolmente, con un aumento della  $T_t$  correlato all'aumento della concentrazione del polimero stesso. Questo comportamento, in contrasto con quanto descritto per i polipeptidi elastin-like, può essere imputabile alla presenza dei domini di cross-linking. Essi, infatti, tendono ad allinearsi tra di loro, ma le lisine cariche positivamente presenti al loro interno generano una repulsione tra le catene che ostacola l'aggregazione intermolecolare. E' possibile che la presenza di NaCl mascheri le cariche positive abbattendo le forze repulsive e ripristinando la potenzialità transiente del biopolimero (Bandiera et Al., 2010).

A concentrazioni saline superiori rispetto a quelle fisiologiche, a parità di concentrazione di HELP, la Tt diminuisce, in accordo con quanto descritto per i polipeptidi elastin-like (Reguera et Al., 2007). Questo dato sembra confermare che la concentrazione fisiologica di sale è un parametro critico affinché la presenza dei domini di cross-linking influisca sulle proprietà di transizione di fase.

### 1.9.2 LE MATRICI HELP RETICOLATE

Sfruttando la presenza dei domini di cross-linking è possibile reticolare il biopolimero, con la formazione di una matrice tridimensionale di tipo idrogel. A differenza della transizione di fase, che è un processo reversibile, la reticolazione rende il polimero insolubile poiché si ha la formazione di legami covalenti stabili inscindibili se non con metodi chimici drastici.

Gli aminoacidi coinvolti nella formazione di questi legami intermolecolari sono le lisine e le glutammine presenti nei domini di cross-linking. La reticolazione delle matrici HELP è generalmente attuata a mezzo di una transglutaminasi batterica, che catalizza il legame tra il gruppo carbossiamide della glutammina e il gruppo amminico della lisina. Nella reazione entrano in gioco anche la forza ionica, la temperatura e il pH del mezzo. Quello che si ottiene dalla reticolazione è una matrice porosa, molto elastica (Fig. 1.9).



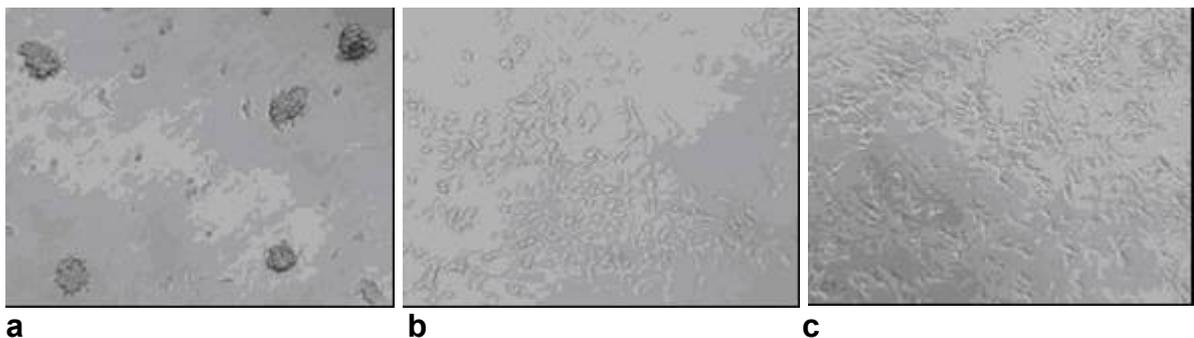
**Fig. 1.9** Alcuni esempi di matrici HELP reticolate: **a)** matrice reticolata a temperatura ambiente in tampone PBS, 0 mM NaCl, pH 6; **b)** matrice reticolata a temperatura ambiente in tampone PBS, 0 mM NaCl, pH 8; **c)** matrice reticolata a temperatura ambiente in tampone Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8. Per la reticolazione è stata utilizzata la transglutaminasi di *Streptomyces mobaraensis* (N-Zyme Biotec GmbH). (Foto Bandiera 2011).

## 1.10 APPLICAZIONI DI HELP

Data l'origine biotica, la stabilità e la biodegradabilità di questo tipo di materiale, le possibili applicazioni sono legate principalmente all'utilizzo di HELP come supporto per l'adesione, la crescita e la proliferazione di linee cellulari. Le matrici HELP possono garantire una maggiore biocompatibilità per le cellule che vengono seminate su di esse, fornendo un supporto (*scaffold*) che mima l'ambiente fisiologico; ciò potrebbe tradursi in una crescita tridimensionale delle cellule adese, a differenza dei supporti plastici che, invece, consentono uno sviluppo cellulare solo nelle due dimensioni (Bandiera et Al., 2010, Bandiera, 2010).

Essendo biomimetico, questo tipo di biomateriale può essere impiegato in strategie di medicina rigenerativa per la ricostruzione e rigenerazione tissutale, per la veicolazione di farmaci e cellule come pure per lo studio di modelli di tossicità cellulare.

Studi di bioequivalenza sono stati effettuati seminando linee cellulari SH-SY5Y di neuroblastoma umano su polistirene non condizionato (Fig.1.10 a), polistirene condizionato per l'adesione delle cellule (Fig. 1.10 b) e condizionati con HELP (Fig. 1.10 c) prodotto in *Escherichia coli* (Bandiera et Al., 2010).



**Fig. 1.10** *Coltura di cellule SH-SY5Y su HELP. Immagine a contrasto di fase delle cellule dopo 72h dalla semina in: a) polistirene non condizionato, b) polistirene condizionato per la crescita cellulare, c) polistirene condizionato con HELP (Foto Bandiera et Al., 2010).*

Come si può notare in Figura 1.10, dopo 72 ore dalla semina, nel substrato non condizionato (a) le cellule non aderiscono e si presentano sottoforma di aggregati. Al contrario, le cellule seminate nei pozzetti condizionati con il biopolimero HELP (c), mostrano adesione e proliferazione simile a quanto osservato per le cellule cresciute nel supporto di polistirene trattato per la coltura dei tessuti (b) (Bandiera, 2010).

Alla luce di quanto visto finora, notevole interesse riguarda l'impiego di questo tipo di biopolimero per lo studio del comportamento delle cellule endoteliali legate alla medicina rigenerativa. Come visto in precedenza (§ 1.2) i vasi sanguigni devono essere molto elastici per resistere alla notevole pressione esercitata dal sangue. Un'importante applicazione dei polipeptidi HELP, mimetici dell'elastina, potrebbe riguardare la ricostruzione del tessuto vascolare, in quanto attualmente, il by-pass chirurgico con vasi venosi, spesso sintetici, è la principale forma di trattamento e di cura delle malattie vascolari. Tra gli specifici componenti dei tessuti vascolari le cellule endoteliali costituiscono il sistema biologico di riferimento per la medicina rigenerativa.

## 1.11 IL MOLECULAR FARMING

Il *molecular farming* è la tecnica che permette di sfruttare le piante coltivate in agricoltura per la produzione di proteine eterologhe, come molecole impiegate in campo biomedico (di tipo enzimatico e non) o polipeptidi di interesse industriale.

Le piante rappresentano un sistema economico per la produzione di proteine ricombinanti poiché 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. Inoltre, questo tipo di tecnologia permette una scalabilità industriale, la messa a punto di tecniche di estrazione e purificazione semplici e poco costose e un'elevata qualità delle molecole prodotte. Il sistema di produzione deve permettere tutte le modificazioni post-traduzionali, che garantiscono la stabilità e la funzionalità della molecola eterologa. Queste modificazioni comprendono il taglio del peptide segnale, il corretto ripiegamento, la formazione di ponti disolfuro e, qualora necessario, la glicosilazione della proteina (Gomord et Al., 2004). I sistemi di produzione tradizionale di proteine

eterologhe, come batteri o lieviti, difficilmente rispondono a tutti i requisiti sopra elencati. I batteri, benché rappresentino un sistema veloce per la produzione di molecole ricombinanti, rendono proteine di scarsa qualità e contaminate da endotossine difficilmente eliminabili. Inoltre, i batteri non sono utilizzabili per la produzione di proteine che richiedono modificazioni post-traduzionali (Fischer e Emans, 2000). I lieviti, dal canto loro, hanno trovato una certa diffusione nella produzione di proteine ricombinanti grazie alla capacità di attuare le modificazioni post-traduzionali tipiche degli organismi eucariotici e alla possibilità di utilizzare substrati poco costosi per la loro crescita. Tuttavia, presentano alcuni svantaggi legati alla scarsa resa, a una bassa efficienza secretoria e alla eccessiva glicosilazione che ne limitano notevolmente l'impiego.

L'utilizzo di cellule umane (specialmente linee tumorali) o animali (es. CHO) trasformate e la successiva coltura in vitro rappresenta attualmente il metodo di riferimento per la produzione di principi attivi farmaceutici, in considerazione della elevata qualità delle proteine prodotte. Sfortunatamente, questo metodo si caratterizza per gli elevati costi di investimento e di esercizio.

## **1.12 PRODUZIONE DI POLIPEPTIDI *ELASTIN-LIKE* IN PIANTA**

L'utilizzo di piante come bioreattori per la produzione di polipeptidi elastino-simili è già stato sperimentato, soprattutto nell'ambito più ristretto dei complessi di fusione. Due sono gli esempi principali e in entrambi le proteine ricombinanti sono state prodotte in foglie di tabacco (*Nicotiana tabacum* L.). Nel primo caso (Patel et Al., 2007) è stato prodotto un ibrido tra diversi tipi di interleuchina e corti polipeptidi ELP, successivamente impiegati per la purificazione dei complessi di fusione mediante transizione di fase. Nel secondo caso (Scheller et Al., 2003), ELP è stato legato alla proteina della seta di ragno (*spider-silk*) allo scopo di sfruttarne, sia le caratteristiche elastiche, sia la transizione di fase durante il processo di purificazione. In questo secondo lavoro, la proteina di fusione è stata prodotta sia in foglia di tabacco, sia in foglia di patata (*Solanum tuberosum* L.).

### 1.13 PRODUZIONE DI HELP IN ENDOSPERMA DI RISO

L'endosperma di riso offre alcuni importanti vantaggi per l'espressione di una proteina ricombinante; questo tessuto consente il suo accumulo in forma stabile per lunghi periodi di tempo senza compromissione della loro attività biologica (Stoger et Al., 2002). La proteina, infatti, in tale ambiente è protetta dalla degradazione proteolitica per la sintesi di quantità significative di inibitori di proteasi. A ciò si aggiunge il contenuto relativamente basso di composti fenolici e lipidi che permette di ottenere una migliore efficienza nei successivi processi di estrazione e purificazione della proteina dal tessuto vegetale. Inoltre, le piccole dimensioni del seme consentono il raggiungimento di un'alta concentrazione della molecola ricombinante, aspetto di particolare interesse per la produzione industriale. Infine, la proteina espressa in seme non manifesta caratteristiche di fitotossicità e non interferisce, quindi, con lo sviluppo e la crescita della pianta.

Il riso è considerato specie modello per le piante appartenenti alla classe delle monocotiledoni grazie a una serie di caratteristiche che possono essere così riassunte:

- genoma completamente sequenziato, di dimensioni minori (431 Mb) rispetto alle altre graminacee;
- facilità di trasformazione e rigenerazione;
- tecniche colturali semplici e bassa richiesta di manodopera dato l'elevato grado di meccanizzazione ;
- brevità del ciclo biologico (da 140 a 170 gg in funzione del tipo di cultivar);
- elevate rese per ettaro di superficie coltivata;
- sistema di unioni fondato sull'autogamia e sulla cleistogamia, caratteristica importante ai fini della biosicurezza di una PGM;
- possibilità di utilizzo di varietà inadatte al consumo (*no-food*) e destinate a scopi diversi rispetto all'alimentazione umana (es. estrazione di amido);
- presenza di marcatori genetici legati alle caratteristiche del seme (colore, forma, indice di collosità e consistenza) (Yuan et Al., 2001) al fine di evitare l'ingresso nella filiera alimentare di sementi prodotte da piante transgeniche.

Nel presente lavoro, per la manipolazione genetica, è stata utilizzata CR W3, una varietà *waxy* costituita dall'Ente Nazionale Risi per scopi industriali.

## 1.14 SCOPO DELLA TESI

Con questo progetto si intende valutare le capacità produttive di una specie modello, il riso, nell'espressione e produzione di una particolare tipologia di polimero.

Questo polimero è stato chiamato HELP-R, dove HELP è l'acronimo di Human Elastin-Like Polypeptide ed R, indica la specie in cui è stato prodotto, ovvero il riso.

HELP ricalca il motivo esapeptidico (VAPGVG) della regione più regolarmente ripetuta della tropoelastina umana, a cui sono intervallati domini di cross-linking.

La caratteristica fondamentale di questa proteina artificiale è la sua propensione a formare reticoli idrofilici che possono essere impiegati per ottenere matrici in grado di ritenere acqua (*idrogels*) e, quindi, a riprodurre l'ambiente fisiologico della matrice extracellulare tissutale. Tale capacità rappresenta una promettente alternativa ai polimeri sintetici già utilizzati in campo biomedico.

Le piante rappresentano un sistema economico per la produzione di proteine ricombinanti. Gli obiettivi primari del presente dottorato sono quindi: 1) l'utilizzo dell'endosperma di riso come piattaforma tecnologica per la produzione del polimero elastino-simile già prodotto in *Escherichia coli*; 2) la definizione delle procedure di estrazione; 3) la caratterizzazione del polipeptide HELP-R prodotto. Questi 3 punti concorreranno a verificare la fattibilità del "*molecular farming*" per la produzione su scala industriale di proteine elastino-simili.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 PROGETTAZIONE DEL POLIPEPTIDE HELP

La progettazione del polimero HELP è stata effettuata in collaborazione con la dott.ssa Antonella Bandiera, Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, ideatrice del polimero stesso.

```
APAAAAAKAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGV  
PGIAPAAAAAKAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGV  
GVAPGIAPAAAAAKAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGV  
PGVGVAPGIAPAAAAAKAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGV  
GVAPGVGVAPGIAPAAAAAKAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGV  
PGVGVAPGVGVAPGIAPAAAAAKAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGV  
GVAPGVGVAPGVGVAPGIAPAAAAAKAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLA  
PGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIAPAAAAAKAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGV  
GLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGI
```

**Fig. 2.1** *struttura ottamerica del polimero HELP; in rosso e in blu sono rappresentati rispettivamente i domini di cross-linking e le zone contenenti il motivo VAPGVG ripetuto (o varianti dello stesso).*

Da un punto di vista strutturale, il polipeptide HELP è un ottamero perfetto (Fig. 2.1), i cui monomeri ricalcano una precisa zona della tropoelastina umana (da aa 458 ad aa 524) codificata dagli esoni 23 e 24 (§ 1.2).

### 2.2 DESIGN DEL GENE SINTETICO HELP-R

La sequenza polinucleotidica codificante HELP-R è stata pianificata in silico utilizzando un metodo di scrittura genica sviluppato presso la sezione di Genetica del Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali dell'Università degli Studi di Udine. Tale metodo, detto del *codon-context*, tiene conto della preferenza codonica riscontrata in relazione ai possibili contesti di sequenza derivanti dall'inclusione di uno o l'altro dei vari codoni sinonimi a disposizione per la codifica di un particolare

amminoacido. Attualmente risultano tabulate le preferenze codoniche relative a geni con profilo di espressione elevato o scarso di 5 specie vegetali in due tessuti diversi (lamina fogliare, endosperma o tessuto cotiledonare). Tra le specie già analizzate è presente *Oryza sativa* L.

La scrittura viene effettuata a partire dall'amminoacido in posizione carbossi-terminale e procedendo a ritroso, un amminoacido alla volta. Più specificatamente, la tecnica del *codon context* prevede i seguenti passaggi:

- Definizione della necessità/opportunità di inclusione di uno o più peptidi segnale per l'invio o la ritenzione della proteina in specifici compartimenti subcellulari;
- Scelta del o dei peptidi segnale;
- Stampa dell'intera sequenza amminoacidica con codici a 3 lettere, separati da uno spazio;
- Scelta del codone stop;
- Scrittura della sequenza nucleotidica codificante a partire dal codone stop utilizzando la tabella del *codon-context* relativa ai geni espressi ad alti livelli in endosperma di riso;
- Al termine delle operazioni di scrittura, traduzione della sequenza codificante e suo confronto con la sequenza amminoacidica programmata mediante Blast-p ([www.NCBI.](http://www.NCBI.));
- Analisi della sequenza scritta con eliminazione di eventuali omotetrameri CCCC e GGGG, attraverso sostituzione del codone massimamente preferito con la tripletta sinonima avente un grado di preferenza immediatamente inferiore;
- Ricerca degli introni criptici con software dedicati e loro eliminazione attraverso sostituzione del codone massimamente preferito con la tripletta sinonima avente un grado di preferenza immediatamente inferiore;

- Verifica del sito putativo di taglio del peptide segnale con software dedicati: PROP, SignalP e Sig-Pred.

Va rilevato che alla sequenza genica di HELP-R è stata anteposta *in frame* la sequenza codificante il peptide segnale della proteina di riserva del seme glutelina 4 di riso (GluB4), anch'essa ottimizzata con il metodo del *codon-context*. Ciò al fine di indirizzare la proteina ricombinante nel sistema secretorio rendendo così possibile il suo accumulo nei vacuoli proteici di riserva.

Approssimativamente a un terzo e a due terzi della sequenza codificante HELP-R sono state inserite mutazioni sinonime necessarie a formare tratti non ripetuti utilizzabili per il disegno di primer con cui effettuare PCR di sequenziamento.

Software disponibili in rete per l'identificazione di sequenze che possono rappresentare siti criptici di splicing:

-NetGene (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>), selezionando come organismo modello *A. thaliana*;

-GenScan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>), selezionando come organismo modello *A. thaliana*;

-GeneSplicer ([http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene\\_spl.shtml](http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml)) selezionando come organismo modello *O. sativa*.

GeneSplicer è l'unico software che permette di selezionare *O. sativa* come organismo modello; poiché il meccanismo di splicing intronico differisce significativamente tra le specie (Wang e Brendel, 2006), l'analisi con tale programma deve essere ritenuta maggiormente affidabile.

Software disponibili in rete per la verifica del sito di taglio del peptide segnale, anteposto alla sequenza HELP-R:

SignalP (Signal Peptide): <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

Sig-PRED (Signal Peptide Prediction):

[http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot\\_analysis/Signal.html](http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html)

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

## 2.3 METODICHE COMUNI DI BIOLOGIA MOLECOLARE

Tutte le reazioni di amplificazione sono state effettuate utilizzando GO Taq<sup>®</sup> DNA polymerase (Promega) e il termociclatore MyCycler<sup>™</sup> Thermal cycler (Bio-Rad). Gli oligonucleotidi d'innescio (primer) utilizzati sono stati sintetizzati da Sigma Genosys.

Le separazioni elettroforetiche di DNA su gel di agarosio (GellyPhor<sup>®</sup> LE, EuroClone) sono state effettuate con l'apparato BioRad in tampone TBE, 4 V/cm per circa 1 h.

Il recupero da gel di prodotti ottenuti da digestione enzimatica è stato realizzato mediante il kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel & PCR Clean-up System (Promega).

Le digestioni enzimatiche sono state effettuate con enzimi di restrizione prodotti da NEB.

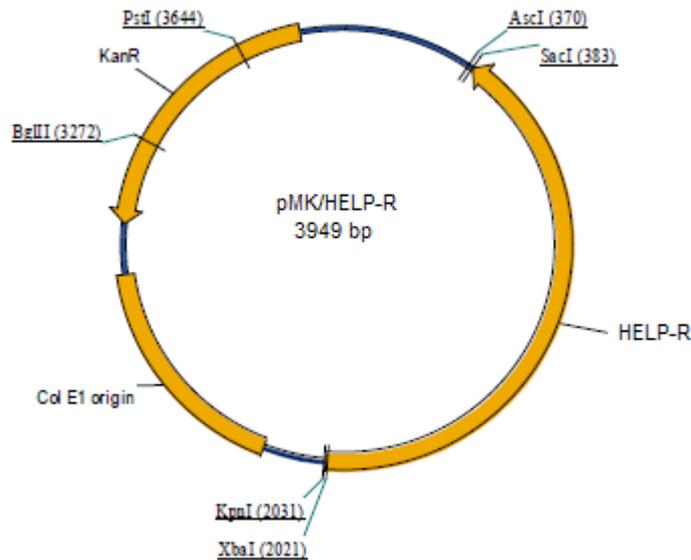
Le reazioni di saldatura tra inserti e vettori sono state condotte utilizzando T4-Ligasi (Promega) in presenza del tampone specifico, con incubazioni a 4°C overnight.

Per la trasformazione di *Escherichia coli*, è stato utilizzato il ceppo JM101 reso competente con CaCl<sub>2</sub> (Sambrook et Al., 1989); la trasformazione di cellule competenti di *A. tumefaciens* (ceppo EHA105), preparate secondo il protocollo Lin et Al. (1995), è stata effettuata mediante elettroporazione con l'elettroporatore Micro Pulser<sup>™</sup> (Bio-Rad).

Il DNA plasmidico dei ceppi trasformati è stato estratto mediante Wizard<sup>®</sup> plus minipreps (Promega).

## 2.4 SINTESI DEL GENE HELP-R

La sintesi del gene HELP-R è stata effettuata dalla ditta GeneArt, che ha anche provveduto a effettuare il sequenziamento in duplice filamento dei prodotti di sintesi e la clonazione nel vettore plasmidico pMK (3949bp) (Fig. 2.2).



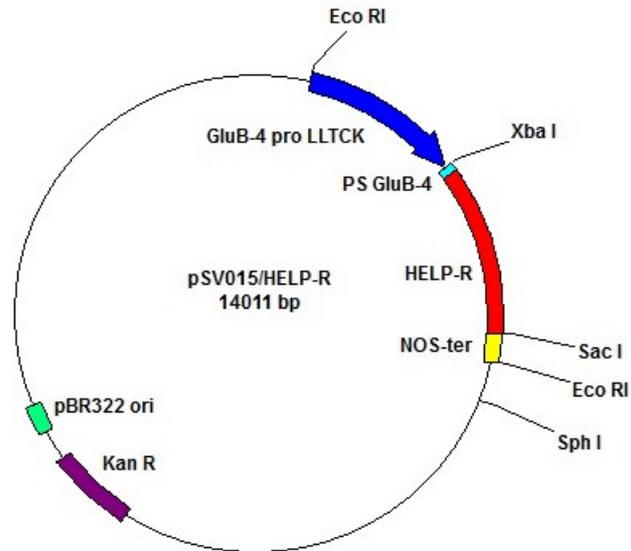
**Fig. 2.2** Vettore *pMK/HELP-R*.

Il plasmide ricombinante *pMK/HELP-R*, giunto in forma liofilizzata, è stato risospeso in acqua sterile e utilizzato in piccole quantità per la trasformazione di cellule competenti di *E. coli* JM101.

## 2.5 PRODUZIONE DEL VETTORE *pCAMBIA1300/PMI/HELP-R*

Per poter esprimere *HELP-R* in seme di riso, si è deciso di produrre un costrutto che portasse un promotore endosperma-specifico e un terminatore attivo in pianta. Nel caso specifico è stato utilizzato il promotore della glutelina 4 di riso (*GluB-4*) e il terminatore *NOS*.

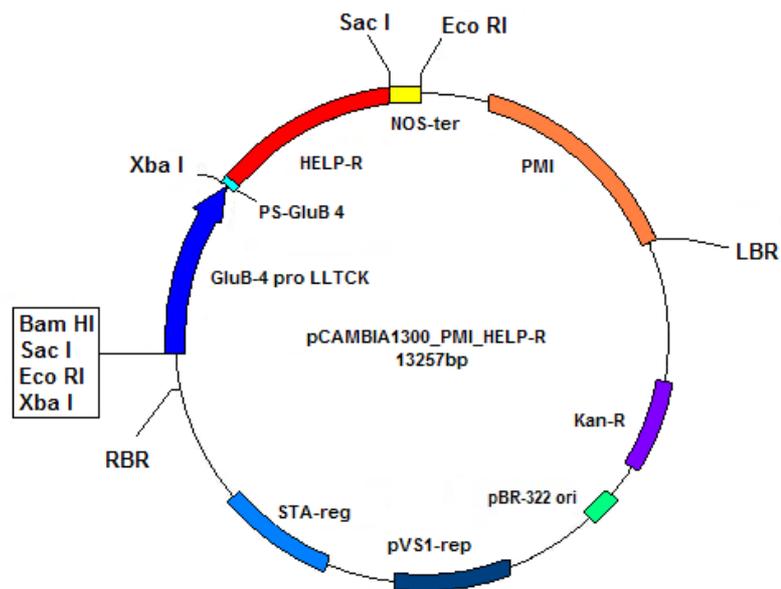
Per ottenere il vettore di espressione, il gene *HELP-R* è stato escisso dal plasmide *pMK/HELP-R* mediante digestione con gli enzimi di restrizione *Xba* I e *Sac* I e dunque sfruttando i siti di riconoscimento per tali enzimi presenti rispettivamente ai terminali 5' e 3' del gene. *HELP-R* è stato quindi sub-clonato nel vettore intermedio *pSV015* per l'inserimento delle cassette relative al promotore *GluB-4* e al terminatore *NOS* (Fig. 2.3).



**Fig. 2.3** Vettore *intermedio pSV015/HELP-R*.

Per estrarre dal vettore intermedio il costrutto Glub4-pro/HELP-R/NOS-ter, pSV015 è stato digerito con l'enzima di restrizione *EcoR* I, i cui siti bersaglio sono presenti a monte e a valle del costrutto.

Il tratto Glub4-pro/HELP-R/NOS-ter è stato quindi inserito nel vettore pCAMBIA1300/PMI, ottenendo un vettore binario d'espressione in pianta (Fig. 2.4).



**Fig. 2.4** Vettore *pCAMBIA1300\_PMI\_HELP-R*.

Dopo aver verificato l'effettivo inserimento e il corretto orientamento del gene sintetico, si è provveduto a un'ulteriore verifica delle sequenze nucleotidiche per escludere possibili mutazioni occorse durante le operazioni di biologia molecolare. Questo servizio è stato svolto da Primm utilizzando primer disegnati sul promotore GluB4, sul terminatore NOS e sulle sequenze interne non ripetute di HELP-R (cfr. § 2.2). Le sequenze dei primer impiegati per il sequenziamento sono riportate in Tabella 2.1.

Primer		Sequenza del primer
<b>HELP-R1_for</b>	forward	5' - GGGCTTGCTCCTGGTGTG -3'
<b>HELP-R1_rev</b>	reverse	5' - CCAAATTGAGCAGCCTTTGC -3'
<b>HELP-R2_for</b>	forward	5' - GCAAAGGCTGCTCAATTTGG -3'
<b>HELP-R2_rev</b>	reverse	5' - CACACCAGGAGCAAGCCC -3'
<b>END GluB4</b>	forward	5' - GATTCTTTTCTTCACTATAT -3'
<b>END Gcasi</b>	reverse	5' - ATTGTGAGCGGATAACAATT -3'

**Tab. 2.1** Sequenze dei primer utilizzati per il sequenziamento del gene HELP-R.

Al termine del sequenziamento, il vettore di espressione è stato elettroporato in *Agrobacterium tumefaciens*, ceppo EHA 105 e l'avvenuta inserzione del plasmide pCAMBIA1300/HELP-R è stata verificata mediante PCR utilizzando la coppia di primer HELP-R1\_for e HELP-R1\_rev (Tab. 2.1).

I cicli termici della suddetta PCR sono riportati in Tabella 2.2.

Temperatura	Tempo	Cicli
95°C	5'	1
95°C	40''	35
64°C	40''	
72°C	1'10''	
72°C	5'	1
4°C	∞	

**Tab. 2.2** Ciclo PCR per i primer HELP-R1\_rev, HELP-R1\_for.

## **2.6 TRASFORMAZIONE DI *Oryza sativa* L.**

Per la trasformazione di riso è stato utilizzato il protocollo di Hiei et Al. (1994), modificato da Hoge (Rice Research Group, Institute of Plant Science, Leiden University) e Guiderdoni (programma Biotrop, Cirad, Montpellier, France) fino all'ottenimento dei calli trasformati. Per la successiva fase di selezione è stato applicato, invece, il protocollo di Datta e Datta (2006). La varietà oggetto di trasformazione è stata CR W3 (costitutore: Ente Nazionale Risi, Milano); CR W3 presenta granello tondo, endosperma di tipo *waxy*, apice della lemna colorato, precocità di fioritura e maturazione, elevata resistenza al brusone e alla sgranatura. I primi tre caratteri sono sufficienti a distinguerla da tutte le altre varietà coltivate in Italia e in Europa.

### **2.6.1 PREPARAZIONE E SVILUPPO DI CALLI EMBRIOGENICI DA SCUTELLO DI RISO**

La trasformazione di riso è avvenuta su calli embriogenici derivati da scutello. Per indurre la proliferazione di calli da tessuto scutellare, è stata dapprima eseguita la sbramatura dei semi di riso. Per eliminare potenziali patogeni e saprofiti contaminanti, si è proceduto quindi alla disinfezione delle cariossidi in soluzioni di etanolo e ipoclorito di sodio e a una serie di lavaggi con acqua sterile. Successivamente, i semi sono stati asciugati su carta bibula sterile e depositati su piastre Petri contenenti il substrato per l'induzione a callo (CIM, *callus-induction medium*).

Le piastre così ottenute sono state incubate al buio, a una temperatura di 28°C per 21 giorni; dopo 1 settimana di incubazione si è proceduto all'eliminazione dell'endosperma e della radichetta per favorire lo sviluppo del callo proveniente dallo scutello.

Al termine del periodo di induzione, si è operato il trasferimento del callo su substrato CIM rinnovato, a cui ha fatto seguito la frammentazione delle masse callose. La sub-coltura è stata fatta proseguire per altri 10 giorni in modo da sviluppare il callo embriogenico e renderlo idoneo alla trasformazione.

### **2.6.2 CO-COLTURA DEI CALLI CON *A. tumefaciens***

Per ottenere quantità sufficienti di *A. tumefaciens* per la trasformazione, il ceppo portante il vettore di espressione è stato incubato per 3 giorni a 30°C in LB agar.

Ottenute le colture di agrobatterio, le relative patine di crescita batterica sono state prelevate e sospese nel mezzo liquido di co-coltivazione CCML (*co-cultivation medium liquid*), fino a ottenere una O.D. 600 di circa 1.0, corrispondente a  $3\text{-}5\cdot 10^9$  cellule/mL.

I calli migliori, cioè quelli con un diametro di circa 2 mm, compatti e dal colore tendente al bianco, sono stati incubati con la sospensione. Dopo asciugatura, i calli, in numero massimo di 20 per piastra Petri high-edge (Sarstedt), sono stati depositati sul substrato solido per la co-coltura CCMS (*co-cultivation medium solidified*) e incubati al buio, a una temperatura di 25°C per 3 giorni.

### **2.6.3 SELEZIONE DELLE CELLULE TRASFORMATE**

Dopo aver effettuato la co-coltura di calli embriogenici di riso e agrobatterio, si è proceduto alla eliminazione del batterio attraverso inclusione nei substrati di coltura dell'antibiotico cefotaxime. Nel contempo è stata effettuata la selezione dei tessuti trasformati, sfruttando il sistema di selezione positiva fondato su PMI (fosfomannosio isomerasi) (Todd e Tague, 2001). Tale metodo prevede l'impiego di una serie di substrati di coltura contenenti concentrazioni progressivamente crescenti di mannosio (agente selettivo) e decrescenti di saccarosio.

La procedura è la seguente:

- Trasferimento dei calli provenienti dalla co-coltura su substrato privo di mannosio e contenente il 3% di saccarosio; incubazione per 1 settimana al buio a una temperatura di 28°C;
- Trasferimento dei calli sul mezzo di selezione contenente 2% saccarosio e 1.5% mannosio e incubazione al buio per 2 settimane a una temperatura di 28°C;
- Trasferimento dei calli sul mezzo di selezione contenente 1% saccarosio e 2% mannosio e incubazione al buio per 2 settimane a una temperatura di 28°C;

- Trasferimento dei calli sul mezzo di selezione contenente 0.5% saccarosio e 2.5% mannosio e incubazione al buio per 2 settimane a una temperatura di 28°C;
- Trasferimento dei calli non imbruniti in Petri high-edge contenenti il substrato di rigenerazione privo di mannosio;
- Quando le piantine sono sufficientemente grandi da poter essere separate dal callo ( $\geq 3$  cm di altezza), si procede al trasferimento in tubi di coltura contenenti il substrato per la radicazione ROM (*rooting medium*).

#### **2.6.4 RIGENERAZIONE DI PIANTINE DI RISO DA CALLI TRASFORMATI**

La rigenerazione delle piantine putativamente trasformate è avvenuta grazie a un'opportuna stimolazione ormonale del callo. I calli embriogenici di riso selezionati sono stati trasferiti su piastre Petri high-edge contenenti il substrato per la pre-rigenerazione PRM (*pre-regeneration medium*) e incubati per 1 settimana a 28°C. I calli sono stati quindi trasferiti sul substrato per la rigenerazione RM (*regeneration medium*) nel numero massimo di 8-10 unità per piastra Petri high-edge. La rigenerazione delle piantine è avvenuta in presenza di luce, a 28°C per 3-4 settimane.

Quando le piantine sono risultate sufficientemente grandi da poter essere separate dal callo ( $\geq 3$  cm di altezza), si è proceduto al loro trasferimento in tubi di coltura contenenti 25 mL del substrato per la radicazione ROM (*rooting medium*). La sub-coltura all'interno dei tubi è proseguita per circa 3 settimane sempre a 28°C e alla luce.

A conclusione del processo rigenerativo, le piante sono state trasferite in torba e allevate in serra.

## 2.7 ANALISI MOLECOLARI SUI TRASFORMATI PRIMARI

### 2.7.1 ESTRAZIONE DEL DNA

Dopo essere state trasferite in torba e acclimatate nel nuovo ambiente di coltivazione, le piantine rigenerate in presenza dell'agente selettivo sono state analizzate a campione mediante PCR per dimostrare l'effettiva trasformazione. E' stata pertanto eseguita l'estrazione del DNA totale da foglia utilizzando l'estrattore automatico MAXWELL<sup>®</sup> 16 (Promega).

### 2.7.2 AMPLIFICAZIONE CON PRIMER UNIVERSALI

Al fine di valutare l'amplificabilità del DNA estratto, è stata effettuata una PCR con una coppia di primer universali che si appaiano a una regione dell'introne TrNL del gene cloroplastico UAA (Taberlet et Al., 1991).

Le sequenze dei primer sono riportate di seguito in Tabella 2.3.

Primer		Sequenza del primer
<b>CPC</b>	forward	5' - CGAAATCGGTAGACGCTACG -3'
<b>CPD</b>	reverse	5' - GGGGATAGAGGGACTTGAAC -3'

**Tab. 2.3** Sequenze dei primer CPC-CPD utilizzati.

I cicli termici della PCR condotta con i primer CPC e CPG sono riportati in Tabella 2.4.

Temperatura	Tempo	Cicli
95°C	5'	1
95°C	45"	40
60°C	30"	
72°C	50"	
72°C	5'	1
4°C	∞	

**Tab. 2.4** Ciclo PCR per i primer CPC-CPD.

### 2.7.3 VERIFICA DELLA TRASFORMAZIONE DELLE PIANTE DI RISO

Per identificare le piante T<sub>1</sub> presenti all'interno della popolazione dei rigeneranti, è stata condotta un'analisi PCR con primer disegnati su una zona del promotore CaMV35S presente a monte del gene marcatore PMI.

Le sequenze dei primer sono riportate di seguito in Tabella 2.5.

Primer		Sequenza del primer
35S-2_for	forward	5' - AGGAAGGTCTTGCGAAGGAT -3'
35S-2_rev	reverse	5' - GATTGATGTGATAACATGGTGGG -3'

**Tab. 2.5** Sequenze dei primer HELP-R forward e reverse.

I cicli termici della PCR eseguita con i primer anzidetti sono riportati in Tabella 2.6.

Temperatura	Tempo	Cicli
95°C	5'	1
95°C	35''	35
58°C	35''	
72°C	1'10''	
72°C	5'	1
4°C	∞	

**Tab. 2.6** Ciclo PCR per la coppia di primer 35S-2\_for e 35S-2\_rev.

### 2.8 METODICHE COMUNI DI ANALISI PROTEICA

Una quantificazione indicativa del contenuto proteico negli estratti da farina di riso è stata ottenuta con un saggio biochimico di tipo Bradford, utilizzando il reattivo Bradford reagent (Sigma) e/o mediante lettura spettrofotometrica a 280 nm con lo strumento NanoDrop™ (Thermo scientific). La colorazione con blu di Coomassie dei gel dopo corsa elettroforetica è stata effettuata utilizzando la seguente soluzione: 10% (v/v) acido acetico glaciale, 50% (v/v) metanolo, 0.25% (p/v) Coomassie R-250 (Sigma), 40% H<sub>2</sub>O. La decolorazione dei gel è stata operata con la seguente

soluzione di destaining: 10% (v/v) acido acetico glaciale, 20% (v/v) metanolo e 70% H<sub>2</sub>O.

## **2.9 ANALISI WESTERN BLOT**

Gli estratti proteici totali o parzialmente purificati sono stati separati in elettroforesi SDS-PAGE (Laemmli, 1970) utilizzando l'apparato Mini Protean II (BioRad), con uno spessore del gel di 1.5 mm e una percentuale di acrilammide pari al 10-12%. Prima del caricamento, i campioni sono stati denaturati a 100°C per 5 min in presenza di 5% β-mercaptoetanololo.

Le proteine separate sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (GE Healthcare) utilizzando l'apparato Trans-BLOT® SD (BioRad) a 2 mA per cm<sup>2</sup> di gel per 60 min.

Le membrane sono state incubate 30 min a temperatura ambiente in soluzione di blocking (5% p/v latte scremato in polvere-Oxoid in PBS-Tween 0.1% v/v).

Per la rilevazione di HELP è stato utilizzato l'anticorpo policlonale commerciale: Anti Human Beta Elastin (18-783-77566, GenWay) prodotto in coniglio e diluito 1:500 utilizzando una soluzione 5% p/v latte scremato in polvere-Oxoid in PBS-Tween 0.1%. Le membrane sono state ibridate con l'anticorpo primario overnight a 4°C. Dopo tre lavaggi da 10 min ciascuno in PBS Tween 0.1%, è seguita l'incubazione per 1 h a temperatura ambiente in anticorpo secondario anti-IgG di coniglio coniugato con perossidasi di rafano (HRP) (Sigma, diluizione 1:10000).

Per la rilevazione è stato utilizzato il sistema di rilevazione Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore).

Per la determinazione dei pesi molecolari è stato usato il marker Prestained Protein Marker, Broad Range 7-175 kDa (P7708V, NEB).

## **2.10 SELEZIONE DEI TRASFORMATI PRIMARI (GENERAZIONE T<sub>1</sub>)**

La selezione dei trasformati primari è stata effettuata analizzando gli estratti proteici da farina di riso con la tecnica Western blot. L'analisi è stata condotta prelevando per ciascuna pianta un campione di 40 semi. Dopo sbramatura e macinazione con

macina caffè, 300 mg di farina sono stati sottoposti a estrazione proteica utilizzando 1 mL di tampone 100 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 10  $\mu$ L di cocktail di inibitori di proteasi (Sigma).

La farina è stata omogeneizzata in mortaio e incubata a 4°C o/n in agitazione. È seguita una centrifugazione a 4°C per 45 min a 16000xg e il prelievo del chiarificato contenente le proteine.

Gli estratti proteici sono stati analizzati mediante saggio Bradford, al fine di quantificare la proteina totale presente in ciascuno di essi.

L'analisi Western blot è stata effettuata confrontando il segnale ottenuto caricando 25  $\mu$ g di proteina totale di ciascun estratto. I campioni migliori sono stati selezionati visivamente, in base all'intensità della banda.

Una seconda tornata di selezione è stata attuata sulle 30 migliori linee analizzando il segnale relativo a 10  $\mu$ g di proteina totale.

Per la fase finale di selezione, si è provveduto a estrarre nuovamente le proteine totali da ulteriori 40 semi delle 16 linee risultate migliori nella fase precedente; gli estratti sono stati confrontati tra loro in Western blot utilizzando sempre 10  $\mu$ g di proteina totale.

L'intero processo di selezione è servito a individuare tre linee superiori, per le quali è stato intrapreso un nuovo ciclo di coltivazione in ambiente confinato, seminando 100 piante per linea.

## **2.11 MESSA A PUNTO DEL SAGGIO DAS-ELISA**

La tecnica definita con questo acronimo, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, sfrutta il riconoscimento dell'antigene da parte di anticorpi specifici mediante il sistema sandwich (DAS-ELISA). Al fine di effettuare questo tipo di analisi su estratti proteici ottenuti da seme di riso trasformato, è stato prodotto un anticorpo policlonale in coniglio (Davids Biotechnologie) utilizzando come antigene la proteina HELP-E prodotta in *E. coli* dalla dott.ssa Bandiera. HELP-E differisce da HELP-R per la presenza di una coda APGV al C-terminale e del dominio MRGSHHHHHHGSAA all'estremità opposta.

Per ottimizzare la tecnica, anti-HELP e anti-HELP coniugato a HRP, sono stati purificati da Davids Biotechnologie su una resina derivatizzata con HELP-E. Poiché durante la fase di immunizzazione HELP-E è stata coniugata a KLH (Keyhole limpet hemocyanin), è stato richiesto di effettuare una pre-purificazione degli anticorpi contro la KLH stessa.

Utilizzando HELP-E a concentrazione nota, è stata messa a punto una retta di taratura, necessaria per la rilevazione quantitativa di HELP-R. A tale scopo è stato effettuato il *coating* della piastra con quantitativi crescenti di HELP-E. In Tabella 2.7 sono riportate le concentrazioni saggate di HELP-E.

Concentrazione di HELP-E
4 ng/ $\mu$ L
2 ng/ $\mu$ L
1 ng/ $\mu$ L
500 pg/ $\mu$ L
250 pg/ $\mu$ L
125 pg/ $\mu$ L
63 pg/ $\mu$ L

**Tab. 2.7** Concentrazioni di HELP-E per la messa a punto della retta di taratura.

### 2.11.1 SAGGIO DAS-ELISA

Per la fase di *coating* (1 h a temperatura ambiente), è stato utilizzato un anticorpo monoclonale commerciale anti-elastina (clone BA-4, Sigma E4013) diluito 1:20000 (100 ng/pozzetto) in PBS 1:5. Dopo tre lavaggi con tampone PBS, Tween 20 0.1% v/v, è stato aggiunto il tampone di *blocking* (2% p/v BSA in PBS; 200  $\mu$ L/pozzetto) lasciato incubare per almeno 30 min a temperatura ambiente. Dopo essere stati opportunamente diluiti in tampone di diluizione (2% BSA, 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% v/v Tween, pH 8.5), 100  $\mu$ L di ciascun campione sono stati seminati nei pozzetti e messi a incubare in agitazione a 37°C per 30 min. Per la rilevazione di HELP è stato utilizzato l'anticorpo policlonale appositamente prodotto (Davids Biotechnologie) diluito 1:100 in tampone di diluizione (50  $\mu$ L /pozzetto) e incubato in agitazione a 37°C per 30 min. È quindi seguita l'incubazione per 30 min a 37°C con anticorpo secondario anti-IgG di coniglio coniugato con perossidasi (HRP) (Sigma,

diluizione 1:500) (50  $\mu$ L/pozzetto). Per la rilevazione del segnale, è stato utilizzato come substrato per l'enzima perossidasi TMB 1-Step ULTRA TMB-ELISA (Pierce Thermo-Scientific). La reazione colorimetrica è stata bloccata con HCl 1 M eseguendo la lettura della piastra a 450 nm con lo strumento Modulus micro plate (Promega). La rielaborazione dei dati grezzi è stata effettuata con il programma Curve Fitting data analysis (Turner BioSystem).

### 2.11.2 VALIDAZIONE DEL SAGGIO ELISA

La validazione del saggio ELISA è stata effettuata confrontando campioni di farina HELP-R contenenti quantità crescenti di farina CR W3 non trasformata. La farina HELP-R utilizzata in questi esperimenti è stata tratta da una medesima linea (HR-85) ed è stata lungamente mescolata prima di essere prelevata per la costituzione dei vari campioni. Di seguito sono riportate le proporzioni delle due farine in ciascun campione (Tabella 2.8). L'esperimento è stato condotto in triplicato.

CAMPIONE	mg DI FARINA	
	HELP-R	CR W3
1	0	300
2	37	263
3	75	225
4	150	150
5	225	75
6	263	37
7	300	0

**Tab. 2.8** *Composizione dei campioni utilizzati nelle prove di validazione del metodo ELISA.*

I campioni (300 mg) sono stati sottoposti a estrazione proteica in 1.2 mL di tampone di estrazione e lasciati incubare per 2 h in ghiaccio su tavolo agitatore. È seguita una centrifugazione a 16.000xg per 45 min a 4°C. I chiarificati sono stati analizzati con saggio ELISA; il valore rilevato, espresso in  $\mu$ g di HELP per g di farina, è stato confrontato con quello atteso. In particolare, è stato verificato che il dato percentuale

dello scarto tra i due valori fosse in termini assoluti inferiore al 15%, valore spesso considerato limite in procedure di validazione di attività analitiche.

## 2.12 SCELTA DEL TAMPONE DI ESTRAZIONE

Nel tentativo di ottimizzare la procedura di estrazione di HELP-R, sono state condotte prove comparative tra tamponi, a diverse condizioni di pH e forza ionica (Tabella 2.9).

TAMPONE	pH	FORZA IONICA
L-Istidina 20 mM	5	250 mM NaCl
L-Istidina 20 mM	5	500 mM NaCl
Tris-HCl 100 mM	8	0 M NaCl
Tris-HCl 100 mM	8	250 mM NaCl
Tris-HCl 100 mM	8	500 mM NaCl
Na <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> 20 mM	10	0 M NaCl
Na <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> 20 mM	10	250 mM NaCl
Na <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> 20 mM	10	500 mM NaCl

**Tab. 2.9** *Tamponi di estrazione utilizzati nelle prove comparative.*

In tutti i casi è stato aggiunto il detergente Tween 20 a una concentrazione finale pari allo 0.1%.

Ciascuna prova è stata condotta estraendo 4 g di farina con 20 mL di tampone. Dopo incubazione in ghiaccio per 2 h su tavolo agitatore, gli estratti sono stati centrifugati a 11.000xg per 45 min a 4°C. L'esperimento è stato condotto in triplicato e i chiarificati sottoposti a saggio ELISA.

## 2.13 ANDAMENTO DELL' ESTRAZIONE NEL TEMPO

Sempre al fine di migliorare la procedura di estrazione di HELP-R, 5 g di farina sono stati omogeneizzati in 20 mL di tampone di estrazione Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> 20 mM, pH 10, 0.1% Tween 20 (v/v). L'omogenato è stato incubato a 4°C con agitatore magnetico. A intervalli regolari sono state prelevate aliquote di circa 300 µL che sono state

centrifugate a 11.000xg per 5 min a 4°C. Anche in questo caso le prove sono state condotte in triplicato. In Tabella 2.10 sono riportati i tempi in cui sono stati effettuati i prelievi.

N° PRELIEVO	TEMPO
1	1 h
2	2 h
3	4 h
4	8 h
5	24 h

**Tab. 2.10** *Tempi di estrazione posti a confronto.*

I chiarificati sono stati sottoposti a saggio ELISA, SDS-PAGE (colorazione del gel con blu di Coomassie), nonché ad analisi Western blot.

## **2.14 EFFICIENZA DEL PROCESSO DI ESTRAZIONE**

Anche al fine di valutare la quantità di HELP-R prodotto in endosperma di riso, sono state condotte prove di estrazione ripetuta a partire dal medesimo quantitativo di farina.

Dopo una prima estrazione di due ore, la farina è stata sottoposta ad altre tre estrazioni della durata di 15-20 min ciascuna utilizzando sempre il tampone Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> 20 mM, pH 10, 0.1% Tween 20.

Ogni passaggio ha previsto le seguenti fasi:

- omogeneizzazione della farina in tampone di estrazione;
- centrifugazione a 11.000xg per 30 min a 4°C;
- recupero del surnatante.

L'efficienza di estrazione relativa a ciascun passaggio è stata valutata mediante saggio ELISA.

## **2.15 SELEZIONE INTERNA ALLA GENERAZIONE T<sub>2</sub>**

La selezione interna alla generazione T<sub>2</sub> è stata effettuata mediante saggio DAS-ELISA.

Una prima fase di selezione è servita a definire i 20 migliori individui entro ciascuna delle tre popolazioni di 85 piante corrispondenti alle tre linee seminate (HR-85, HR-103, HR-104). A tale scopo, da ciascuna pianta è stato prelevato un campione di 40 semi, che è stato sbramato e macinato con mulino analitico; 300 mg di farina sono stati sottoposti a estrazione proteica con 1.2 mL di tampone Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> 20 mM, pH 10, 0.1% Tween 20 a cui sono stati aggiunti 10 µL di cocktail di inibitori di proteasi (Sigma).

La farina idratata e omogeneizzata con il tampone è stata incubata a 4°C o/n in agitazione. E' seguita una centrifugazione a 4°C per 45 min a 16000xg e il prelievo del chiarificato contenente le proteine. Gli estratti centrifugati sono stati quindi analizzati mediante ELISA.

I 20 individui per linea ritenuti migliori sono stati nuovamente analizzati, effettuando tre estrazioni per pianta, ognuna derivante da un campione di 40 semi. Questa seconda fase di selezione è servita a definire per ciascuna delle tre linee i migliori 4 individui, che sono stati nuovamente confrontati mediante ELISA nella medesima piastra.

L'intero processo selettivo si è risolto nell'identificazione della migliore progenie deputata a diventare la linea produttiva.

### **2.15.1 STIMA DELLA RESA DI HELP-R**

Terminata la selezione, il seme derivante dai 20 migliori individui di ciascuna linea è stato riunito al fine di costituire il materiale necessario alla caratterizzazione di HELP-R. I tre bulk di seme prodotti (HR-85, HR-103, HR-104) sono stati trebbiati, sbramati, sbiancati e macinati con mulino ventilato. Sui tre tipi di farine sono state condotte analisi riguardanti la resa di HELP-R, effettuando tre estrazioni seriali su un campione iniziale di 5 g.

Di seguito sono riportati i tempi e i volumi di ciascuna estrazione (Tabella 2.11).

<b>ESTRAZIONE</b>	<b>mL Tampona</b>	<b>TEMPO</b>
1	20	2 h
2	15	20 min
3	15	20 min

**Tab. 2.11** *Tempi e volumi applicati nei tre passaggi di estrazione.*

Al termine di ogni passaggio, è stata effettuata una centrifugazione a 11000xg per 30 min a 4°C e il successivo prelievo dei chiarificati.

La prova è stata replicata tre volte, gli estratti sono stati analizzati con saggio ELISA.

## **2.16 TRANSIZIONE DI FASE INVERSA DI HELP-R**

Una prima caratterizzazione del polimero HELP prodotto in endosperma di riso è stata effettuata sottoponendo l'estratto proteico a transizione di fase inversa, in quanto proprietà attesa del polimero. Il protocollo qui presentato è stato messo a punto in collaborazione con la Dott.ssa Antonella Bandiera dell'Università degli Studi di Trieste.

Le fasi di questo procedimento sono state:

- estrazione proteica da farina di riso HR (§ 2.15);
- prelievo del surnatante;
- aggiunta di NaCl al chiarificato fino a una concentrazione finale 2 M;
- solubilizzazione di NaCl con agitatore magnetico a temperatura ambiente;
- incubazione a 42°C per 30 min in bagno termostato;
- centrifugazione a 8000xg per 30 min a 40°C;
- eliminazione del surnatante;
- risospensione del pellet in Tris-HCl 100 mM, pH 8 (1/3 del volume iniziale) o/n a 4°C in agitazione;
- centrifugazione a 11000xg per 30 min a 4°C;
- prelievo del surnatante (contenente HELP-R) e risospensione del pellet esausto in PBS, Tween 20 0.1% (v/v), SDS 0.1% (v/v);
- secondo ciclo termico a 42°C del surnatante portato a 2 M NaCl;

- risospensione del pellet in Tris-HCl 10 mM, pH 8 (1/3 del volume iniziale) o/n a 4°C in agitazione;
- centrifugazione a 11000xg per 30 min a 4°C;
- prelievo del surnatante.

Tutte le frazioni ottenute da questo processo sono state analizzate mediante ELISA, Western blot, elettroforesi su gel di poliacrilammide (12%) con colorazione in blu di Coomassie.

## **2.17 CARATTERIZZAZIONE DI HELP-R**

Per la caratterizzazione di HELP-R, sono stati condotti diversi esperimenti variando i tre principali fattori coinvolti nella transizione di fase del polimero, ovvero temperatura, forza ionica e pH.

In queste prove è stato valutato il quantitativo di HELP-R presente nel primo pellet risospeso in Tris-HCl 100 mM pH 8 (cfr. § 2.16).

Al fine di valutare la variazione delle proteine totali, le diverse frazioni ottenute sono state analizzate mediante lettura spettrofotometrica a 280 nm.

### **2.17.1 TEMPERATURA**

In questo primo esperimento, l'estratto proteico è stato portato a 2 M NaCl e successivamente diviso in tre prove inerenti altrettanti valori di temperatura di precipitazione: temperatura ambiente (rt), 37°C e 42°C, per 30 min. Trascorso tale periodo, i campioni sono stati centrifugati rispettivamente a rt, 37°C e 40°C a 8000xg per 30 min. Il pellet ottenuto dopo questa prima centrifugazione è stato risospeso in tampone Tris-HCl 100 mM (1/3 del volume iniziale) o/n a 4°C. Dopo centrifugazione a 11000xg per 30 min a 4°C, il pellet residuo è stato risospeso in PBS-Tween 20 0.1%-SDS 0.1%.

L'esperimento è stato condotto in triplicato e le frazioni analizzate mediante ELISA, Western blot e SDS-PAGE con colorazione del gel elettroforetico in blu di Coomassie.

### **2.17.2 FORZA IONICA**

Al fine di valutare l'effetto della forza ionica (NaCl) sulla precipitazione della proteina HELP-R, sono state considerate quattro diverse concentrazioni di NaCl nell'estratto: 0 M, 0.5 M, 1 M e 2 M.

I campioni sono stati incubati in bagno termostato a 42°C per 30 min e centrifugati a 8000xg per 30 min a 40°C. Come nel precedente esperimento, il pellet ottenuto dopo questa prima centrifugazione è stato risospeso in tampone Tris-HCl 100 mM (1/3 del volume iniziale) o/n a 4°C. Dopo centrifugazione a 11000xg per 30 min a 4°C, il pellet residuo è stato risospeso in PBS-Tween-SDS.

L'esperimento è stato condotto in triplicato e le frazioni analizzate mediante ELISA, Western blot e SDS-PAGE con colorazione del gel in blu di Coomassie.

### **2.17.3 pH**

In questo esperimento è stata considerato il livello di precipitazione di HELP-R nell'estratto in funzione del pH di quest'ultimo. A tal fine sono stati presi in considerazione 4 diversi valori di pH: 5, 7, 8.5 e 10.5. I campioni, dopo essere stati portati ai valori di pH stabiliti, sono stati addizionati di NaCl a una concentrazione finale 2 M e posti in bagno termostato a 42°C per 30 min. Come nei precedenti esperimenti è seguita una centrifugazione a 8000xg per 30 min a 40°C, con successivo scarto del surnatante e risospensione del pellet ottenuto in tampone Tris-HCl 100 mM (1/3 del volume iniziale) o/n a 4°C. Infine, il risospeso è stato centrifugato a 11000xg per 30 min a 4°C e il pellet residuo è stato dissolto in PBS-Tween-SDS.

Anche in questo caso l'esperimento è stato condotto in triplicato e le frazioni sono state analizzate mediante ELISA, Western blot e SDS-PAGE con colorazione del gel in blu di Coomassie.

#### **2.17.4 TEMPO DI PRECIPITAZIONE**

Un'ultima prova di caratterizzazione è consistita nel variare il tempo di permanenza dell'estratto proteico a 42°C. I campioni, dopo essere stati portati a una concentrazione 2 M di NaCl, sono stati posti a 42°C per tempi diversi: 5 min, 15 min e 30 min. Al termine del trattamento termico è seguita una centrifugazione dell'estratto a 8000xg per 30 min a 40°C. I surnatanti sono stati quindi analizzati mediante saggio ELISA.

#### **2.18 ANALISI STATISTICA DEI DATI**

Tutti i dati ottenuti sperimentalmente mediante saggio ELISA, sono stati analizzati statisticamente mediante ANOVA utilizzando il test di Tukey-Kramer.

#### **2.19 IMMUNOLocalizzazione di HELP-R IN ENDOSPERMA DI RISO**

L'analisi è stata condotta in collaborazione con la Dott.ssa Rita Musetti, Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Udine.

##### **2.19.1 PREPARAZIONE DELLE SEZIONI**

Alcune cariossidi di riso trasformato sono state raccolte in fase di maturazione latteo-cerosa, private delle glume, tagliate in frammenti di circa 1 mm<sup>2</sup> e fissate in glutaraldeide 0.2 % per 1 h a temperatura ambiente. E' seguita una fase di lavaggio in tampone fosfato 0.15 M e la disidratazione in gradiente di etanolo assoluto (da 25 a 100%). I campioni disidratati sono stati infiltrati in resina LR White (London Resin Co.) e infine polimerizzati a 60°C per 24 h.

Le sezioni (spessore 2-3 µm) sono state tagliate con microtomo LKB Nova (Reichert).

### **2.19.2 IBRIDAZIONE E OSSERVAZIONE DEI CAMPIONI AL TEM**

Le sezioni depositate su retini di nichel (Electron Microscopy Sciences) sono state incubate in una soluzione di siero normale di capra (Aurion), diluito 1:30 in buffer C (0.05 M Tris-HCl pH 7.6, 0.2% BSA), per 15 min e successivamente ibridate con l'anticorpo primario anti HELP (Davids Biotechnologie), diluito 1:50 in buffer C, per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo una serie di lavaggi in buffer B (0.5 M Tris-HCl pH 7.6, 0.9% NaCl) con Tween 20 0.1% p/v (6 x 5 min), le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario coniugato con oro colloidale (15 nm, Aurion) diluito 1:40 in buffer E (0.02 M Tris-HCl pH 8.2 contenente 0.9% NaCl e 1% BSA) per 1 h a temperatura ambiente. Terminata l'ibridazione, le sezioni, dopo una serie di lavaggi come precedentemente descritto, sono state sottoposte a colorazione con acetato di uranile e piombo citrato (Reynolds, 1963) e infine osservate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) Philips CM10.



traduzione, la sequenza relativa al peptide segnale GluB4 (tratto sottolineato in 5'). Sono inoltre indicate le zone dove sono state generate mutazioni sinonime al fine di ottenere sequenze non ripetute interne al gene, su cui disegnare primer utili al sequenziamento e alla verifica degli eventi di trasformazione genetica.

Di seguito sono riportati i risultati relativi alle analisi di sequenza effettuate al fine di verificare la composizione del gene e, in particolare, la presenza di motivi in grado di influire negativamente sulla trascrizione e traduzione del gene o di sequenze interpretabili come introni.

<b>ELEMENTO</b>	<b>N°</b>
<b>CpG totale</b>	320
<b>TpA totale</b>	0
<b>TATA</b>	0
<b>AATAAA</b>	0
<b>ATTTA</b>	0
<b>AAA</b>	16
<b>AAAA</b>	0
<b>TTT</b>	0
<b>TTTT</b>	0
<b>CCC</b>	0
<b>CCCC</b>	0
<b>GGG</b>	64
<b>GGGG</b>	0
<b>Intercodoni GC</b>	176
<b>Intercodoni TA</b>	0
	<b>%</b>
<b>GC totale</b>	79.03
<b>G/C in N<sub>3</sub></b>	75.38

**Tab. 3.1** Risultati ottenuti nell'analisi della sequenza *HELP-R*.

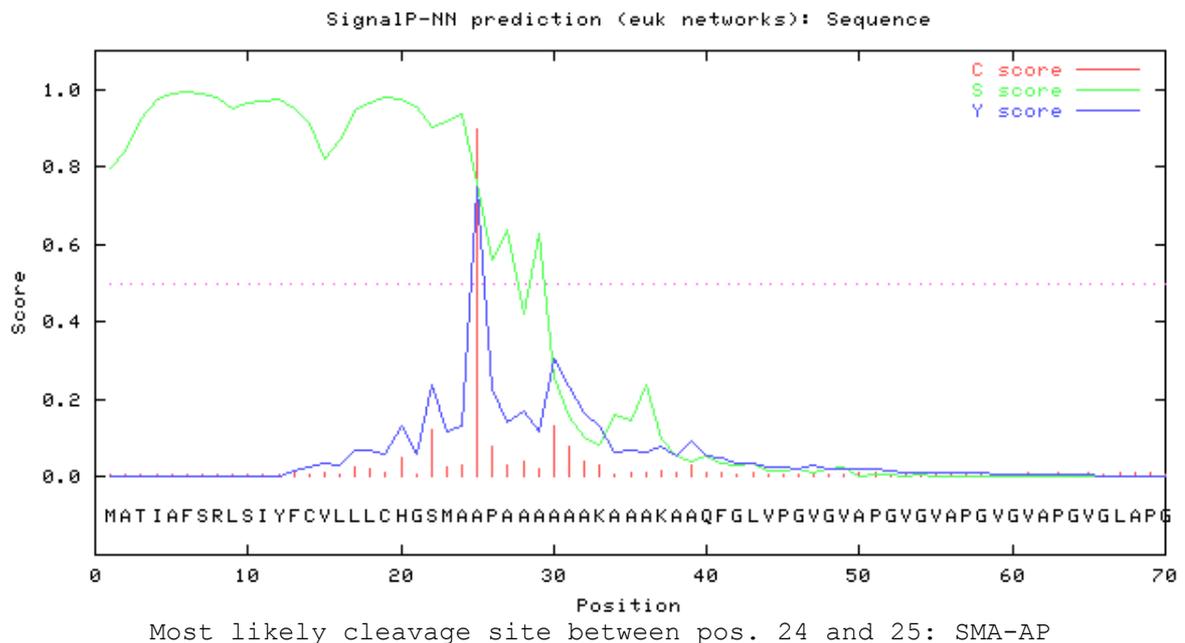
La verifica del sito di taglio del peptide segnale è stata effettuata utilizzando tre software dedicati: PROP, SignalP 3.0 e Sig-Pred.

I programmi hanno stabilito che il sito più probabile di taglio è tra il 24° e il 25° amminoacido (Fig. 3.2), corrispondenti rispettivamente all'ultimo aa del peptide segnale e al primo aa della sequenza *HELP*.

**MATIAFSRLSIYFCVLLLC**HSMA**APAAAAAAKAAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAP**  
**GVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIAPAAAAAAKAAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGVGV**  
**APGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIAPAAAAAAKAAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGV**  
**GVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIAPAAAAAAKAAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAP**  
**GVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIAPAAAAAAKAAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGV**  
**APGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIAPAAAAAAKAAAKAAQFGLVPGVGVAPGV**  
**GVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIAPAAAAAAKAAAKAAQFGLVPGVGVAP**  
**GVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIAPAAAAAAKAAAKAAQFGLVPGVGV**  
**APGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGI**

**Fig. 3.2** Sequenza amminoacidica HELP-R. In rosso e in blu sono rappresentati rispettivamente i domini di cross-linking e le zone contenenti il motivo VAPGVG ripetuto (o varianti dello stesso). Il tratto evidenziato in azzurro all' N-terminale rappresenta il peptide segnale GluB4.

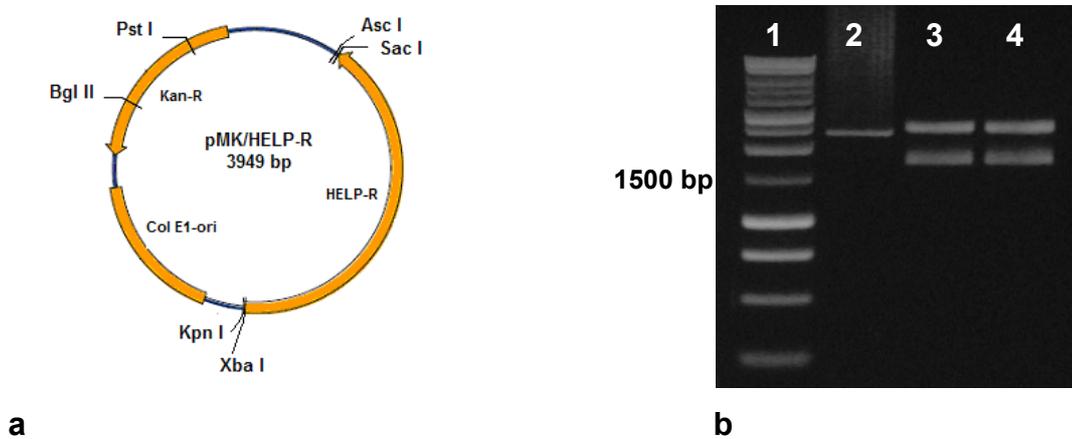
Di seguito è rappresentato l'output relativo al programma SignalP 3.0 (Fig. 3.3), in cui si vede un picco tra il 24° e il 25° amminoacido, corrispondente al più probabile sito di taglio.



**Fig. 3.3** Output del programma SignalP 3.0. C score: esprime la probabilità che l'aa sia il primo della proteina matura; S score: esprime la probabilità che l'aa sia parte del peptide segnale; Y score: la migliore stima del sito di taglio del peptide segnale.

### 3.2 PRODUZIONE DEL VETTORE pCAMBIA1300/PMI/HELP-R

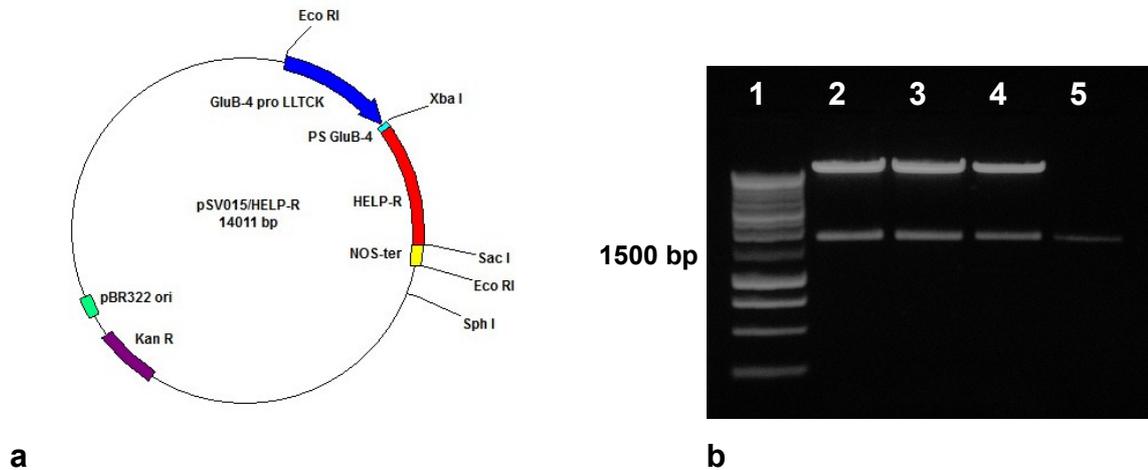
Il gene sintetico HELP-R è stato ordinato a GeneArt, la quale ha provveduto anche alla clonazione in vettore pMK e ai necessari controlli mediante sequenziamento in duplice filamento. Alla ricezione del vettore liofilizzato, esso è stato disciolto in acqua sterile e inserito, mediante elettroporazione, in *E. coli* ceppo JM101. Al fine di verificare l'effettiva trasformazione di *E. coli* con il vettore pMK/HELP-R, da alcune colonie cresciute in presenza di kanamicina è stato estratto il DNA plasmidico successivamente digerito con gli enzimi di restrizione *Xba* I e *Sac* I (Fig. 3.4 a,b).



**Fig. 3.4 a)** *Mapa del vettore pMK/HELP-R;* **b)** *Elettroforesi su gel di agarosio all'1% dei prodotti di digestione di pMK/HELP-R. Ordine di carico: 1) marker 1 kb (Promega); 2) vettore pMK/HELP-R non digerito; 3,4) vettore pMK/HELP-R digerito con Xba I e Sac I.*

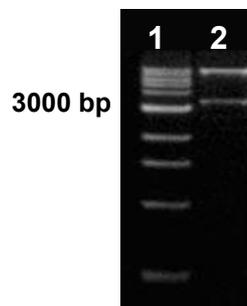
Come atteso, al termine della reazione di taglio, il DNA plasmidico è risultato essere composto da due frammenti aventi entrambi la lunghezza attesa, corrispondenti al vettore pMK linearizzato (2301 bp) e al gene sintetico HELP-R (1648 bp). La banda relativa a HELP-R è stata recuperata da gel e inserita operativamente nel vettore intermedio pSV015 a valle del promotore GluB4 e a monte del terminatore NOS. La clonazione del vettore pSV015/HELP-R è stata eseguita in *E. coli*, inserendo il plasmide mediante metodo del calcio cloruro.

La verifica dell'avvenuto inserimento del gene HELP-R è stata effettuata mediante digestione enzimatica del DNA plasmidico con *Xba* I e *Sac* I ed elettroforesi in gel di agarosio (Fig. 3.5 a,b).



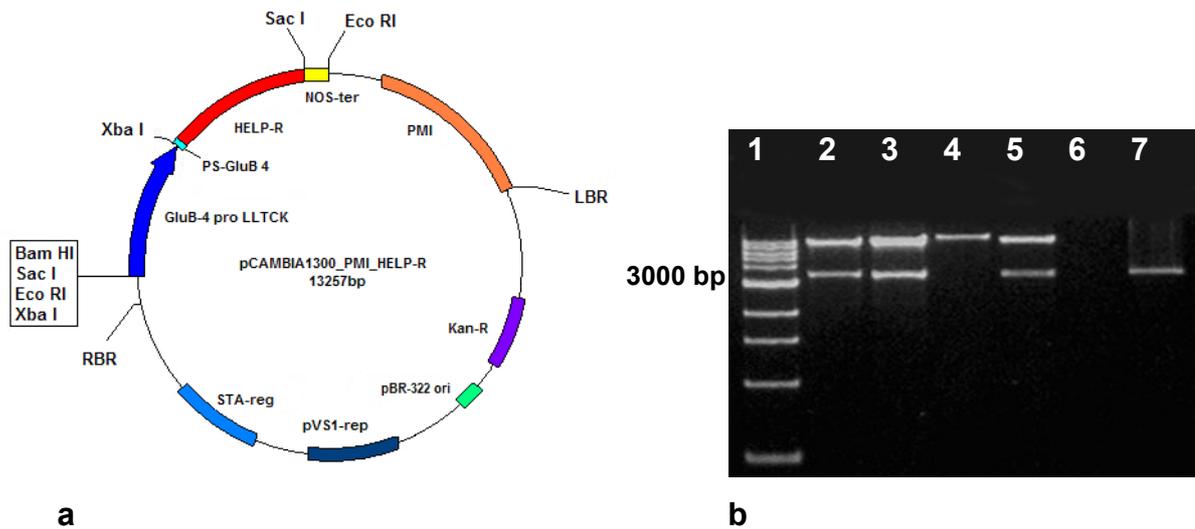
**Fig. 3.5 a)** Mappa del vettore pSV015/HELP-R; **b)** Elettroforesi in gel di agarosio all'1% dei prodotti di digestione enzimatica del vettore pSV015/HELP-R. Ordine di carico: 1) marker 1 kb (Promega); 2,3,4) pSV015/HELP-R digerito con *Xba* I e *Sac* I; 5) recupero da gel di HELP-R ottenuto dalla digestione di pMK/HELP-R con *Xba* I e *Sac* I.

Il costrutto costituito da promotore GluB4, gene HELP-R e terminatore NOS (ca. 3400 bp) è stato separato dal resto del vettore mediante digestione enzimatica con *Eco*R I (Fig. 3.5 a) e corsa elettroforetica in gel di agarosio (Fig. 3.6) al fine di poter recuperare la banda d'interesse.



**Fig. 3.6** Elettroforesi in gel di agarosio all'1% dei prodotti di digestione enzimatica del vettore pSV015/HELP-R. Ordine di carico: 1) marker 1 kb (NEB); 2) pSV015/HELP-R digerito con *Eco*R I.

A seguito di recupero da gel, il costrutto è stato inserito in pCAMBIA1300/PMI, ovvero nel vettore binario di espressione utilizzato per la trasformazione di riso. La verifica del corretto orientamento all'interno del vettore definitivo è stata eseguita digerendo separatamente pCAMBIA1300/PMI/HELP-R con *EcoR* I e *Sac* I (Fig. 3.7 a,b).



**Fig. 3.7 a)** Mappa del vettore pCAMBIA1300/PMI/HELP-R; **b)** Elettroforesi in gel di agarosio all'1% per la verifica del corretto orientamento di HELP-R in pCAMBIA1300/PMI. Ordine di carico: 1) marker 1 kb (NEB); 2,3) pCAMBIA1300/PMI/HELP-R digerito con *EcoR* I; 4,5) pCAMBIA1300/PMI/HELP-R digerito con *Sac* I; 7) *GluB4pro/HELP-R/NOS ter*.

Digerendo il plasmide pCAMBIA1300/PMI/HELP-R con *EcoR* I, si generano due frammenti corrispondenti al vettore linearizzato e al costrutto inserito. Utilizzando *Sac* I, l'ampiezza dei frammenti plasmidici generati da digestione dipende dall'orientamento assunto dal costrutto al momento della saldatura in vettore; in particolare, se il costrutto presenta il medesimo orientamento della cassetta PMI (fatto in sé desiderabile per evitare interferenze tra promotori), è attesa una banda lunga ca. 3400 bp, nell'eventualità contraria, dovrebbe comparire una banda di lunghezza quasi corrispondente all'intero vettore (i due siti *Sac* I risultano in questa ipotesi vicinissimi tra loro). Come si può notare in Fig. 3.7, il campione caricato in quinta corsia presenta l'orientamento prescelto.

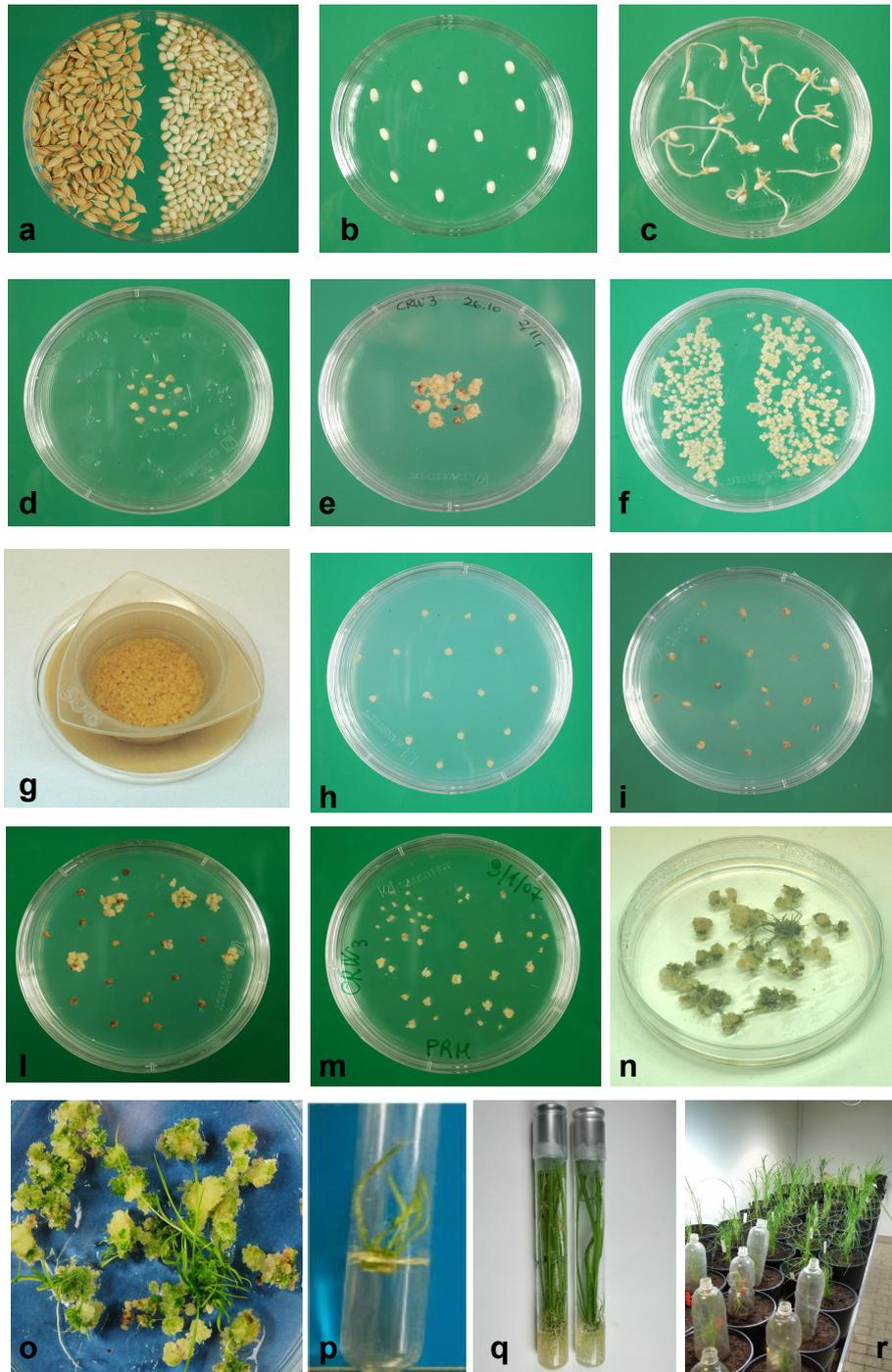
Al termine delle operazioni di clonazione è stato ritenuto necessario sequenziare nuovamente il gene HELP-R, al fine di escludere possibili mutazioni occorse durante le fasi di escissione dal vettore originale, manipolazione e sub-clonazione.

Appurata l'assenza di mutazioni nucleotidiche, il vettore di espressione pCAMBIA1300/PMI/HELP-R è stato introdotto mediante elettroporazione in *A. tumefaciens* ceppo EHA 105.

La verifica dell'avvenuta trasformazione di *A. tumefaciens* è stata effettuata mediante PCR, utilizzando i primer HELP-R1\_for e HELP-R1\_rev interni alla sequenza codificante il biopolimero.

### **3.3 TRASFORMAZIONE DI *Oryza sativa***

La procedura di trasformazione del riso (*O. sativa*, varietà CR W3) con cellule di *A. tumefaciens* portanti i costrutti di interesse si è svolta senza inconvenienti e secondo i tempi e modi previsti dal protocollo di riferimento. Di seguito vengono riportate alcune immagini fotografiche rappresentative dei punti fondamentali del processo di trasformazione genetica (Fig. 3.8).



**Fig. 3.8** Tavola raffigurante le principali fasi di trasformazione del riso. **a)** sbramatura dei semi; **b)** disinfezione; **c)** germinazione; **d)** isolamento scutelli; **e)** callogenesi; **f)** selezione embrioidi; **g)** infezione con coltura liquida di agrobatterio; **h)** embrioidi su substrato CCM dopo infezione; **i)** embrioidi trasformati e non trasformati su substrato SMI; **l)** calli da embrioidi trasformati su substrato SMII; **m)** calli trasformati su substrato PRM; **n)** rigenerazione; **o)** differenziazione germogli; **p)** radicazione; **q)** piantine di riso rigenerate in tubi; **r)** piante di riso putativamente trasformate trasferite in terriccio (fase di indurimento dei tessuti).

Dalla rigenerazione in vitro sono state ottenute 153 piante putativamente trasformate.

Per quanto riguarda la coltivazione in terriccio, preliminarmente al trapianto delle piantine rigenerate, sono state effettuate prove di confronto tra tre diverse tipologie di substrato a base di torba bionda di sfagno macinata con granulometria media (ALCE, Agrochimica). In tutti i casi il pH dei substrati è stato corretto a pH 6 con  $\text{CaCO}_3$ . Inoltre, i substrati sono stati concimati aggiungendo due concimi complessi, uno a lenta cessione 14-3.9-12.5-1.2 Mg +TE (Plantacote, Horticulture group) e uno a rapida cessione (PG MIX).

In tabella 3.2 è riportata la composizione delle diverse tipologie di terriccio.

<b>SUBSTRATO 1</b>	<b>SUBSTRATO 2</b>	<b>SUBSTRATO 3</b>
50% TORBA Bionda Media	70% TORBA Bionda Media	TORBA Bionda Media
50% VERMICULITE Media	30% VERMICULITE Media	BENTONITE 50 $\text{Kg/m}^3$
1 $\text{Kg/m}^3$ PG MIX	1 $\text{Kg/m}^3$ PG MIX	1 $\text{Kg/m}^3$ PG MIX
1 $\text{Kg/m}^3$ plantacote	1 $\text{Kg/m}^3$ plantacote	1 $\text{Kg/m}^3$ plantacote

**Tab. 3.2** *Composizione dei terricci posti a confronto.*

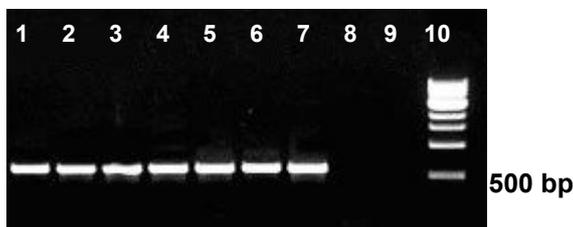
Per valutare la risposta ottenibile con i tre substrati, è stato svolto un ciclo di coltivazione di riso (var. CR W3) e osservato il comportamento delle piante fino a maturazione. Le piante più rigogliose e produttive sono state ottenute con il substrato 3, il quale è stato adottato per le coltivazioni successive.

### **3.4 ANALISI MOLECOLARI SUI TRASFORMATI PRIMARI**

La procedura di estrazione automatica da foglia con lo strumento MAXWELL ha permesso di ottenere una quantità e una qualità del DNA compatibili con le successive analisi molecolari. L'estrazione è stata eseguita da foglie molto giovani per mantenere un elevato rapporto DNA/biomassa.

### 3.4.1 AMPLIFICAZIONE CON PRIMER UNIVERSALI

Su un campione di 20 trasformati primari, è stato eseguito un controllo di amplificabilità del DNA totale con i primer CPC e CPD (Fig. 3.9).



**Fig. 3.9** Elettroforesi in gel di agarosio all'1% del DNA amplificato con i primer universali CPC-CPD; Ordine di carico: 1-6) piante putativamente trasformate di riso; 7) controllo positivo; 8) controllo negativo; 9) acqua; 10) Ladder 1 kb (NEB).

L'amplificazione di controllo ha dato esito positivo in tutti i campioni analizzati.

### 3.4.2 VERIFICA DELLA TRASFORMAZIONE DELLE PIANTE DI RISO

Per accertare l'avvenuta trasformazione delle piante di riso rigenerate su substrato selettivo, sono stati utilizzati i primer 35-S\_for e 35-S\_rev, disegnati sul promotore CaMV35S del gene marcatore selezionabile PMI (fosfomannosio isomerasi) per ottenere un amplificato di 396 bp.

La PCR di controllo condotta su un campione di 20 piante ha dato quasi sempre esito positivo (Fig. 3.10).

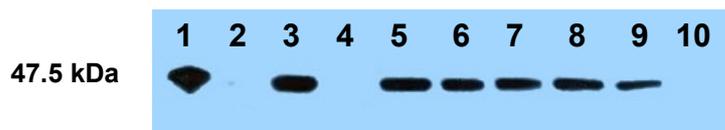


**Fig. 3.10** Elettroforesi in gel di agarosio all'1%. Ordine di carico: 1-5) amplificati con primer 35-S\_for e 35-S\_rev; 6) controllo positivo (DNA plasmidico); 7) controllo negativo (DNA di riso CR W3 non trasformato); 8) acqua; 9) Ladder 100 bp (Promega).

### 3.5 SELEZIONE DEI TRASFORMATI PRIMARI

Su un totale di 153 trasformati primari, 130 hanno fornito un quantitativo di seme sufficiente a condurre analisi sul contenuto di HELP-R. La selezione dei trasformati primari è stata effettuata mediante metodo immunologico (Western blot) ed è stata effettuata in tre fasi. In ogni saggio Western blot è stato utilizzato un controllo positivo rappresentato da HELP-E e un controllo negativo rappresentato da un estratto proteico da farina di riso CR W3 non trasformato.

La selezione è avvenuta visivamente confrontando i segnali entro ciascuna lastra e trattenendo solo i campioni caratterizzati da risposta intensa (un esempio di lastra è riportato in Fig. 3.11). Tali campioni sono stati confrontati tra loro in due tornate di selezione successive effettuando sempre la comparazione dei segnali entro singole lastre.



**Fig. 3.11** *Western blot (GenWay) relativo alla prima fase di selezione dei trasformati primari. Ordine di carico: 1) HELP-E 4  $\mu$ g; 2-9) estratti proteici di riso HELP-R (25  $\mu$ g); 10) CR W3 non trasformato.*

Al termine dell'attività di selezione sono state individuate tre piante *elite* corrispondenti alle linee HR-85, HR-103 e HR-104, per le quali è stata intrapresa la coltivazione delle rispettive progenie.

### 3.6 MESSA A PUNTO DEL SAGGIO DAS-ELISA

Pur avendo fatto ricorso a una ditta specializzata esterna per la produzione e la purificazione di anticorpi anti-HELP, l'anticorpo coniugato (HRP-anti-HELP) non ha mai dato risultati soddisfacenti. Sono state quindi analizzate diverse combinazioni di sandwich utilizzando i due anticorpi commerciali disponibili, uno prodotto dalla ditta GenWay (18-783-77566 Anti Human Beta Elastin) l'altro da Sigma (E4013 Clone

BA-4) e, rispettivamente, anti-rabbit HRP (A-6154, Sigma) e anti-mouse HRP (Sigma) per completare il sandwich.

Come controllo positivo è stato impiegato HELP-E purificato (1 ng/uL), gentilmente fornito dalla dott.ssa Bandiera (Università degli Studi di Trieste), così come un estratto ottenuto dal trasformato primario HR-85, in quanto migliore espressore all'analisi Western blot. Come controllo negativo è stato utilizzato un estratto proteico di CR W3 non trasformata, anche allo scopo di rilevare la presenza di proteine endogene cross-reattive e quindi di falsi positivi.

In Tabella 3.3, sono elencate le diverse combinazioni utilizzate.

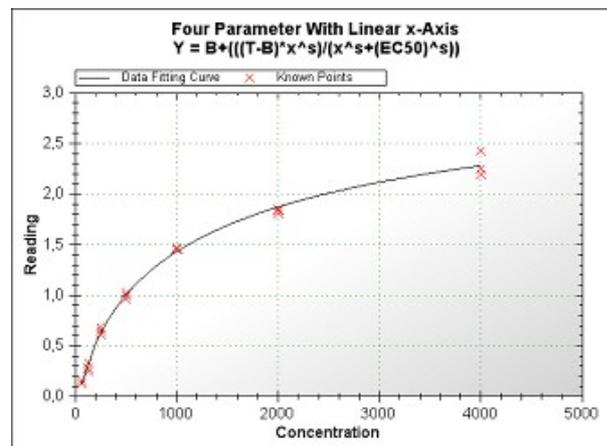
	COATING	DETECTION	SECONDARIO	SEGNALE
1	100 ng/well, rabbit anti-HELP (Davids Biotechnologie)	HRP-rabbit-anti-HELP (1:100 Davids)		no
2	100 ng/well, rabbit anti-HELP (Davids Biotechnologie)	mouse-anti-Elastina (1:500, Sigma)	anti-mouse HRP (1:500)	no
3	100 ng/well mouse-anti-Elastina (Sigma)	rabbit-anti-HELP (1:100 Davids)	anti-rabbit HRP (1:500)	si
4	100 ng/well mouse-anti-Elastina (Sigma)	rabbit-anti-Elastina (1:100, GenWay)	anti-rabbit HRP (1:500)	no
5	100 ng/well rabbit-anti-Elastina (GenWay)	HRP-rabbit-anti-HELP (1:100 Davids)		no
6	101 ng/well rabbit-anti-Elastina (GenWay)	mouse-anti-Elastina (1:500, Sigma)	anti-mouse HRP (1:500)	no

**Tab. 3.3** *Diverse combinazioni di anticorpi saggiate durante la fase di messa a punto del saggio ELISA.*

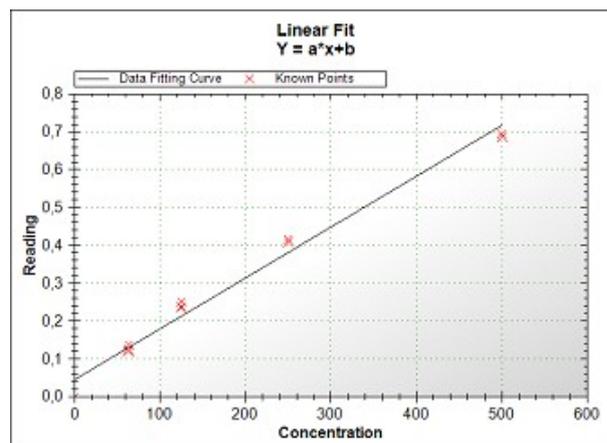
La seguente combinazione: *coating* con mouse-anti-Elastina (100 ng/well, Sigma) e *detection* con anti-HELP (1:100, Davids Biotechnologie) e anti-Rabbit-HRP (1:500 Sigma) ha fornito un chiaro segnale nel controllo positivo (elastina purificata da *E. coli*) e nella pianta trasformata (HR-85) mentre nessuna positività è stata rilevata nell'estratto proteico di CR W3.

Dopo aver individuato la combinazione di anticorpi in grado di evidenziare specificamente la presenza di HELP in estratti proteici crudi, sono state ottimizzate le condizioni di saggio ELISA valutando le condizioni idonee alla costruzione di una curva di calibratura. Da questo studio è emerso che i valori di assorbanza relativi a concentrazioni di HELP uguali a 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 63 pg/ $\mu$ L si

distribuiscono secondo l'andamento tipico delle reazioni enzimatiche descritto da Michaelis Menten (Fig. 3.12) e che fino a concentrazioni di 500 pg/ $\mu$ L la risposta è di tipo lineare (Fig. 3.13). A titolo cautelativo, la retta di taratura è stata determinata in ogni esperimento effettuato al fine di una valutazione dei trasformati primari. Poiché il saggio ELISA è una tecnica quantitativa, esso è stato utilizzato anche per mettere a punto le condizioni di estrazione e purificazione parziale mediante transizione di fase.



**Fig. 3.12** *Relazione di Michaelis Menten su HELP-E.*



**Fig. 3.13** *Retta di taratura per saggio ELISA.*

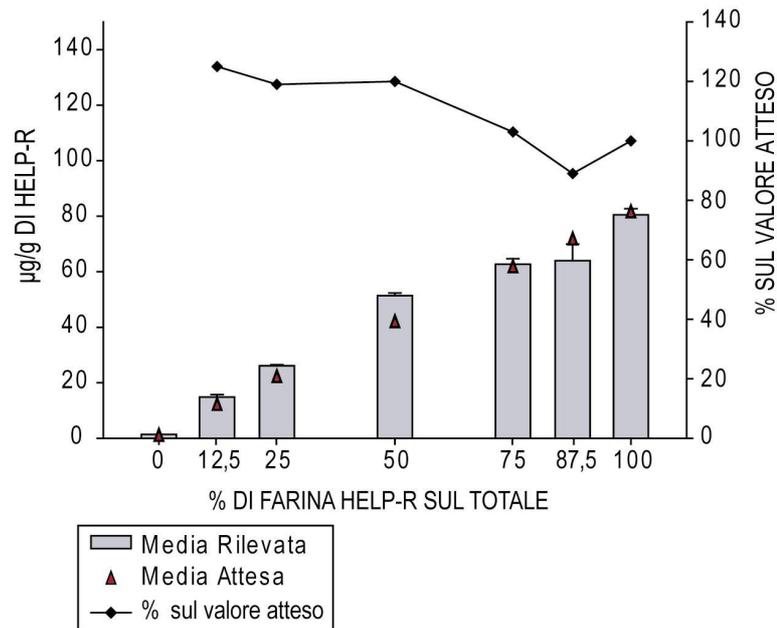
### 3.6.1 VALIDAZIONE DEL SAGGIO ELISA

La validazione finale del saggio ELISA è stata effettuata mescolando quantitativi crescenti di farina HELP-R con farina CR W3 (varietà non trasformata). In Tabella 3.4, sono riportati i risultati relativi alla quantità di HELP-R rilevato e lo scarto percentuale rispetto al valore atteso. Il dato atteso è stato normalizzato rispetto al controllo che pure presenta un minimo rumore di fondo.

mg HELP-R in 300mg totali	Medie rilevate HELP ( $\mu\text{g/g}$ )	Medie attese HELP ( $\mu\text{g/g}$ )	% scarto
CONT-300mg	1.36		
HELP-R-37mg	14.86	11.12	+25%
HELP-R-75mg	26.10	21.15	+19%
HELP-R-150mg	51.39	40.93	+20%
HELP-R-225mg	62.67	60.72	+3%
HELP-R-263mg	63.99	70.74	-11%
HELP-R-300mg	80.50	80.50	0%

**Tab. 3.4** *Concentrazione di HELP-R rilevata in ELISA in campioni ottenuti da una diversa mescolanza di farina HELP-R e farina di controllo (CONT).*

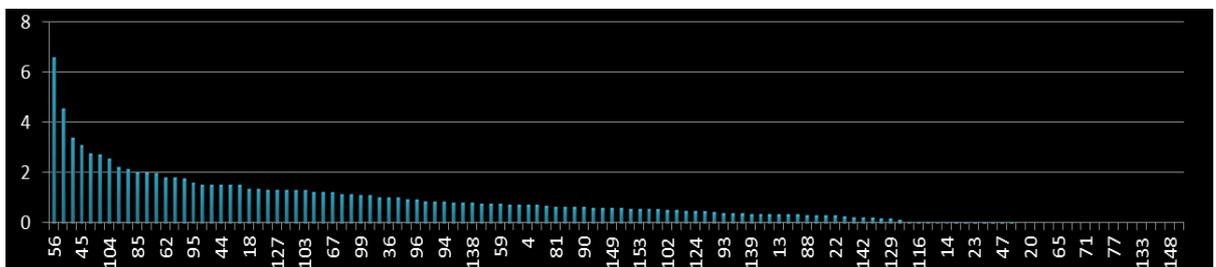
Come si può vedere in Tabella 3.4 e in Figura 3.14 (dove sono posti in grafico anche i risultati dell'analisi statistica), esiste nel complesso una buona corrispondenza tra valori osservati e attesi di HELP-R; si nota tuttavia che in presenza di quantitativi ridotti del polimero nella farina, il saggio ELISA tende a sovrastimare le quantità effettivamente presenti, mentre per concentrazioni di HELP-R uguali o superiori a 60  $\mu\text{g/g}$  l'intervallo d'errore rimane entro il  $\pm 15\%$ . Questo esperimento ha dunque indicato che, per quanto l'esatta quantità di HELP-R non sia sempre facilmente determinabile, è possibile utilizzare il saggio ELISA per lo screening rapido dei migliori trasformati primari e delle loro progenie.



**Fig. 3.14** *Relazione tra valori attesi e osservati nella concentrazione di HELP-R all'interno di miscele di farine a composizione mista e andamento dello scarto rispetto al valore atteso. Le barre indicano le medie dei valori più l'errore standard.*

### 3.7 SELEZIONE DEI TRASFORMATI PRIMARI MEDIANTE ELISA

Gli estratti proteici utilizzati per selezionare i trasformati primari mediante Western blot, sono stati analizzati in ELISA al fine di provvedere a una migliore classifica degli stessi e a confermare almeno parzialmente il buon posizionamento delle linee precedentemente selezionate (Fig. 3.15).



**Fig. 3.15** *Classifica dei trasformati primari ottenuta con saggio ELISA. I valori in ordinata corrispondono a ng/µL.*

I risultati ottenuti hanno dimostrato che le analisi Western blot non hanno permesso di individuare il migliore espressore e che molte piante di valore sono state in realtà escluse già nelle prime due fasi di selezione. Va detto tuttavia che due linee selezionate in Western blot (HR-104 e HR-85) sono comunque entrate nella classifica dei primi dieci individui stilata in base al dato ELISA. Questo confronto tra classifiche mette in evidenza i limiti dell'analisi Western blot (peraltro attesi in considerazione del suo carattere semi-quantitativo) nella selezione dei trasformati primari; rileva comunque l'utilità di questa tecnica nel fornire indicazioni di base su cui costruire sistemi di indagine più rapidi e sofisticati.

### 3.8 SCELTA DEL TAMPONE DI ESTRAZIONE

I campioni ottenuti nelle prove di estrazione condotte con 8 diversi tamponi sono stati analizzati mediante saggio ELISA; i risultati del saggio sono riportati in Tabella 3.5.

TAMPONE	pH e forza ionica	µg/g di HELP-R	P <0.0001
Na <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> 20mM	pH10 0M NaCl	71.2	A
Tris-HCl 100mM	pH8 250mM NaCl	57.1	AB
Tris-HCl 100mM	pH8 0M NaCl	56.5	B
Tris-HCl 100mM	pH8 500mM NaCl	54.4	B
Na <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> 20mM	pH10 250mM NaCl	52.6	B
Na <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> 20mM	pH10 500mM NaCl	49.7	B
L-Istidina 20mM	pH5 250mM NaCl	37.8	C
L-Istidina 20mM	pH5 500mM NaCl	33.3	C

**Tab. 3.5** Risultati delle prove di estrazione condotte con diversi tamponi di estrazione.

La tabella mette in evidenza che il tampone Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> 20 mM pH 10 senza NaCl consente l'estrazione di un maggiore quantitativo di HELP-R rispetto a tutti gli altri. Si nota, inoltre, come utilizzando tamponi a pH acido si estraggano quantitativi di

HELP-R significativamente inferiori rispetto ai tamponi basici. È stato pertanto scelto il tampone Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> 20 mM pH 10 per le successive analisi.

### 3.9 ANDAMENTO DELL' ESTRAZIONE NEL TEMPO

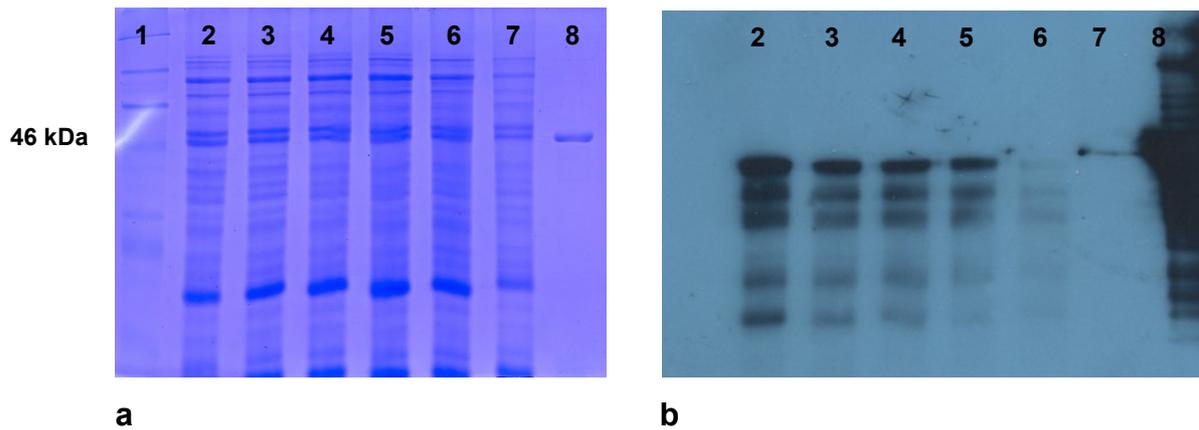
Per verificare l'efficienza di estrazione di HELP-R in farina di riso è stato effettuato un esperimento prelevando a intervalli regolari un'aliquota di estratto il quale è stato analizzato in ELISA. Gli intervalli considerati sono stati: 1, 2, 4, 8 e 24 ore. I quantitativi estratti, espressi in µg di HELP-R per g di farina, sono riportati in Tabella 3.6.

TEMPO (h)	µg/g HELP-R estratti	P <0.0002
1	67.7	C
2	81.4	B
4	85.6	AB
8	102.2	A
24	72.3	BC

**Tab. 3.6** *Andamento dell'estrazione di HELP-R nel tempo.*

Come si può notare, è stato osservato un aumento significativo della quantità di HELP-R estratta nelle prime 8 ore mentre a 24 ore è stato registrato un calo di resa percentualmente rilevante che ha ulteriormente suggerito l'opportunità di una visualizzazione in SDS-PAGE dell'estratto proteico e di una verifica della qualità della proteina di interesse mediante Western blot. I risultati relativi a queste indagini sono mostrati in Figura 3.16 (a,b).

In questo caso, per l'analisi Western blot, è stato utilizzato lo stesso anticorpo utilizzato nei saggi ELISA, vale a dire l'anticorpo prodotto da Davids Biotechnologie utilizzando come antigene HELP-E. La decisione di sostituire l'anticorpo commerciale GenWay è scaturita dalla ripetuta osservazione di segnali aspecifici prodotti da proteine naturalmente presenti nel seme di riso.



**Fig. 3.16** SDS-PAGE (a) e corrispondente analisi Western blot (Davids Biotechnologie) (b) condotta su estratti proteici ottenuti a diversi tempi di incubazione. Ordine di carico: 1) MW marker; 2-6) estratti proteici ottenuti rispettivamente dopo 1, 2, 4, 8 e 24 ore di incubazione in tampone (volume di carico:  $4.5\mu\text{L}$  per campione); 7) estratto proteico da semi CR W3 non trasformati ( $30\mu\text{g}$ ); 8) HELP-E ( $4\mu\text{g}$ ).

L' SDS-PAGE ha posto in evidenza come, all'aumentare del tempo di estrazione, aumenti (per quanto non proporzionalmente) la quantità di proteina totale estratta. Osservando il corrispondente Western blot, si è constatato al contrario un decremento di HELP-R nel tempo, in apparente contraddizione con quanto precedentemente rilevato in ELISA. Questi risultati sono stati interpretati come indice di un mascheramento da parte di altre proteine nei confronti di HELP-R o, alternativamente, dalla degradazione di HELP-R in frammenti di piccole dimensioni riconoscibili comunque dall'anticorpo ma scarsamente evidenziabili dopo separazione elettroforetica standard. In questo studio, si è potuto anche osservare che, a differenza dell'anticorpo GenWay utilizzato in precedenza, l'anti-HELP-E prodotto da Davids Biotechnologie sia molto più sensibile verso il controllo positivo HELP-E e verso HELP-R, dove si osservano una serie di bande discrete, derivanti probabilmente dal distacco di uno o più monomeri dalla proteina.

### 3.10 SELEZIONE DELLA PROGENIE T<sub>2</sub>

Per ciascuna delle progenie selezionate HR-85, HR-103, HR-104 sono state coltivate circa 80 piante T<sub>2</sub>.

Sulla base del saggio ELISA è stato possibile stilare una prima classifica di tali piante. I 20 migliori individui, per ciascuna delle tre linee, sono stati sottoposti a un ulteriore ciclo di selezione. Di seguito sono riportate le medie dei valori di assorbanza relativi a tre repliche costituite da estratti proteici ottenuti da un campione di 40 semi. Grazie alla presenza di un controllo interno a ciascuna piastra, è stato possibile normalizzare i dati in maniera tale da poterli confrontare. Le assorbanze sono state elaborate statisticamente mediante il test di Tukey-Kramer e i dati relativi alla significatività delle differenze sono riportati nelle Tabelle 3.7, 3.8 e 3.9.

<b>PROGENIE 104</b>	<b>abs 450 nm</b>	<b>P &lt;0.0008</b>
<b>HR104-22</b>	0.978	<b>A</b>
<b>HR104-68</b>	0.958	<b>AB</b>
<b>HR104-61</b>	0.890	<b>AB</b>
<b>HR104-82</b>	0.753	<b>AC</b>
<b>HR104-59</b>	0.707	<b>AC</b>
<b>HR104-54</b>	0.683	<b>AC</b>
<b>HR104-63</b>	0.670	<b>AC</b>
<b>HR104-73</b>	0.614	<b>AC</b>
<b>HR104-79</b>	0.612	<b>AC</b>
<b>HR104-87</b>	0.611	<b>AC</b>
<b>HR104-40</b>	0.582	<b>AC</b>
<b>HR104-57</b>	0.516	<b>AC</b>
<b>HR104-43</b>	0.503	<b>AC</b>
<b>HR104-36</b>	0.491	<b>AC</b>
<b>HR104-41</b>	0.481	<b>AC</b>
<b>HR104-49</b>	0.459	<b>AC</b>
<b>HR104-45</b>	0.419	<b>BC</b>
<b>HR104-35</b>	0.411	<b>BC</b>
<b>HR104-34</b>	0.406	<b>BC</b>
<b>HR104-32</b>	0.335	<b>C</b>

**Tab. 3.7** *Classifica dei 20 migliori individui relativi alla progenie HR-104.*

<b>PROGENIE 103</b>	<b>abs 450 nm</b>	<b>P &lt;0.0001</b>
HR103-25	0.641	A
HR103-33	0.583	AB
HR103-56	0.535	AC
HR103-69	0.491	AD
HR103-6	0.491	AE
HR103-24	0.472	AE
HR103-70	0.445	AF
HR103-79	0.397	AG
HR103-16	0.396	AG
HR103-55	0.393	AG
HR103-85	0.373	AG
HR103-4	0.335	BG
HR103-51	0.312	BG
HR103-12	0.281	CG
HR103-15	0.273	DG
HR103-39	0.273	DG
HR103-66	0.235	EG
HR103-18	0.209	FG
HR103-28	0.197	FG
HR103-32	0.185	G

**Tab. 3.8** *Classifica dei 20 migliori individui relativi alla progenie HR-103.*

<b>PROGENIE 85</b>	<b>abs 450nm</b>	<b>P &lt;0.0001</b>
HR85-72	0.757	A
HR85-12	0.740	AB
HR85-59	0.716	AC
HR85-70	0.643	AD
HR85-21	0.599	AD
HR85-2	0.568	AD
HR85-18	0.557	AE
HR85-41	0.477	AF
HR85-82	0.463	AF
HR85-31	0.458	AF
HR85-69	0.444	BG
HR85-20	0.435	CG
HR85-83	0.411	DG
HR85-42	0.401	DG
HR85-8	0.376	DH
HR85-77	0.287	EH
HR85-40	0.252	FI
HR85-13	0.201	GI
HR85-71	0.144	HI
HR85-53	0.046	I

**Tab. 3.9** *Classifica dei 20 migliori individui relativi alla progenie HR-85.*

Al termine di questa fase di selezione, per ciascuna delle 3 linee sono state trattenute le migliori 4 progenie, le quali sono state poste a confronto tra loro in un'unica piastra ELISA (Tab. 3.10).

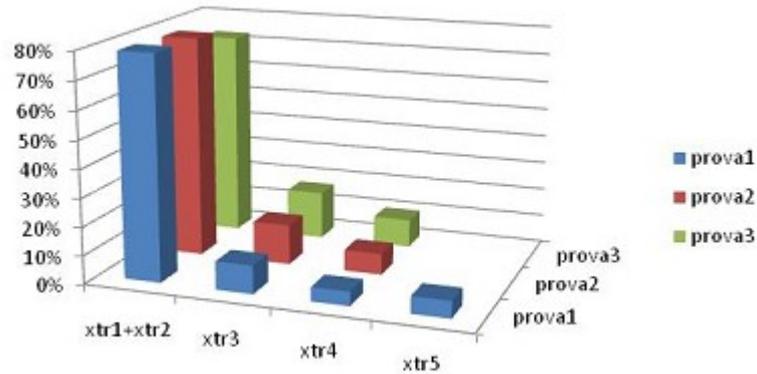
<b>PROGENIE</b>	<b>abs 450 nm</b>	<b>P &lt;0.0002</b>
<b>HR104-68</b>	1.000	<b>A</b>
<b>HR104-22</b>	0.954	<b>AB</b>
<b>HR104-82</b>	0.905	<b>AC</b>
<b>HR104-61</b>	0.806	<b>AC</b>
<b>HR85-72</b>	0.722	<b>AD</b>
<b>HR103-25</b>	0.717	<b>AD</b>
<b>HR85-2</b>	0.708	<b>AD</b>
<b>HR85-59</b>	0.680	<b>AD</b>
<b>HR103-56</b>	0.563	<b>BD</b>
<b>HR103-69</b>	0.555	<b>CD</b>
<b>HR103-33</b>	0.552	<b>CD</b>
<b>HR85-70</b>	0.404	<b>D</b>

**Tab. 3.10** *Classifica congiunta dei 4 migliori espressor per linea.*

La selezione ha permesso di individuare la linea HR104-68, che è stata avanzata alla generazione T<sub>3</sub> in ambiente confinato.

### **3.11 EFFICIENZA DEL PROCESSO DI ESTRAZIONE**

Per l'ottimizzazione del processo di estrazione sono state effettuate cinque estrazioni seriali su un medesimo campione di farina. Il volume di tampone utilizzato è stato in rapporto 1:4 (farina/tampone) nella prima estrazione, 1:3 in quelle successive. La prova, replicata tre volte, ha fornito i risultati illustrati in Figura 3.17.



**Fig. 3.17** Percentuale di HELP-R sul totale ottenuta in 5 estrazioni successive.

Dal grafico si può vedere che il maggior quantitativo di HELP-R (oltre il 70%) è stato ottenuto con le prime due estrazioni. Al terzo passaggio è stato recuperato circa il 10% di HELP-R, mentre ulteriori tentativi di estrazione non sono risultati convenienti secondo una logica di rapporto costo/benefici.

### 3.12 STIMA DELLA RESA DI HELP-R

Il seme derivante dalle venti migliori piante di ciascuna linea (HR-85, HR-103 e HR-104) è stato trebbiato, sbramato, sbiancato e macinato. La stima della resa è stata effettuata in triplicato impiegando 5 g di farina per ciascuna linea e operando tre estrazioni successive con tampone Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> 20 mM pH 10 0.1% Tween. Gli estratti proteici crudi sono stati analizzati mediante ELISA. Di seguito sono riportati i valori medi, espressi in µg di HELP-R per g di farina, relativi alle tre estrazioni (Tab. 3.11). La prova è stata replicata tre volte.

LINEA	µg/g HELP-R	P <0.0004
HR-104	231.27	A
HR-85	181.02	B
HR-103	177.13	B

**Tab. 3.11** Resa di HELP-R delle tre linee.

Dal confronto emerge che la linea HR-104 presenta una differenza significativa rispetto alle altre, producendo circa 230 µg di HELP-R per g di farina.

### 3.13 TRANSIZIONE DI FASE INVERSA DI HELP-R

Una prima prova di transizione di fase inversa di HELP-R è stata condotta quando il metodo ELISA non era ancora stato messo a punto; in questo esperimento, i campioni sono stati quindi analizzati mediante Western blot. L'estratto, dopo essere stato portato a una concentrazione 2 M di NaCl, è stato incubato a 42°C per 15 minuti. Dopo centrifugazione a 40°C, il pellet venutosi a formare è stato risospeso in un volume minimo di tampone per corsa elettroforetica e caricato interamente in gel utilizzando come controllo negativo un estratto derivante da farina CR W3 sottoposto al medesimo trattamento (Fig. 3.18).



**Fig. 3.18** *Western blot (GenWay) relativo al primo esperimento di transizione di fase inversa di HELP-R. Ordine di carico: 1) estratto proteico da farina di riso CR W3 non trasformato; 2) estratto proteico di farina HELP-R; 3-4) surnatante di CR W3 e HELP-R dopo trattamento termico a 42°C e aggiunta di 2 M NaCl; 5-6) pellet caricato in gel dopo risospensione in addensante per SDS-PAGE; 7) HELP-E 4 µg.*

La Figura 3.18 evidenzia che, aumentando la forza ionica e la temperatura, il polipeptide HELP-R, in virtù delle proprie caratteristiche, effettua la transizione di fase coacervando in misura apparentemente efficace. In effetti, si osserva che il surnatante è caratterizzato da una banda molto leggera, a dimostrazione dello scarso contenuto di HELP-R nella frazione ottenuta dopo centrifugazione a caldo.

Dopo aver messo a punto il saggio ELISA, è stato possibile espandere il numero di frazioni e determinarne quantitativamente il contenuto di HELP-R. In particolare, sono state condotte tre prove comparative su un campione di 5 g di farina. Per ogni campione di farina sono state effettuate due estrazioni successive; l'estratto grezzo è stato portato a una concentrazione 2 M di NaCl e posto a 42°C per 5 minuti. Dopo centrifugazione a caldo (42°C), sono stati ottenuti: un surnatante (sur 42°C) e un pellet che è stato risospeso a freddo in tampone 100 mM Tris-HCl e centrifugato a 4°C (1° rsp). Il campione risospeso è stato nuovamente portato a una concentrazione 2 M NaCl e sottoposto a un secondo trattamento termico. Il pellet residuo, ottenuto dopo centrifugazione a freddo, è stato risospeso in tampone PBS-SDS (ppt-sds) per valutare il quantitativo residuo di HELP-R (per i dettagli si veda § 2.16).

Di seguito (Tabella 3.12 a, b, c) sono stati riportati i risultati, espressi in µg di HELP-R, delle diverse frazioni analizzate in ELISA.

PROVA 1		PROVA 2		PROVA 3	
Frazione	µg di HELP	Frazione	µg di HELP	Frazione	µg di HELP
1°estr	249.9	1°estr	266.4	1°estr	299.9
2°estr	124.4	2°estr	116.4	2°estr	121.7
1°sur42°C	53.1	1°sur42°C	56.3	1°sur42°C	64.2
1°rsp	92.0	1°rsp	64.8	1°rsp	110.8
ppt-sds	55.0	ppt-sds	41.8	ppt-sds	69.3
2°sur42°C	2.5	2°sur42°C	1.8	2°sur42°C	2.0
2°rsp	51.4	2°rsp	70.1	2°rsp	109.4

**a**                      **b**                      **c**

**Tab. 3.12** *Transizione di fase inversa su estratti di riso HELP-R; in azzurro sono state evidenziate le frazioni relative ai campioni risospesi.*

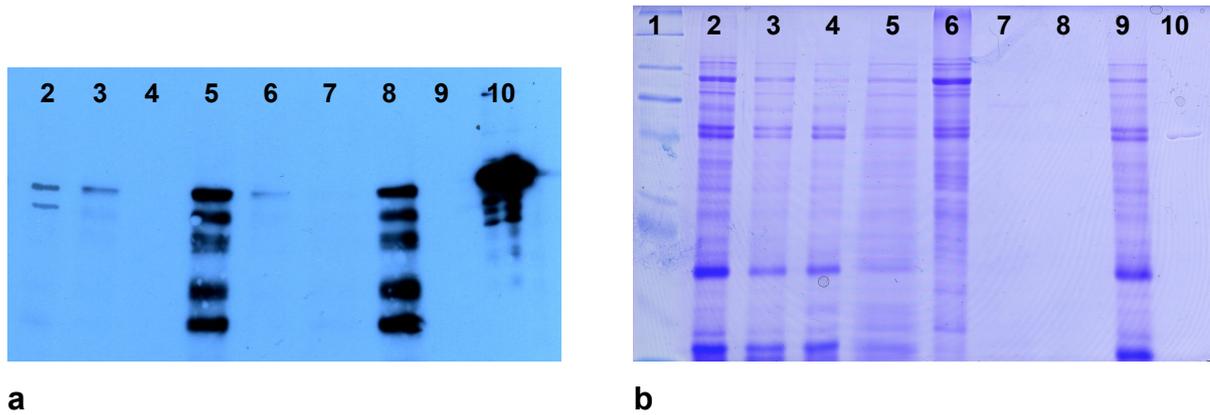
Di seguito (Tab. 3.13) sono riportate le medie delle tre prove.

<b>MEDIA 3 PROVE</b>	
<b>Frazione</b>	<b>µg di HELP</b>
1°estr	272.1
2°estr	120.8
1°sur42°C	57.9
1°rsp	89.2
ppt-sds	55.3
2°sur42°C	2.1
2°rsp	77.0

**Tab. 3.13** *Contenuto medio di HELP-R nelle frazioni raccolte durante gli esperimenti di transizione di fase inversa.*

In azzurro sono state evidenziate le frazioni relative ai campioni risospesi in tampone Tris-HCl dopo centrifugazione a freddo. Come si può notare, la quantità di HELP-R rinvenibile nel primo campione risospeso è molto inferiore a quella attesa, mentre a livello di seconda induzione alla transizione di fase inversa il quantitativo di HELP-R nel risospeso rimane in due casi su tre sostanzialmente invariato.

Tutte le frazioni raccolte durante la terza prova sono state analizzate anche mediante SDS-PAGE e Western blot, utilizzando 30 µg di proteina totale per tutti i campioni, eccetto quelli relativi al surnatante dopo il secondo trattamento termico (2°sur. 42°C) e alla seconda frazione derivante da risospesione in Tris-HCl 10 mM (2°rsp); in questi casi, considerata la scarsità di proteina totale rilevata, si è deciso di analizzare il volume massimo di campione caricabile in gel (40 µL) (Fig. 3.19 a,b).



**Fig. 3.19** Western blot (Davids Biotechnologie)(a) e corrispondente SDS-PAGE (b). Ordine di carico: 1) MW marker; 2) 1°estr; 3) 2°estr; 4) 1°sur 42°C; 5) 1°rsp; 6) ppt-sds; 7) 2°sur42°C; 8) 2°rsp; 9) CN (CR W3); 10) HELP-E (4 µg).

Dalle immagini sopra riportate si può vedere che, pur diminuendo sensibilmente la quantità di proteina contaminante alla prima, ma soprattutto alla seconda risospensione, la quantità di HELP rilevata non diminuisce sostanzialmente, a conferma di quanto determinato con il saggio ELISA.

Andando ad analizzare l' SDS-PAGE, si può notare che, a differenza di quanto rilevato nel saggio Western blot, in nessuna frazione si ha traccia di HELP-R, mentre la presenza di HELP-E viene rilevata in entrambi i casi. Questo è dovuto al fatto che, mentre HELP-E possiede una coda poly-HIS all'N-terminale, HELP-R, oltre a essere più diluito, contiene un numero minore di residui in grado di legare il colorante (in particolare, 16 K su 521 amminoacidi).

### 3.14 CARATTERIZZAZIONE DI HELP-R

Le prove di caratterizzazione sono state condotte prendendo in esame il comportamento di HELP-R a seguito della variazione dei tre principali parametri coinvolti nella transizione di fase del polimero, ovvero temperatura, forza ionica e pH. In tutte le prove è stato quantificato mediante ELISA il contenuto di HELP-R presente dopo la prima risospensione del pellet in Tris-HCl 100 mM (rsp). È stato anche quantificato il contenuto del polipeptide nel surnatante dopo il trattamento

termico (sur) e del pellet residuo risospeso in PBS-Tween-SDS (ppt-sds) (per i dettagli si veda § 2.16).

Un ulteriore esperimento è consistito nel valutare la quantità di HELP-R residua nel surnatante mantenuto a 42°C per tempi diversi.

In tutte le prove è stata effettuata l'analisi della varianza confrontando i diversi trattamenti di ciascuna frazione.

### 3.14.1 TEMPERATURA

Di seguito sono riportati i risultati relativi alla transizione di fase di HELP-R a tre diverse temperature: temperatura ambiente (rt), 37°C e 42°C (Tab. 3.14 a). Sono inoltre riportati i dati relativi alla quantificazione delle proteine totali mediante lettura a 280 nm delle diverse frazioni (Tab. 3.14 b).

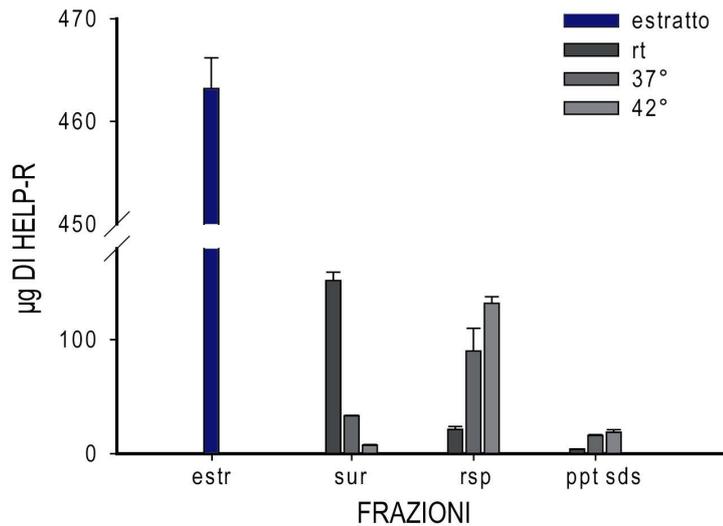
FRAZIONE	µg di HELP-R		P
estr	463.2		
sur rt	151.8	A	<0.0001*
sur 37°C	33.2	B	
sur 42°C	7.5	C	
rsp rt	21.2	B	0.0005*
rsp 37°C	90.1	A	
rsp 42°C	131.8	A	
ppt-sds rt	4.0	B	<0.0001*
ppt-sds 37°C	15.9	A	
ppt-sds 42°C	18.7	A	

**Tab. 3.14 a** *Effetto della temperatura sulla transizione di fase di HELP-R.*

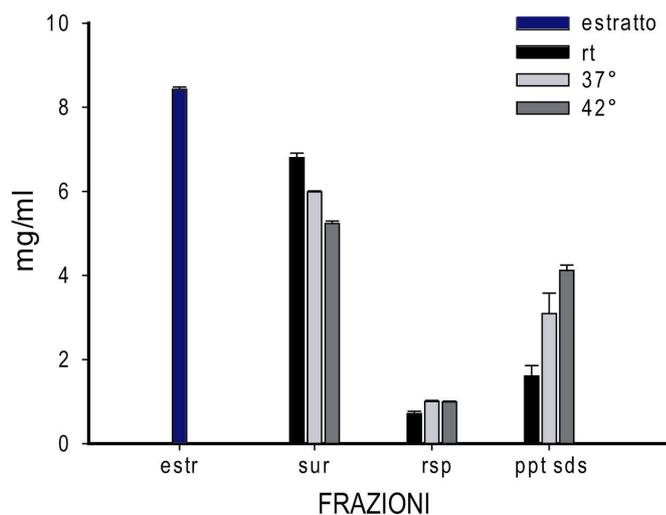
FRAZIONE	Proteina totale (mg/mL)		P
estr	8.4		
sur rt	6.8	A	<0.0001*
sur 37°C	5.9	B	
sur 42°C	5.2	C	
rsp rt	0.7	B	0.0030*
rsp 37°C	1.0	A	
rsp 42°C	0.9	A	
ppt-sds rt	1.6	B	0.0046*
ppt-sds 37°C	3.1	A	
ppt-sds 42°C	4.1	A	

**Tab. 3.14 b** *Andamento delle proteine totali nelle diverse frazioni.*

I risultati sopra indicati sono stati riportati nei grafici 3.20 a e 3.20 b ai fini di una maggiore distinzione tra i diversi andamenti osservati nei campioni in relazione al contenuto proteico totale e al quantitativo di HELP-R.



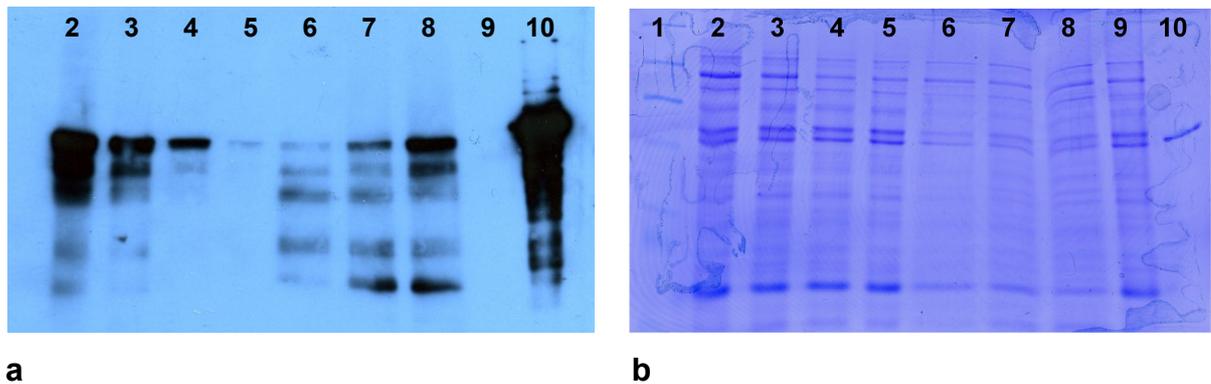
**Fig. 3.20 a** Effetto della temperatura sulla transizione di fase di HELP-R. Le barre indicano le medie dei valori più l'errore standard.



**Fig. 3.20 b** Andamento delle proteina totali nelle diverse frazioni. Le barre indicano le medie dei valori più l'errore standard.

I dati sopra illustrati indicano che, al variare della temperatura cui si fa avvenire la transizione di fase, la tendenza di HELP-R a precipitare è diversa: mantenendo l'estratto a temperatura ambiente dopo l'aggiunta di sale, si ha una minore propensione di HELP-R a precipitare, infatti il maggior contenuto del polimero si ritrova nel surnatante (sur rt). Al contrario, aumentando la temperatura, la quantità di

HELP in soluzione diminuisce. Osservando le frazioni relative ai pellet risospesi in Tris-HCl si nota come, passando da una temperatura ambiente a 37°C o a 42°C il quantitativo di HELP-R aumenti. Questa tendenza è stata confermata analizzando mediante Western blot 30 µg di proteina totale prelevata da tali frazioni (Fig. 3.21 a,b).



**Fig. 3.21** Western blot (Davids Biotechnologie) (a) e corrispondente SDS-PAGE (b). Ordine di carico: 1) MW marker; 2) estratto proteico; 3) sur rt; 4) sur 37°C; 5) sur 42°C; 6) rsp rt; 7) rsp 37°C; 8) rsp 42°C; 9) CN (CR W3); 10) HELP-E (4µg).

L'analisi Western blot ha infatti dimostrato che, a parità di proteina totale analizzata, la quantità di HELP-R presente nei surnatanti diminuisce all'aumentare della temperatura. Viceversa, per quanto riguarda i risospesi, il contenuto di HELP-R aumenta all'aumentare della temperatura a cui sono sottoposti gli estratti.

### 3.14.2 FORZA IONICA

In questa prova di caratterizzazione, all'estratto proteico crudo sono stati aggiunti quantitativi crescenti di NaCl. Le concentrazioni considerate sono: 0 M, 0.5 M, 1 M e 2 M. Di seguito sono riportati i risultati relativi all'analisi ELISA (Tab. 3.15 a) e alla lettura a 280nm (Tab. 3.15 b) delle diverse frazioni.

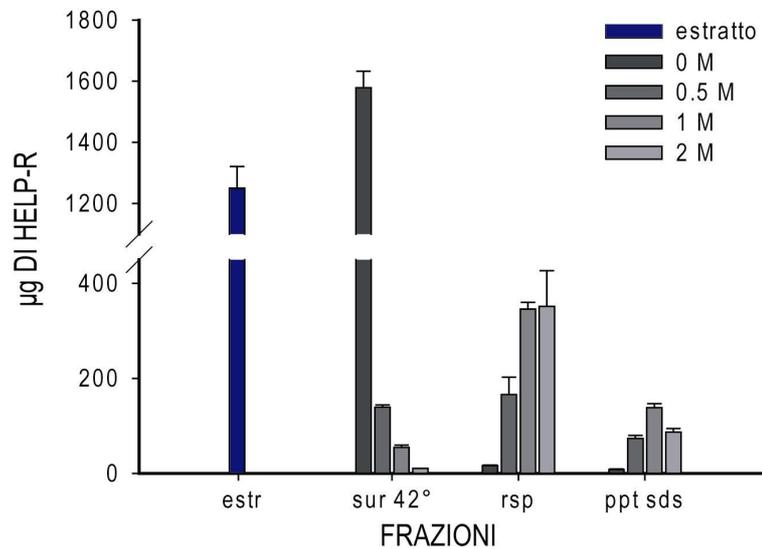
FRAZIONE	µg di HELP-R		P
estr	1250.0	A	<0.0001
sur 42°C 0M	1578.8	A	
sur 42°C 0.5M	139.4	B	
sur 42°C 1M	54.7	C	
sur 42°C 2M	10.3	D	
rsp 0M	16.2	C	<0.0001
rsp 0.5M	165.9	B	
rsp 1M	345.8	A	
rsp 2M	351.5	A	
ppt-sds 0M	8.2	C	<0.0001
ppt-sds 0.5M	73.5	B	
ppt-sds 1M	138.3	A	
ppt-sds 2M	86.9	B	

**Tab. 3.15 a** Effetto della forza ionica sulla transizione di fase di HELP-R.

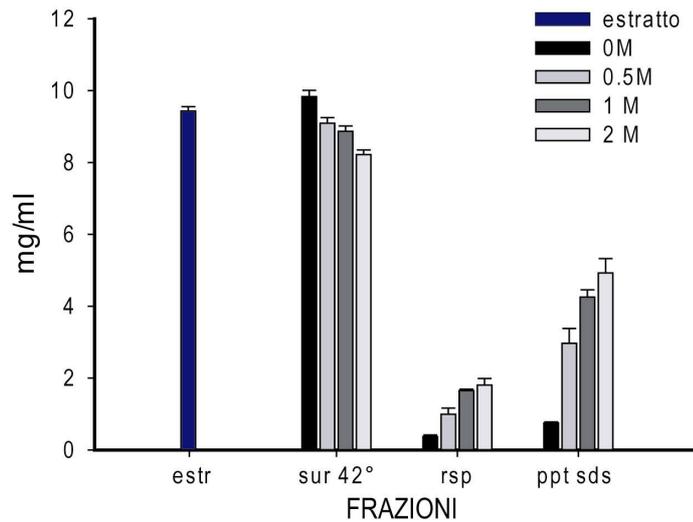
FRAZIONE	Proteina totale (mg/mL)		P
estr	9.4	AB	<0.0002
sur 42°C 0M	9.8	A	
sur 42°C 0.5M	9.1	B	
sur 42°C 1M	8.8	B	
sur 42°C 2M	8.2	C	
rsp 0M	0.3	C	<0.0001
rsp 0.5M	0.9	B	
rsp 1M	1.6	AB	
rsp 2M	1.8	A	
ppt-sds 0M	0.7	C	<0.0001
ppt-sds 0.5M	2.9	B	
ppt-sds 1M	4.2	AB	
ppt-sds 2M	4.9	A	

**Tab. 3.15 b** Andamento delle proteine totali nelle diverse frazioni.

I risultati sopra indicati sono stati riportati nei grafici 3.22 a e 3.22 b ai fini di una maggiore distinzione tra i diversi andamenti osservati nei campioni in relazione al contenuto proteico generale e al quantitativo di HELP-R.



**Fig. 3.22 a** Effetto della forza ionica sulla transizione di fase di HELP-R. Le barre indicano le medie dei valori più l'errore standard.

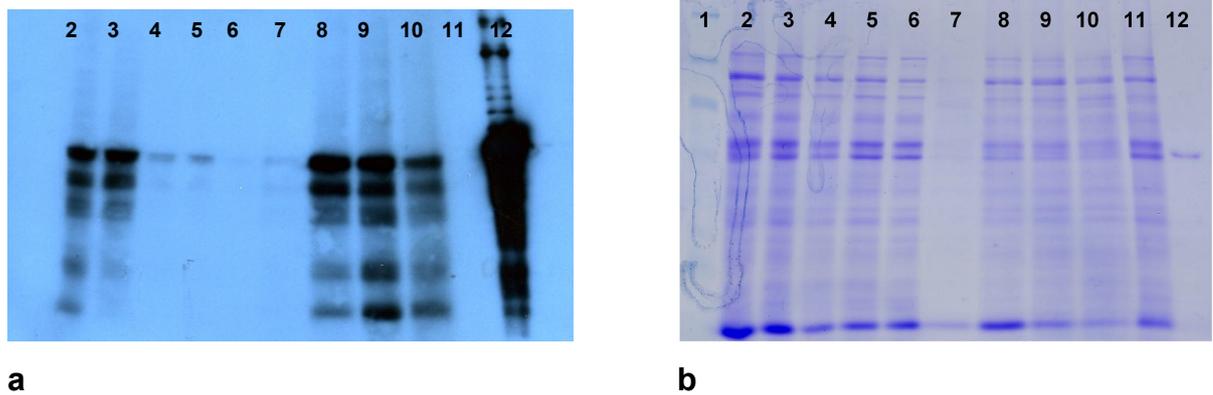


**Fig. 3.22 b** Andamento delle proteine totali nelle diverse frazioni. Le barre indicano le medie dei valori più l'errore standard.

Si può chiaramente notare come la quantità di HELP-R rilevata nel surnatante dopo trattamento termico in assenza di NaCl (sur 42°C 0 M) sia maggiore rispetto alla quantità rilevata nell'estratto crudo (estr): 1578.8 µg contro 1250.1 µg. Osservando la quantità di proteine totali (Tab. 3.15 b) relativa alle medesime frazioni, si nota lo stesso comportamento. Questo risultato può essere dovuto al fatto che, lasciando l'estratto a 42°C anziché alla temperatura del ghiaccio fondente, alcune componenti proteiche siano maggiormente rilevabili all'analisi spettrofotometrica a causa di uno stato conformazionale diverso o, più verosimilmente, a motivo delle diminuite interazioni con sostanze amidacee o altre proteine presenti nell'estratto.

Qualora nell'estratto crudo la forza ionicasia aumentata attraverso l'aggiunta di NaCl, si osserva dopo trattamento termico una netta diminuzione di HELP-R. Analizzando i vari pellet risospesi in Tris-HCl, è stato osservato che il quantitativo di HELP-R è trascurabile nel precipitato ottenuto in assenza di sale, mentre aumenta sensibilmente a 0.5 M NaCl. Un ulteriore aumento significativo si nota passando da 0.5 M a 1 M NaCl, mentre tra 1 M e 2 M non si apprezzano differenze significative.

Di seguito sono riportati i risultati riguardanti l'analisi mediante Western blot di 30 µg di proteina totale prelevata dalle frazioni relative ai surnatanti dopo trattamento termico e ai corrispondenti campioni risospesi, (Fig. 3.23 a,b).



**Fig. 3.23** Western blot (Davids Biotechnologie) (a) e corrispondente SDS-PAGE (b). Ordine di carico: 1) MW marker; 2) estratto proteico; 3) sur 42°C 0 M; 4) sur 42°C 0.5 M; 5) sur 42°C 1 M; 6) sur 42°C 2 M; 7) rsp 0 M; 8) rsp 0.5 M; 9) rsp 1 M; 10) rsp 2 M; 11) CN (CRW3); 12) HELP-E (4 $\mu$ g).

Questi esperimenti confermano l'evidenza raccolta con saggio ELISA , ovvero una diminuzione di HELP-R nei surnatanti all'aumentare della forza ionica a cui corrisponde un recupero della proteina nei campioni ottenuti tramite risospensione. Osservando il comportamento delle proteine totali (Fig. 3.23 b), si nota come il campione n°7, ovvero la frazione relativa al precipitato ottenuto in assenza di sale, presenti bande molto lievi, a differenza degli altri campioni. Infatti, nei rimanenti casi l'incremento della forza ionica in combinazione con un innalzamento della temperatura a 42°C ha determinato una precipitazione parziale delle proteine presenti nell'estratto crudo. Tuttavia, tale precipitazione è apparsa decisamente più rilevante nel caso di HELP-R, tanto da suggerire la possibilità di una purificazione selettiva del polimero attraverso ripetuti cicli di transizione.

### 3.14.3 pH

In questo esperimento di caratterizzazione, l'estratto proteico è stato portato a diversi valori di pH (5, 7, 8.5 e 10.5) prima di essere sottoposto a trattamento termico (42°C) in presenza di 2 M NaCl.

Di seguito sono riportati per le varie frazioni i risultati relativi alla quantificazione di HELP-R (saggio ELISA; Tab. 3.16 a, b) e della proteina totale (lettura a 280 nm).

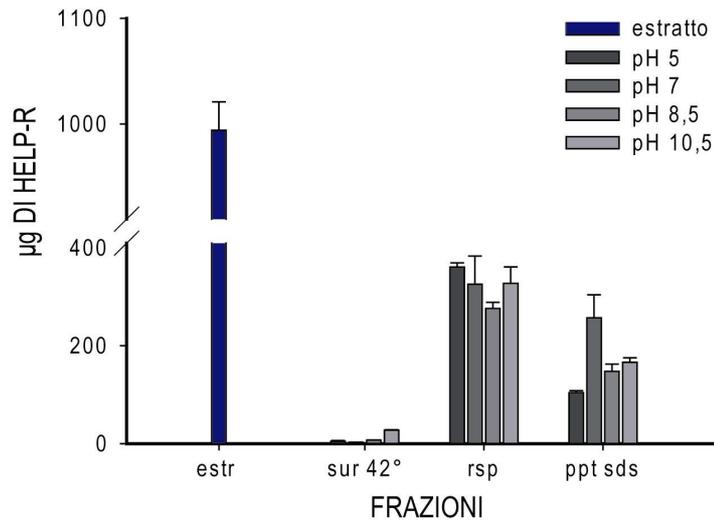
FRAZIONE	µg di HELP-R		P
estr	994.0		
sur 42°C pH 5	4.6	BC	0.0001
sur 42°C pH 7	2.8	C	
sur 42°C pH 8.5	7.2	B	
sur 42°C pH 10.5	27.6	A	
rsp pH 5	360.8	A	
rsp pH 7	325.9	A	
rsp pH 8.5	276.5	A	
rsp pH 10.5	327.6	A	
ppt-sds pH 5	104.2	B	0.0037
ppt-sds pH 7	257.1	A	
ppt-sds pH 8.5	147.8	B	
ppt-sds pH 10.5	166.2	AB	

**Tab. 3.16 a** *Effetto del pH sulla transizione di fase di HELP-R.*

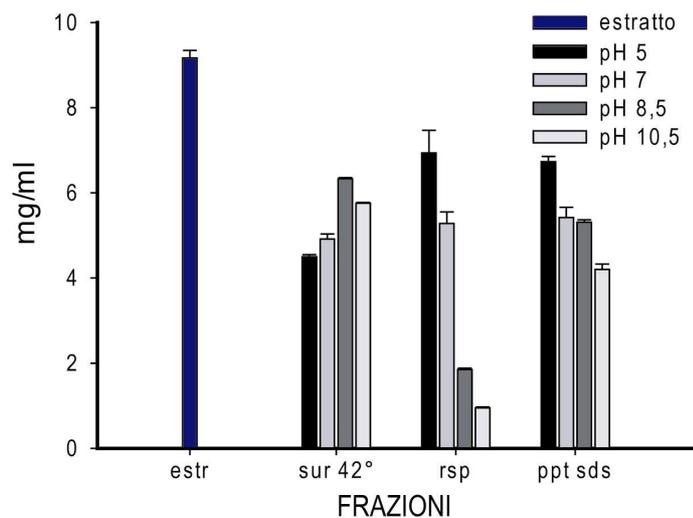
FRAZIONE	Proteina totale (mg/mL)		P
estr	9.1		
sur 42°C pH 5	4.4	D	<0.0001
sur 42°C pH 7	4.9	C	
sur 42°C pH 8.5	6.3	A	
sur 42°C pH 10.5	5.7	B	
rsp pH 5	6.9	A	
rsp pH 7	5.2	B	
rsp pH 8.5	1.8	C	
rsp pH 10.5	0.9	D	
ppt-sds pH 5	6.7	A	<0.0001
ppt-sds pH 7	5.4	B	
ppt-sds pH 8.5	5.3	B	
ppt-sds pH 10.5	4.2	C	

**Tab. 3.16 b** *Andamento delle proteine totali nelle diverse frazioni.*

Tali risultati sono stati riportati nei grafici 3.24 a e 3.24 b ai fini di una maggiore distinzione tra i diversi andamenti osservati nei campioni in relazione al contenuto proteico generale e al quantitativo di HELP-R.



**Fig. 3.24 a** *Effetto del pH sulla transizione di fase di HELP-R. Le barre indicano le medie dei valori più l'errore standard.*

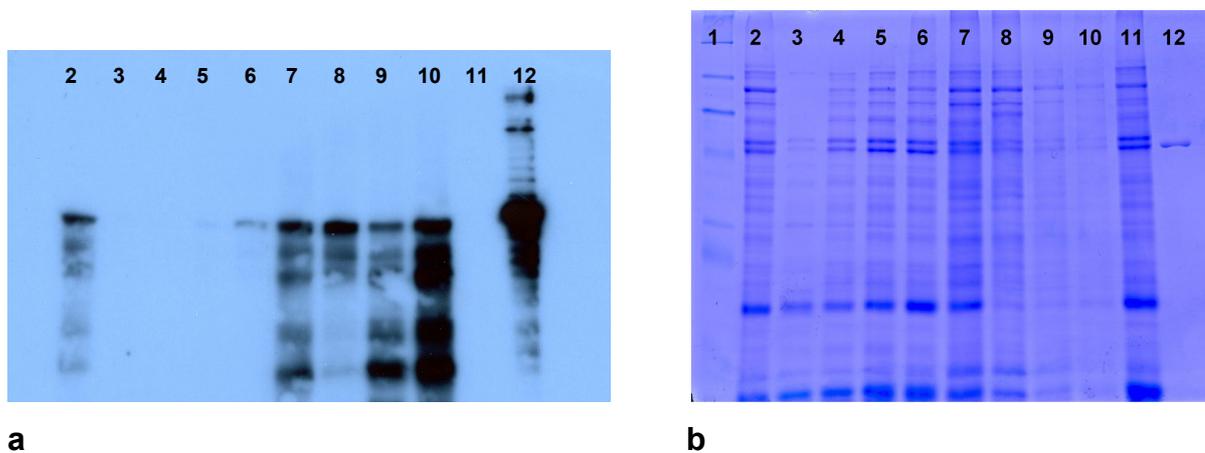


**Fig. 3.24 b** *Andamento delle proteine totali nelle diverse frazioni. Le barre indicano le medie dei valori più l'errore standard.*

Per quanto riguarda i surnatanti dopo trattamento termico (sur 42°C), i quantitativi di HELP-R sono sempre risultati molto bassi. Analizzando le frazioni relative ai risospesi in Tris-HCl, le differenze riscontrate nel quantitativo di HELP-R non sono risultate significative. Al contrario, differenze altamente significative e di notevole

interesse in vista dello sviluppo di un metodo di purificazione selettiva del polimero sono state riscontrate nel contenuto di proteine totali di queste frazioni (Tab. 3.16 b). Si può osservare, infatti, che all'instaurarsi di condizioni di alcalinità o sub-alcalinità è corrisposta un deciso abbattimento delle proteine contaminanti.

Per la conferma di questo fenomeno, le stesse frazioni saggiate in ELISA sono state visualizzate in SDS-PAGE e successivamente analizzate mediante Western blot; in particolare, il confronto è avvenuto utilizzando il medesimo volume di campione per tutti i surnatanti (7  $\mu$ l) e i risospesi (6  $\mu$ l) (Fig. 3.25 a,b).



**Fig. 3.25** *Western blot (Davids Biotechnologie) (a) e corrispondente SDS-PAGE (b).* Ordine di carico: 1) MW marker; 2) estratto proteico; 3) sur 42°C pH5; 4) sur 42°C pH 7; 5) sur 42°C pH 8.5; 6) sur 42°C pH 10.5; 7) rsp pH 5; 8) rsp pH 7; 9) rsp pH 8.5; 10) rsp pH 10.5; 11) CN (CR W3); 12) HELP-E (4  $\mu$ g).

Come si può osservare in figura, in SDS-PAGE appaiono differenze notevoli passando da pH acidi a pH basici. Infatti, aumentando il pH, si può notare un aumento di proteine totali nei surnatanti dopo trattamento termico e, viceversa, una loro diminuzione nelle frazioni relative ai risospesi. Questo dimostrerebbe che la transizione di fase è specifica per HELP prodotto in endosperma di riso a pH basici, mentre a pH acidi tale procedimento non è selettivo per la proteina d'interesse, facendo precipitare in quantità molto più elevate anche proteine di riserva del seme.

### 3.14.4 TEMPO DI PRECIPITAZIONE

Un ultimo esperimento di caratterizzazione è stato impostato considerando il tempo di permanenza dell'estratto a 42°C dopo aggiunta di NaCl.

Di seguito sono riportati i dati relativi ai diversi tempi di permanenza in bagno termostato (5, 15 e 30 min) (Tab. 3.17 a), così come quelli relativi alle misure di assorbanza a 280nm (Tab. 3.17 b).

TEMPO	µg di HELP	P 0.0006*
estr	458.6	
5-min	29.2	A
15-min	13.4	B
30-min	5.3	C

**Tab. 3.17 a** *Influenza del tempo sulla transizione di fase di HELP-R.*

TEMPO	Proteina totale (mg/mL)	P 0.092*
estr	8.9	
5-min	7.2	A
15-min	6.8	A
30-min	6.7	A

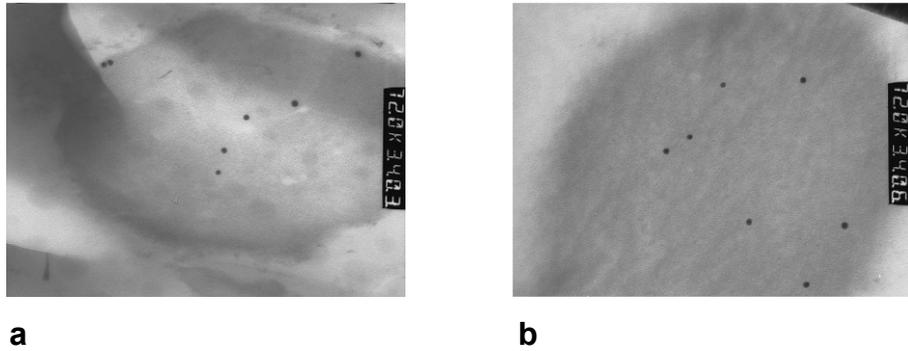
**Tab. 3.17 b** *Andamento delle proteine totali.*

Dai dati riportati in tabella, si può notare che già dopo 5 minuti a 42°C, il quantitativo di HELP-R presente nel surnatante è molto limitato. In ogni caso, prolungando il trattamento termico, il quantitativo di HELP-R residuo diminuisce ulteriormente e a 30 minuti la quantità precipitata è pressoché totale. Al contrario, non si osservano differenze significative a livello di proteine totali, presenti in soluzione allo scadere dei tre tempi di incubazione.

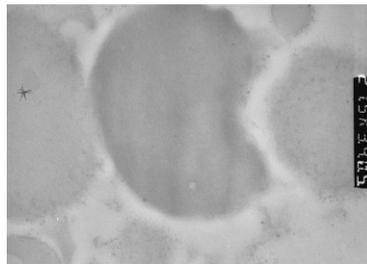
### 3.15 IMMUNOLocalizzazione DI HELP-R IN ENDOSPERMA DI RISO

L'immunolocalizzazione ha permesso di evidenziare la presenza di HELP-R unicamente all'interno dei vacuoli proteici di riserva (PSV, acronimo di *Protein Storage Vacuole*) presenti nell'endosperma della cariosside: l'anticorpo policlonale anti-HELP prodotto dalla ditta Davids Biotechnologie ha permesso di identificare HELP-R in maniera evidente grazie a un segnale privo di rumore di fondo (Fig. 3.26 a,b).

In effetti, la prova eseguita con la medesima procedura su una cariossida di riso non trasformato ha confermato la mancanza di siti di legame aspecifici per l'anticorpo anti-HELP, evidenziando quindi un'elevata specificità della IgG nei confronti del polipeptide (Fig. 3.27).



**Fig. 3.26** *Immunolocalizzazione di HELP-R su sezioni di seme di riso trasformato (64.000X)*



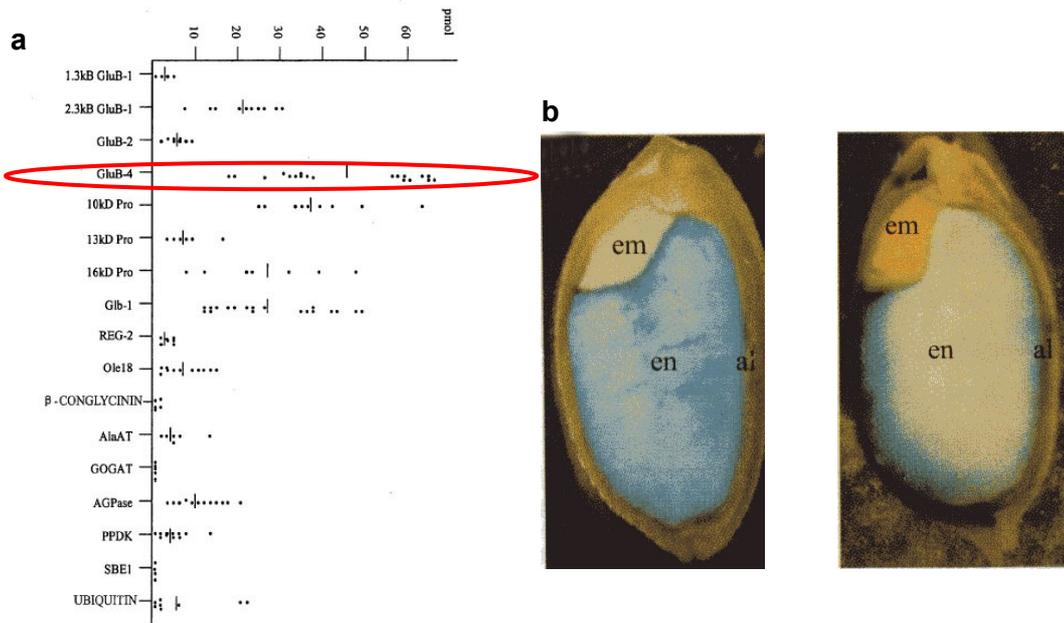
**Fig. 3.27** *Immunolocalizzazione su controllo negativo CR W3 non trasformato*

## 4. DISCUSSIONE

Nell'ambito di questo lavoro sono state valutate le potenzialità del riso come bioreattore per la produzione del polipeptide elastino-simile HELP-R, che riprende la zona più regolarmente ripetuta dell'elastina umana. Sinora in letteratura era nota la produzione in pianta di polimeri elastino-simili, formati dalla ripetizione del dominio pentapeptico –VPGVG– dell'elastina bovina. Queste proteine, per lo più formanti complessi di fusione, sono state prodotte in foglia di tabacco e di patata (Patel et Al., 2006; Scheller et Al., 2003). L'attuale studio ha permesso di sviluppare una piattaforma produttiva alternativa al sistema di *E. coli*, unico bioreattore attualmente utilizzato per la produzione di HELP (HELP-E).

L'endosperma di riso è un tessuto che consente l'accumulo e lo stoccaggio nel lungo periodo di proteine ricombinanti senza una diminuzione della loro attività biologica. Al contrario, le biomasse verdi (come la foglia di tabacco) o deperibili (come *E. coli*), necessitano di una immediata lavorazione.

La scelta del tessuto di espressione risulta determinante per l'accumulo e la stabilità delle proteine ricombinanti. Molte proteine ricombinanti sono state espresse o sovraespresse con successo nell'endosperma del seme di riso utilizzando promotori delle gluteline: la  $\beta$ -faseolina per l'incremento del contenuto in lisina (Zheng et Al., 1995), la ferritina per migliorare l'apporto di ferro (Goto et Al., 1999), la lattoferrina per aumentare l'assorbimento del ferro (Nandi et Al., 2002), il lisozima per migliorare l'attività battericida (Yang et Al., 2003), gli enzimi coinvolti nella biosintesi del  $\beta$ -carotene ovvero della provitamina A per migliorare lo stato delle mucose e ridurre la xeroftalmia (Ye et Al., 2000). Tra questi, il promotore più utilizzato per l'espressione di proteine eterologhe in endosperma di riso è quello della Glutelina 1 (GluB1) (Yu et Al., 2005); nella presente ricerca si è invece puntato sul promotore della Glutelina 4 in quanto la sua sequenza viene attivata da fattori transagenti presenti unicamente nell'endosperma e la sua forza trascrizionale appare superiore a quella di altri promotori seme-specifici, incluso GluB1 (Qu e Takaiwa, 2004) (Fig. 4.1 a,b).



**Fig. 4.1 a)** Attività del gene reporter GUS espressa in pmol (4mM/min/ $\mu$ g proteina) registrata per vari promotori in semi immaturi raccolti 17 giorni dopo la fioritura. Ciascun punto corrisponde a un trasformato primario ottenuto indipendentemente, il segmento verticale indica il valore medio di espressione GUS. In evidenza, il promotore GluB4. **b)** Localizzazione dell'attività GUS nell'endosperma del seme di riso con il promotore GluB4 (a sinistra) e con il promotore della Prolamina A (a destra). em: embrione; en: endosperma; al: strato aleuronico (da Qu e Takaiwa, 2004).

Le analisi molecolari condotte sui trasformati primari e i saggi immunologici effettuati su estratti proteici da seme di riso, hanno evidenziato le capacità produttive dell'endosperma di riso nella produzione della proteina ricombinante elastino-simile.

#### 4.1 SELEZIONE DEI TRASFORMATI PRIMARI E PROBLEMATICHE CONNESSE CON I SAGGI IMMUNOLOGICI

La selezione mediante transizione di fase inversa e misurazione della torbidità dei campioni risospesi non è risultata praticabile utilizzando piccoli volumi di estratto proteico da semi di riso. Ad un'analisi qualitativa non è emersa alcuna differenza significativa tra il controllo CR W3 e la linea trasformata. Queste difficoltà sono state

imputate alla natura stessa della matrice; considerato lo stato disidratato e il contenuto di sostanze amidacee estremamente elevato, l'endosperma di riso presenta infatti una maggiore complessità rispetto agli omogenati di *E. coli*, dove effettivamente la purificazione di HELP mediante transizione di fase rientra ormai nella pratica di laboratorio.

Ci si è quindi orientati inizialmente verso saggi sperimentali immunoenzimatici, quali il Western blot per selezionare le piante trasformate e valutare l'espressione della proteina ricombinante in pianta. Sono stati dapprima saggiati due anticorpi commerciali, uno monoclonale (clone BA-4, Sigma E4013) e uno policlonale Anti Human Beta Elastin (18-783-77566 GenWay). Dei due, soltanto l'anticorpo policlonale della GenWay ha mostrato in Western blot una reattività specifica sia verso HELP-E (utilizzato come controllo positivo), sia verso HELP-R. I medesimi anticorpi sono stati utilizzati per allestire un saggio ELISA, ma nessuno dei due ha dato esiti soddisfacenti. Data la necessità non solo di individuare le piante trasformate che producessero la proteina ricombinante, ma anche di valutare quantitativamente l'espressione, si è deciso di produrre un anticorpo policlonale anti HELP (Davids Biotechnologie GmbH), utilizzando HELP-E come antigene per l'immunizzazione di due conigli. Il medesimo anticorpo è stato coniugato con HRP per allestire il tipico sistema sandwich dell'ELISA.

La produzione di anticorpi necessita di ampi tempi di realizzazione (almeno quattro mesi) poiché l'animale va immunizzato ripetutamente per ottenere lo sviluppo di un alto titolo anticorpale e di una maggiore specificità.

Per non ritardare quindi la selezione dei trasformati primari, è stato utilizzato l'anticorpo commerciale della GenWay in Western blot. Mantenere la tempistica di analisi ha consentito di non ritardare la semina della generazione T<sub>2</sub> ed ha permesso lo sviluppo delle piante nel loro periodo stagionale ideale.

Come indicato nei risultati, è stato possibile sviluppare il saggio ELISA testando diverse combinazioni di anticorpi. Lo standard utilizzato per la curva di taratura, HELP-E ha presentato problematiche sperimentali dovute alla degradazione della molecola stessa. Dalla discussione con la Dott.ssa Bandiera e dall'esperienza diretta in laboratorio, si è concluso che questo inconveniente accade sia nel caso in cui la molecola non venga opportunamente manipolata (ad es. ripetuto

congelamento e scongelamento del campione), sia a seguito di risospensione del liofilo (dopo la purificazione mediante transizione di fase HELP-E viene conservato per lunghi periodi in forma liofilizzata), indicando un'instabilità di base della proteina elastino-simile. La degradazione di HELP-E è chiaramente apprezzabile in SDS-PAGE: la proteina degradata viene infatti visualizzata come un ladder.

I saggi immunologici hanno anche reso evidente una diminuzione considerevole di HELP-R negli estratti grezzi dopo scongelamento. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto a un sequestro di HELP-R da parte delle proteine presenti nell'estratto grezzo, oppure a una precipitazione irreversibile del polimero.

Se questo aspetto non è risultato cruciale per lo screening semiquantitativo in Western blot, esso ha dato altresì evidenti problemi sperimentali durante lo studio della transizione di fase. Quest'analisi è stata effettuata evitando di congelare i campioni. Nel caso in cui non fosse stato possibile analizzare subito gli estratti, la proteina è stata mantenuta per tempi relativamente lunghi (8-24 h) sotto forma di pellet dopo precipitazione a caldo.

Utilizzando nei saggi Western blot l'anticorpo specifico anti-HELP (Davids Biotechnologie), è stato possibile rilevare sia negli estratti proteici, sia nelle frazioni ottenute dalla transizione di fase inversa, la banda all'altezza attesa e altre quattro bande discrete ad altezze inferiori (§ Fig. 3.16 b). Queste bande non sono state visualizzate utilizzando altri anticorpi commerciali. Probabilmente questi ultimi riconoscono domini antigenici diversi e quindi l'interpretazione del gel risulta parziale.

Si è ipotizzato che queste bande potessero essere forme tronche della proteina, generatesi per proprietà chimiche intrinseche alla proteina stessa. In effetti, è ipotizzabile la presenza di alcuni punti di fragilità interni alla molecola, particolarmente in corrispondenza dei residui di lisina presenti nei domini di cross-linking. Tali residui hanno, infatti, gruppi  $\text{NH}_2$  liberi altamente reattivi i quali potrebbero corrispondere a siti specifici di degradazione della molecola. A supporto di tale ipotesi, va rilevato che, producendo una proteina HELP senza domini di cross-linking, questo fenomeno non è stato osservato (Dott.ssa Bandiera, comunicazione personale). Si tende a escludere un'eventuale degradazione

enzimatica poiché l'estrazione proteica è stata effettuata in presenza di inibitori delle proteinasi.

È importante sottolineare come lo stesso fenomeno sia stato notato anche per HELP-E prodotto in *E. coli*. Ciò esclude che la matrice di riso risulti inadeguata per la produzione di proteine elastino-simili. Come mostrato in Fig. 4.2 a, nei casi di positività multipla, sono state riscontrate bande discrete simili a quelle rilevate per HELP-R (Bandiera 2010).



**Fig. 4.2** SDS-PAGE e relativo Western blot con anticorpo anti-His tag (Bandiera 2010) su HELP-E prodotto in due ceppi di *E. coli*: **a)** XL1-Blue (Stratagene); **b)** BLR (DE3) (Novagen).

Risulta inoltre una certa discrepanza tra l'analisi Western blot e l'analisi SDS-PAGE in cui le proteine vengono visualizzate con colorazione Coomassie. Quando rilevato in Western blot con l'anticorpo specifico prodotto da Davids Biotechnologie, HELP-E presenta lo stesso pattern di degradazione da noi osservato; tale pattern risulta normalmente assente in SDS-PAGE.

Come descritto nei risultati, HELP-R non è rilevabile mediante colorazione Coomassie. Questo fenomeno è probabilmente riconducibile a due diversi motivi: 1. concentrazione nell'estratto relativamente scarsa; 2. scarsa propensione a legare il blu di Coomassie per la quasi totale assenza di amminoacidi basici (R, Y, K, H). Il polimero sintetico HELP-R presenta infatti solo 16 lisine (unico tipo di residuo in grado di legare il colorante) su 521 amminoacidi. HELP-E prodotto in *E. coli*, oltre ad essere più concentrato, presenta, in aggiunta alle 16 lisine, una coda poli-H al C-terminale, per cui è più facilmente rilevabile in SDS-PAGE.

È estremamente importante valutare l'eventuale degradazione della proteina HELP in quanto funzionalmente è noto che se la molecola è frammentata, la reticolazione è meno efficiente e la struttura finale del polimero che ne risulta è più debole.

## 4.2 STIMA DELLA RESA DI HELP-R

Con i saggi immunologici precedentemente descritti, è stato possibile determinare che la proteina ricombinante non ha alcun effetto fitotossico. Dall'analisi sulla generazione T<sub>2</sub> (la progenie dei trasformati primari), si è evidenziato infatti che la proteina viene trasmessa stabilmente, le piante risultano fertili e non presentano caratteristiche fenotipiche aberranti.

Per quanto riguarda la resa di HELP-R, la migliore linea della generazione T<sub>2</sub> è risultata HR-104. Mediante saggi ELISA si è stimato un contenuto di circa 200 µg per grammo di farina di HELP-R. Questa resa è in linea con altre proteine ricombinanti prodotte in riso presso il nostro gruppo. È chiaro che se confrontata con HELP-E, l'ordine di grandezza è molto diverso, in quanto i sistemi stessi di produzione non sono paragonabili in termini di resa. Produrre una proteina in *E. coli* è una tecnologia estremamente versatile quando vengono richieste grandi quantitativi di proteina poiché si basa su un sistema di espressione inducibile. Nel nostro caso abbiamo una pianta transgenica che produce la proteina di interesse compatibilmente con il metabolismo basale della pianta e la cui resa finale può essere ottimizzata in base al promotore e all'organo di accumulo.

La resa di HELP-E prodotto in *E. coli* viene stimata in 200 mg per litro di coltura. La purificazione, mediante transizione di fase inversa, sembra inoltre essere più efficace considerata la maggior concentrazione del polimero e la minore complessità della matrice. Infatti, una caratteristica richiesta sia per la transizione di fase, sia per la successiva reticolazione di HELP è la sua concentrazione nel mezzo (Bandiera 2011). Sebbene *E. coli* risulti essere superiore in termini di resa, quindi in termini puramente quantitativi, non lo è da un punto di vista qualitativo, laddove le proteine necessitano di un corretto *fold*ing e di eventuali modificazioni post-traduzionali.

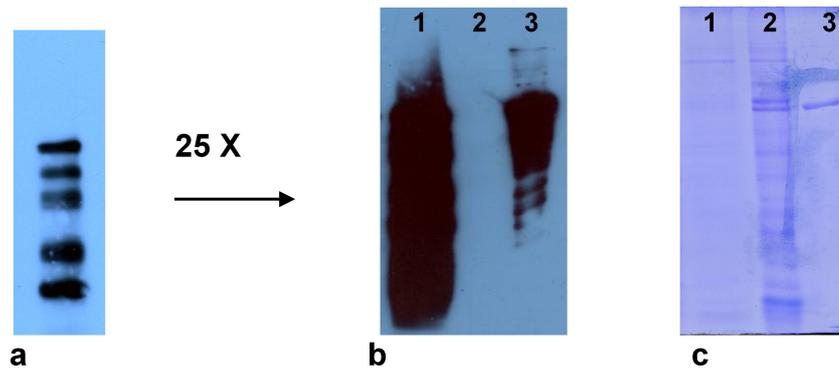
Inoltre, la tecnologia delle piante transgeniche elimina del tutto il problema non trascurabile delle tossine derivate dal sistema procariotico. Poiché lo scopo finale è

quello di produrre reticolati su cui coltivare linee cellulari e tessuti, il vantaggio qualitativo non è trascurabile anche se il quantitativo iniziale del materiale richiesto è maggiore.

#### **4.3 TRANSIZIONE DI FASE INVERSA DI HELP-R**

In linea con le caratteristiche dei polimeri elastino-simili, HELP-R, pur essendo presente in quantità molto diluita all'interno degli estratti da farina, sottoposto alla transizione di fase inversa, si aggrega e precipita purché venga estratto un quantitativo maggiore di farina (3 g) rispetto al saggio analitico (300 mg). È stato riscontrato che tale processo consente di recuperare solo il 30% circa del quantitativo di HELP-R presente nell'estratto di partenza. Questo potrebbe essere dovuto sia alla co-precipitazione di HELP-R con proteine presenti nell'endosperma di riso che ne causano il sequestro, sia alla possibile interferenza da parte dell'amido che precipitando trascina con sé diverse proteine impedendone la risospensione. Quest'ipotesi sarà oggetto di ulteriori indagini. Inoltre, poiché la risospensione è un processo meccanico, è verosimile che una parte di HELP-R rimanga intrappolata nel pellet per una non completa disgregazione del particolato in fase di dissolvimento (§ 2.16). Durante il trattamento a caldo il pellet che si forma è, infatti, molto compatto e di difficile disgregazione. Per questo motivo è stato scelto di risospendere i pellet O/N.

Negli esperimenti di transizione di fase inversa è stata osservata una scarsa propensione delle proteine di riso a comportarsi come HELP-R; già al secondo passaggio sembra che la carica di contaminanti diminuisca notevolmente anche se non completamente, mentre le perdite di HELP-R risultano contenute. Al riguardo, concentrando 25 volte (Fig. 4.3 b) la frazione relativa al 2° risospeso in Tris-HCl (2°rsp, cfr. § 3.13) (Fig. 4.3 a) è possibile apprezzare solo la debole presenza di alcune proteine contaminanti (Fig. 4.3 c).



**Fig. 4.3** a) *Western blot (Davids Biotechnologie) della frazione relativa al secondo risospeso in Tris-HCl (2°rsp) (40 $\mu$ L); Western blot (b) e corrispondente SDS-PAGE (c) a seguito di concentrazione della frazione anzidetta. Ordine di carico: 1) 2° rsp concentrato 25 volte (40 $\mu$ L); 2) CN (CR W3) (30 $\mu$ g proteine totali); 3) HELP-E (4  $\mu$ g).*

#### 4.4 CARATTERIZZAZIONE DI HELP-R

Le proprietà chimico-fisiche di HELP-R sono state analizzate mediante variazioni di temperatura, forza ionica, pH e tempo di precipitazione. Tali analisi hanno permesso di individuare le condizioni migliori per la precipitazione di HELP-R, che sono risultate in linea con quelle descritte per questo tipo di polimero. Un risultato particolare è stato ottenuto mantenendo l'estratto a una temperatura elevata in assenza di NaCl: il quantitativo di HELP rilevato con il saggio ELISA è risultato aumentare, così come il contenuto delle proteine totali rilevate a 280 nm.

Gli esperimenti di caratterizzazione hanno permesso di stabilire che, pur essendo molto diluito, il polimero HELP-R risponde molto bene alla transizione di fase inversa e che il trattamento è sempre più selettivo via via che si raggiungono le condizioni ottimali, vale a dire forza ionica tra 1 e 2 M NaCl, temperatura di transizione pari a 42°C, pH basico e tempo di precipitazione di almeno 15 minuti.

## **4.5 IMMUNOLOCALIZZAZIONE DI HELP-R IN ENDOSPERMA DI RISO**

L'immunolocalizzazione ha messo in evidenza che il polimero prodotto viene espresso nel compartimento previsto, ovvero nei vacuoli proteici di riserva presenti nell'endosperma di riso.

La sequenza sintetica codificante HELP-R si colloca a valle di quella relativa al peptide di transito Glub4 di riso. L'analisi di immunolocalizzazione ha pertanto consentito di dimostrare che la proteina ricombinante viene inviata nel sistema secretorio, prevenendo il suo accumulo nel citoplasma dove potrebbe causare alterazioni o interferenze con il normale metabolismo cellulare. È ragionevole ipotizzare che il peptide navetta Glub4 venga rimosso da HELP-R cotraduzionalmente e all'atto stesso della internalizzazione nel reticolo endoplasmico del polimero, il quale prosegue nell'apparato di Golgi, da cui si staccano le vescicole che confluiscono nei vacuoli proteici di riserva (Hamada et Al., 2003).

## **4.6 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE**

In conclusione si può affermare che con la presente ricerca sono state gettate le basi per una produzione su larga scala di polipeptidi elastino-simili in endosperma di riso, bioreattore non ancora utilizzato e quindi innovativo per la sintesi di questo tipo di polimeri.

L'attività sperimentale da svolgere riguarderà principalmente l'affinamento della tecnica di purificazione di HELP-R, al fine di eliminare completamente i contaminanti presenti nella matrice di riso. Saranno impostati anche esperimenti in presenza di amilasi. Questi consentiranno di confermare l'eventuale ruolo negativo dell'amido. Probabilmente infatti, il suo alto contenuto impedisce una corretta risospensione di HELP-R nel tampone di estrazione. Infine, in base al contenuto di polimero prodotto, saranno impostati saggi di bioequivalenza con HELP-E e studi concernenti le caratteristiche fisiche e meccaniche del polipeptide prodotto.

## 5. BIBLIOGRAFIA

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002). Molecular Biology of the Cell. 4<sup>th</sup> edition. Garland Science. Testo disponibile on line su [www.NCBI.nlm.nih.gov](http://www.NCBI.nlm.nih.gov) **Bookshelf ID: NBK26810.**

Anderson D.G., Burdick J.A., Langer R. (2004). Materials science. Smart biomaterials. Science, 305 (5692): 1923-1924.

Ayad S., Boot-Handford R.P., Humphries M.J., Kadler K.E., Shuttleworth C.A. (1994). The extracellular matrix facts book. London, GB: Academic Press.

Bandiera A. (2010). Assembly and optimization of expression of synthetic genes derived from the human elastin repeated motif. Preparative biochemistry and biotechnology, 40 (3): 198-212.

Bandiera A. (2010) Human elastin-derived biomimetic coating surface to support cell growth. World academy of science, engineering and technology, 61: 30-34.

Bandiera A. (2011). Transglutaminase-catalyzed preparation of human elastin-like polypeptide-based three-dimensional matrices for cell encapsulation. Enzyme and Microbial Technology, 49: 347– 352.

Bandiera A., Sist P., Urbani R. (2010): Comparison of thermal behavior of two recombinantly expressed human elastin-like polypeptides for cell culture applications. Biomacromolecules, 11 (12): 3256-3265.

Biro J.C. (2006). Amino acid size, charge, hydrophathy indices and matrices for protein structure analysis. Theoretical Biology and medical modelling, vol. 3, n° 15.

Bisaccia F., Castiglione-Morelli M.A., Spisani S., Ostuni A., Serafini-Fracassini A., Bavoso A. (1998) The amino acid sequence coded by the rarely expressed exon 26A

of human elastin contains a stable betaturn with chemotactic activity for monocytes. *Biochemistry*, 37:11128-11135.

Boccaccini A.R., Blaker J.J. (2005). Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*, 2 (3): 303-317.

Braverman I., M. and Fonferko. E. (1982). Studies in cutaneous aging: I. The elastic fiber network. *J. Invest. Dermatol.*, 78: 434-443.

Bressan G. M. and Prockop D. J. (1977). Synthesis of elastin in aortas from chick embryos. Conversion of newly secreted elastin to cross-linked elastin without apparent proteolysis of the molecule. *Biochemistry*, 16: 1406-1412.

Brown P., Mecham L., Tisdale C., Mecham R. P. (1992). The cysteine residues in the carboxy terminal domain of tropoelastin form an intrachain disulfide bond that stabilizes a loop structure and positively charged pocket. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186: 549-555.

Brown-Augsburger P., Broekelmann T., Mecham L., Mercer R., Gibson M. A., Cleary E. G., Abrams W. R., Rosenbloom J., Mecham R. P. (1994). Microfibril-associated glycoprotein binds to the carboxy-terminal domain of tropoelastin and is a substrate for transglutaminase. *J. Biol. Chem.*, 269: 28443-28449.

Brown-Augsberger P., Broekelman T., Rosenbloom J., Mecham R.P. (1996). Functional domains on elastin and microfibril-associated glycoprotein involved in elastic fibre assembly. *Biochem. J.*, 318: 149-155.

Chilkoti A., Dreher M.R., Meyer D.E. (2002). Design of thermally responsive, recombinant polypeptide carriers for targeted drug delivery. *Advance drug delivery reviews*, 54 (8): 1093-1111.

Chilkoti A., Dreher M.R., Meyer D.E., Raucher D. (2002). Targeted drug delivery by thermally responsive polymers. *Advances drug delivery reviews*, 54 (5): 613-630.

Chow D., Nunalee M., Lim D., Simnick A., Chilkoti A. (2008). Peptide-based biopolymers in biomedicine and biotechnology. *Mater. Sci. Eng.*, 62(4): 125-155.

Chrzanowski P., Keller S., Cerreta J., Mandl I., Turino G.M. (1980). Elastin content of normal and emphysematous lung parenchyma. *Am. J. Med.*, 69: 351-359.

Cox B.A., Starcher B.C., Urry D.W. (1974). Coacervation of tropoelastin results in fiber formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249 (3): 997-998.

Daamen W.F., Veerkamp J.H., van Hest J.C.M., van Kuppevelt T.H. (2007). Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials*, 28: 4378-4398.

Datta and Datta S.K. (2006). In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 343: *Agrobacterium Protocols*, Second edition vol. 1. Edited by Kan Wang, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Davidson J.M., Giro M.G. (1986). In: Mecham R.P. editor. *Regulation of matrix accumulation*. N.Y. Academic Press; pp. 178-216.

Debelle L., Alix A.J. (1999). The structures of elastins and their function. *Biochimie*, 81: 981-994.

Degtarev A., Foster J.A. (1999). The role of NF-1 factors in regulation of elastin gene transcription. *Mater. Biol.*, 18: 295-307.

Deming T. (2006). Polypeptide and polypeptide hybrid copolymer synthesis via NCA polymerization. *Peptide Hybrid Polymers*, 202: 1-8.

Ewart A., Jin W., Atkinson D., Morris C., Keating M. (1994). Supravalvular aortic stenosis associated with a deletion disrupting the elastin gene. *The American Society for Clinical Investigation*, 93: 1071-1077.

Ewart A., Morris C., Atkinson D., Jin W., Sternes K., Spallone P., Stock A., Leppert M., Keating M. (1993). Hemizyosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nature Genet.*, 5: 11-16.

Fischer R., Emans N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res.*, 9: 279-299.

Floss D., Schallau K., Rose-John S., Conrad U., Scheller J. (2009). Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends in Biotechnology*, 28 (1): 37-45.

Fulop T., Jacob M. P., Khalil A., Wallach J., Robert L. (1998). Biological effects of elastin peptides. *Pathol. Biol.*, 46: 497-506.

Furgeson D.Y., Dreher M.R., Chilkoti A. (2006). Structural optimization of a “smart” doxorubicin-polypeptide conjugate for thermally targeted delivery to solid tumors. *Journal of Controlled Release*, 110 (2): 362-369.

Furth M. E., Atala A., Van Dyke M. E. (2007). Smart biomaterials desing for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials*, 28: 5068-5073.

Germain D. (2001). Pseudoxanthoma elasticum: evidence for the existence of a pseudogene highly homologous to the *ABCC6* gene. *Med. Genet.*, 38: 457-496.

Gomord V., Sourrouille C., Fitchette AC, Bardor M. (2004). Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnol. J.*, 2: 83-100.

Goto F., Yoshihara T., Shigemoto N., Toki S., Takaiwa F. (1999). Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nat Biotechnol*, 17: 282–286.

Hall, D. (1976). *The ageing of connective tissue*. Academic Press, London.

Hamada S., Ishijama K., Choi S.-B., Wang C., Singh S., Kawai N., Franceschi V.R., Okita T.W., 2003. The transport of prolamine RNAs to prolamine protein bodies in living rice endosperm cells. *The Plant Cell*, 15: 2253-2264.

Hauck M., Seres I., Kiss I., Saulnier J., Mohacs A., Wallach J. (1995). Effects of synthesized elastin peptides on human leukocytes. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 37: 45-55.

Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6(2): 271-282.

Hinek A., Rabinovitch M. (1993). The ductus arteriosus migratory smooth muscle cell phenotype processes tropoelastin to a 52-kDa product associated with impaired assembly of elastic laminae. *J. Biol. Chem.*, 268: 1405-1413.

Hinek A., Rabinovitch M. (1994). 67 kDa elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *The Journal of Cell Biology*, 126 (2): 563-574.

Hsiao H., Stone P.J., Toselli P., Rosenbloom J., Franzblau C., Schriber B.M. (1999). The role of the carboxy terminus of tropoelastin in its assembly into the elastic fiber. *Connect. Tissue Res.*, 40: 83-95.

Kamoun A., Landeau J., Godeau G., Wallach J., Duchesnay A., Pellat B. (1995). Growth stimulation of human skin fibroblast by elastin-derived peptides. *Cell. Adhes. Commun.*, 3: 273-281.

Kozel B.A., Mecham R.P., Rosenbloom J. (2011). Elastin. *Biology of extracellular matrix. The extracellular matrix: an overview*, 8: 267-302.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Langer R., Tirrell D.A. (2004). Designing materials for biology and medicine. *Nature*, 428 (6982): 487-492.

Lim D.W., Trabbic-Carlson K., MacKay J.A., Chilkoti A. (2007). Improved non-chromatographic purification of a recombinant protein by cationic elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules*, 8 (5): 1417-1424.

Lin J.J., (1995). Electrotransformation of *Agrobacterium*. In *Methods in Molecular Biology*, 47, Nickoloff, JA, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 171.

MacEwan S.R., Chilkoti A. (2009). Elastin-like polypeptides: biomedical applications of tunable biopolymers. *Peptide Science*, 94 (1): 60-77.

Mackay J.A., Chilkoti A. (2008). Temperature sensitive peptides: engineering hyperthermia-directed therapeutics. *International Journal of Hyperthermia*, 24 (6): 483-495.

Mecham R., Hinek A., Entwistle R., Wrenn D., Griffin G. L., Senior R.M. (1989). Elastin binds to a multifunctional 67-kilodalton peripheral membrane protein. *Biochemistry*, 28: 3716-3722.

Meyer D., Chilkoti A. (1999). Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nature Biotechnology*, 17: 1112-1115.

Meyer D.E., Chilkoti A. (2004). Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behaviour of elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules*, 5 (3): 846-851.

Nandi S., Suzuki Y.A., Huang J., Yalda D., Pham P. et al. (2002). Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Sci*, 163: 713-722.

Olliver L., Luvalle P., Davidson J., Rosenbloom J., Mathew C., Bester A., Boyd C. (1987). The gene coding for tropoelastin is represented as a single copy sequence in the haploid sheep genome. *Collagen Rel. Res.*, 7: 77-79.

Ostuni A., Lograno M.D., Gasbarro A.R., Bisaccia F., Tamburro A.M. (2002). Novel properties of peptides derived from the sequence coded by exon 26A of human elastin. *Int. J. Biochem. Cell Biol. J.*, 34: 130-135.

Patel J., Zhu H., Menassa R., Gyenis L., Richman A., Brandle J. (2007). Elastin-like polypeptide fusion enhances the accumulation of recombinant protein in tobacco leaves. *Transgenic Res.*, 16: 239-249.

Qu L.Q., Takaiwa F. (2004). Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice. *Plant Biotechnol. J.*, 2: 113-125.

Reguera J., Urry D.W., Parker T.M., McPherson D.T., Rodriguez-Cabello J.C. (2007). Effect on NaCl on the exothermic and endothermic components of the inverse temperature transition of a model elastin-like polymer. *Biomacromolecules*, 8 (2): 354-358.

Reynolds E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17: 208-212.

Riberio A., Arias F.J., Reguera J., Alonso M., Rodriguez-Cabello J.C. (2009). Influence of the amino-acid sequence on the inverse temperature transition of elastin-like polymers. *Biophysical J.*, 97 (1): 312-320.

Rodgers U., Weiss A. (2005). Cellular interactions with elastin. *Pathologie Biologie*, 53: 390-398.

Rosenbloom J., Abrams W., Mecham R. (1993) Extracellular matrix 4: The elastic fiber. *The FASEB J.*, 7: 1208-1218

Rosso F., Marino G., Giordano A., Barbaris M., Parmeggiani D., Barbarisi A. (2005). Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J. Cell Physiol*, 203 (3): 465-470.

Rucker R.B. and Dubick M.A. (1984). Elastin metabolism and chemistry: potential roles in lung development and structure. *Environ. Health Perspect.*, 55: 179-191.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Saunders N., Grant M. (1985). The secretion of tropoelastin by chick-embryo artery cell. *Biochem. J.*, 230: 217-225.

Sarfati I., Lopes D., Murphy E., Rao S., Cohen J. (1996). Inhibition by protease inhibitors of chemotaxis induced by elastin-derived peptides. *J. Surg. Res.*, 61: 84-88.

Scheller J., Hehggeler D., Viviani A., Conrad U. (2004). Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. *Transgenic Res.*, 13: 51-57.

Senior R., Griffin G., Mecham R., Wrenn D., Prasad K., Urry D. (1984). VGVAPG, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblast and monocytes. *J. Cell. Biol.*, 99: 870-874.

Stoger E., Sack M., Perrin Y., Vaquero C. et Al. (2002). Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Mol. Breed.*, 9: 149-158.

Stoger E., Ma J.K.C., Fischer R., Christou P. (2005). Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16: 167-173.

Stone P.J., Franzblau C., Kagan H.M. (1982). Proteolysis of insoluble elastin. *Methods Enzymol.*, 82: 588-605.

Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J., (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17: 1105-1109.

Todd R. and Tague B. (2001). Phosphomannose isomerase: a versatile selectable marker for *Arabidopsis thaliana* germ-line transformation. *Plant Molec. Biol.*, 19: 307-319.

Trabac-Carlson K., Liu L., Kim B., Chilkoti A. (2004). Expression and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*: comparison of an elastin-like polypeptide fusion with an oligohistidine fusion. *Protein Science*, 13 (12): 3274-3284.

Uitto J. and Ryhänen J. (1987). Pathology of the elastic fibers, in connective tissue disease: molecular pathology of the extracellular matrix. Dekker, New York pp. 399-422.

Uitto J., Fazio M., Bashir M., Rosenbloom J. (1991). Elastic fibers of the connective tissue. In *Biochemistry, physiology and molecular biology of the skin* (Goldsmith, L. A., ed.) vol. 1, pp. 530-557, Oxford University Press, New York.

Urry D.W., Long M.M., Cox B.A., Ohnishi T., Mitchell L.W., Jacobs M. (1974). The synthetic polypentapeptide of elastin coacervates and forms filamentous aggregates. *Biochim. Biophys. Acta*, 371 (2): 597-602.

Urry D.W., Sugano H., Prasad K.U., Long M.M., Bhatnagar R.S. (1979). Prolyl hydroxylation of the polypentapeptide model of elastin impairs fiber formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90: 194-198.

Urry D.W., Luan C., Parker T.M., Gowda D.C., Prasad K.U., Reid M.C., Safavy A. (1991). Temperature of polypeptide inverse temperature transition depends on mean residue hydrophobicity. *J. Am. Chem. Soc.*, 113 (11): 4346-4348.

Urry D. (1997). Physical chemistry of biological free energy transduction as demonstrated by elastic protein-based polymers. *Journal of Physical Chemistry B*, 101 (51): 11007-11028.

Vrhovski B. and Weiss A. (1998). Biochemistry of tropoelastin. *Eur. J. Biochem.*, 258: 1-18.

Werb Z., Banda M.J., McKerrow J.H., Sandhaus R.A. (1982). Elastases and elastin degradation. *J. Invest. Dermatol.*, 79 (Suppl. 1): 154S-159S.

Williams D.F. (1989). A model for biocompatibility and its evaluation. *J. Biomed Eng*, 11 (3): 185-191.

Yamaoka T., Tamura T., Seto Y., Tada T., Kunugi S., Tirrell D.A. (2003). Mechanism for the phase transition of a genetically engineered elastin model peptide (VPGIG)<sub>40</sub> in aqueous solution. *Biomacromolecules*, 4 (6): 1680-1685.

Yang D., Guo F., Liu B., Huang N., Watkins S.C. (2003). Expression and localization of human lysozyme in the endosperm of transgenic rice. *Planta*, 216: 597-603.

Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., Potrykus I. (2000). Engineering the provitamin A ( $\beta$ -Carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287: 303–305.

Yeo G.C., Keeley F.W., Weiss A.S. (2010). Coacervation of tropoelastin. *Advances in colloid and interface science*. 167: 94-103.

Yu et al., (2005). Rice glutelin gene promoters. United States Patent Application 20050066387.

Yuan Q., Quackenbush J., Sultana R., Pertea M., Salzberg SL., Buell C.R. (2001). Rice bioinformatics. Analysis of rice sequence data and leveraging the data to other plant species. *Plant Physiol.*, 125: 1166-1174.

**Zheng Z., Sumi K., Tanaka K., Murai N. (1995).** The bean seed storage protein [beta]-phaseolin is synthesized, processed, and accumulated in the vacuolar type-II protein bodies of transgenic rice endosperm. *Plant Physiology* 109: 777-786.

## **RINGRAZIAMENTI**

Un sentito ringraziamento al Professor Stefano Marchetti per avermi dato la possibilità di lavorare a questo Dottorato di Ricerca.

Ringrazio i miei colleghi Erika, Fernanda, Tamara, Piero, Emanuele e Carla, per essere stati degli insostituibili compagni di lavoro, Flavia per avermi insegnato tanto e infine Serena e Sara per aver condiviso questi tre anni di Dottorato.

Desidero ringraziare la Dott.ssa Antonella Bandiera, la Dott.ssa Rita Musetti e il Dott. Simone Diego Castellarin per la loro collaborazione, disponibilità e professionalità.

Un ringraziamento particolare a Sabrina, Marco ed Erica, Pieri, Edoardo, Sandro, Marco P., Filip e Lorenzo, per essere dei cari amici e per essermi stati vicini in questi anni.

Un ringraziamento anche a Stefania per la sua amicizia e per la sua simpatia.

Infine un ringraziamento speciale va alla mia famiglia e in particolare ai miei genitori, per avermi sempre sostenuto ed incoraggiato e, senza i quali tutto questo non sarebbe stato possibile.