



scienza attiva®

EDIZIONE 2015/2016

AGRICOLTURA, ALIMENTAZIONE E SOSTENIBILITA'

Piante come bioreattori per la produzione di molecole ad interesse medico o farmaceutico

Luciana Rossi

Università degli Studi di Milano – Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare (VESPA)

Documento di livello: C



Un progetto di



agorà scienza
centro interuniversitario



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO



scienza attiva®

Le biotecnologie

La definizione più accreditata del termine biotecnologia, che in linea generale include tutte le applicazioni tecnologiche della biologia, è quella definita dalla Convenzione sulla Diversità Biologica delle Nazioni Unite del 1992 : "La biotecnologia è l'applicazione tecnologica che si serve dei sistemi biologici, degli organismi viventi o di derivati di questi per produrre o modificare prodotti o processi per un fine specifico".

In altre parole con il termine biotecnologie, utilizzato solitamente al plurale per indicare la pluralità di tecnologie sviluppate e i settori di interesse, si indicano quelle applicazioni che mediante organismi viventi, cellule e loro costituenti permettono di ottenere quantità commerciali di prodotti utili, oppure di migliorare le caratteristiche di piante e animali o di sviluppare microrganismi utili per specifici usi.

Partendo da questo concetto appare evidente che le biotecnologie fanno parte della vita dell'uomo da millenni. Infatti da sempre l'uomo utilizza e manipola inconsapevolmente gli organismi viventi per ottenere prodotti utili o per miglioramento di alcune caratteristiche. A questo proposito, un importante esempio è la preparazione di cibi o bevande fermentate che risale addirittura al 6000 a.C.. Le prime conoscenze relative ai meccanismi alla base delle trasformazioni risalgono invece a Pasteur che, tra 1857 e 1876, comprese i meccanismi della preparazione della birra attribuibili al *Saccharomyces cerevisiae*, individuò i batteri responsabili della fermentazione lattica e butirrica, nonché quelli responsabili della produzione di aceto.

Per tale ragione le biotecnologie possono essere classificate in "biotecnologie tradizionali" e "biotecnologie moderne", le cui ultime sfruttano gli enormi progressi scientifici nell'ambito della biologia cellulare, della chimica e dell'ingegneria genetica degli ultimi 30 anni.

Le biotecnologie moderne, che sono state in grado di investire campi inimmaginabili prima per l'uomo, trovano applicazione in numerosi settori dell'attività umana, tra cui la cura della salute, l'alimentazione, l'agricoltura e la difesa dell'ambiente, per non parlare degli ambiti dell'energia, della chimica, della strumentazione della bioelettronica.

Tecnica del DNA ricombinante

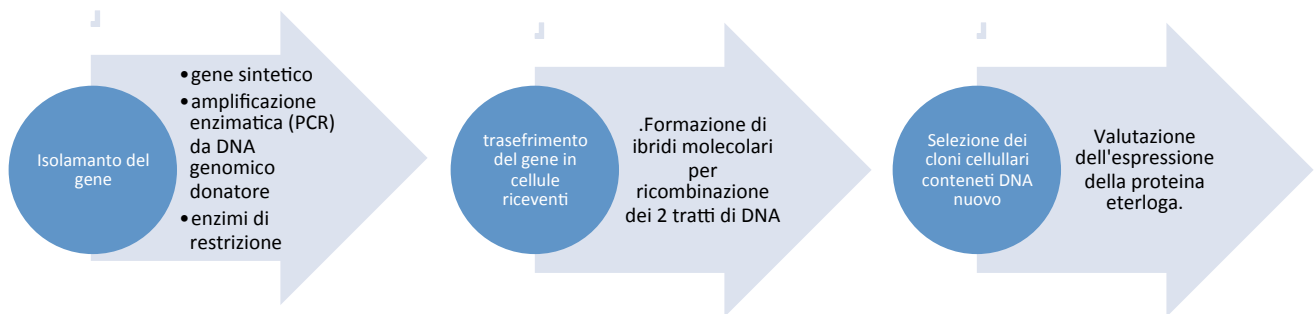
La tecnologia del DNA ricombinante, fulcro delle moderne biotecnologie, è l'insieme delle tecniche di ingegneria genetica che consentono di isolare geni da qualunque organismo e trasferirli nel genoma di cellule riceventi. In natura il trasferimento genico può avvenire attraverso incroci tra individui o organismi della stessa specie. Questa tecnologia, invece, che si basa sull'universalità del codice genetico, permette interventi mirati e consente il superamento delle barriere di specie. Il codice genetico è racchiuso nella molecola di DNA (più raramente RNA) che è costituito da una sequenza di geni, l'unità ereditaria degli organismi viventi. A sua volta il gene, in genetica molecolare, è una sequenza di nucleotidi che contiene l'informazione per la sintesi dell'RNA messaggero, il quale indurrà la sintesi di una catena di aminoacidi che andranno a costituire la proteina. I 20 aminoacidi che compongono le proteine sono codificati ciascuno da una o più sequenze di 3 nucleotidi, dette triplette o codoni. Un codone invece codifica solo per un aminoacido. Le triplette possono essere interpretate correttamente da qualunque cellula, per questo infatti si parla di universalità del codice genetico. Ogni cambiamento di un singolo nucleotide all'interno della sequenza di un gene, codificante per una singola proteina, produce una mutazione genetica in quanto viene alterato un codone che può portare alla sostituzione di un

amminoacido sulla proteina finale. Esiste quindi una diretta corrispondenza tra il gene e la catena polipeptidica da esso prodotta, nel senso che l'ordine e la posizione relativa delle mutazioni nel gene sono in diretto rapporto alle sostituzioni di amminoacidi nella catena polipeptidica.

La tecnologia del DNA ricombinante permette, almeno in linea teorica, trasferire qualunque gene (codificante per una specifica proteina) in qualunque organismo, che a sua volta interpreta e traduce come proteina.

La tecnologia del Dna ricombinante è molto complessa dal punto di vista operativo, ma dal punto di vista concettuale si basa su passaggi ben definiti riconducibili all'identificazione del gene di interesse, all'isolamento dello stesso e alla selezione di un vettore idoneo al trasferimento del gene nel genoma della cellula ricevente (figura 1).

Fig. 1: rappresentazione schematica delle fasi applicative della tecnica del DNA ricombinante che porta alla produzione di organismi geneticamente modificati.



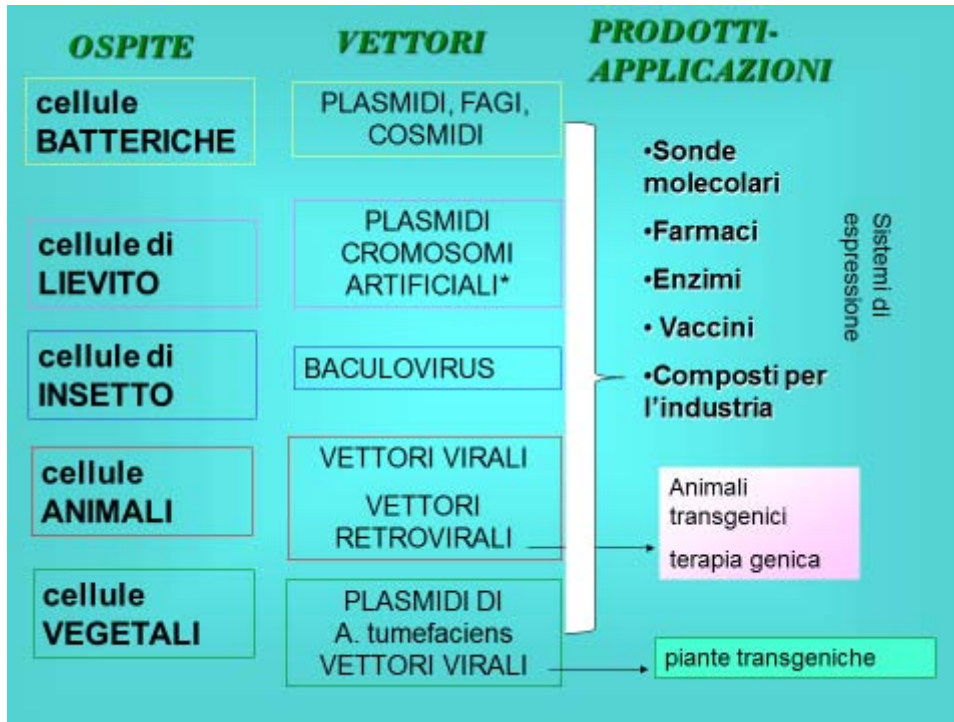
La nuova proteina eterologa prodotta può essere estratta dall'organismo trasformato, che in questo caso diventa un bioreattore. In alternativa l'ospite che esprime il gene eterologo può essere coltivato o allevato a seconda della specie (microrganismi, piante o animali). In questo caso la proteina rappresenta un valore aggiunto per l'ospite stesso grazie al gene miglioratore.

A seconda dell'organismo ospite sono stati messi a punto diversi approcci di trasferimento genico di trasferimento meccanico (microiniezione, elettroporazione, biolistico) o attraverso vettori.

I vettori fanno in modo che un frammento di DNA esogeno venga ottimamente veicolato all'interno del genoma della cellula ricevente e quindi che il gene si integri, si esprima e si trasmetta alle generazioni successive. In generale i vettori sono elementi genetici extracromosomici, elementi trasponibili, oppure un genoma virale. I vettori più comuni sono i plasmidi, formati da un'unica molecola di DNA circolare a doppio filamento naturalmente presenti sia nei batteri che nei lieviti, dove si duplicano come unità indipendenti durante la replicazione della cellula ospite ed hanno di solito dimensioni inferiori ai 10kpb (10.000 paia di basi). Possono anche essere impiegati fagi, virus che infettano batteri (20 Kpb), cosmidi (20-40 Kpb), virus animali (papovavirus scimmia, vaiolo vaccino, baculovirus).

Nella figura 3 sono riportati alcuni sistemi di espressione di proteine eterologhe con i più comuni vettori.

Fig. 3: vettori applicabili a diversi cloni cellulari per il trasferimento genico.



Ovviamente prima di procedere con le fasi applicative è necessaria una fase progettuale in cui si decide quale proteina, e quindi quale caratteristica genica si vuole trasferire, è necessario che sia espressa in un organismo ricevente al fine di ottenere una determinata proprietà migliorativa. Ad esempio l'idea progettuale di molte varietà di mais OGM resistente alla piralide, lepidottero le cui larve infestano il mais, è nata da una caratteristica del *Bacillus thuringiensis*, un batterio che si sviluppa spontaneamente nel terreno. Il *Bacillus thuringiensis* è in grado di produrre una proteina "CRY" che agisce sull'apparato digerente della piralide impedendole l'assunzione di alimento. Infatti le "CRY PROTEINE", che sono attivate a tossine da specifici enzimi che si trovano nell'apparato digerente alcalino di questi insetti, aderiscono alle membrane delle cellule intestinali causandone la rottura e la conseguente morte. Il mais resistente alla piralide è stato geneticamente modificato attraverso l'inclusione nel suo genoma del gene codificante per le "cry proteins" derivante da ceppi di *Bacillus thuringiensis*.

Il prodotto espresso da un tratto di DNA "nuovo", inserito in un organismo ricevente è una proteina detta ricombinante. Sulla base dei concetti precedentemente esposti qualunque proteina esistente in natura, con idonei metodi, può essere espressa in qualunque organismo. Quindi scelta la caratteristica, si individua il gene che è responsabile della caratteristica desiderata, si trasferisce il gene nella cellula ospite che infine lo tradurrà nella proteina ricombinante desiderata. Oltre a ciò è possibile ottenere nuove proteine (mutagenesi mirata) con nuove caratteristiche od anche nuove proteine ibride (per ligazione) che migliorano una determinata funzione.

Il trasferimento di un gene da una cellula donatrice ad una cellula ricevente porta alla produzione di un organismo geneticamente modificato (OGM). Non sono considerati "organismi geneticamente modificati" tutti quegli organismi il cui patrimonio genetico viene modificato a seguito di processi spontanei (modificazioni e trasferimenti di materiale genetico avvengono infatti in natura in molteplici occasioni e tali processi sono all'origine della diversità della vita sulla terra), o indotti dall'uomo tramite altre tecniche che non sono incluse nella definizione data dalla normativa di riferimento (ad esempio con radiazioni ionizzanti o mutageni chimici).

Ai fini della definizione di OGM data dalla Direttiva 2001/18/CE, sono considerate tecniche che hanno come risultato un organismo geneticamente modificato:

1. tecniche di ricombinazione del materiale genetico che comportano la formazione di nuove combinazioni mediante l'utilizzo di un vettore di molecole di DNA, RNA o loro derivati, nonché il loro inserimento in un organismo ospite nel quale non compaiono per natura, ma nel quale possono replicarsi in maniera continua;
2. tecniche che comportano l'introduzione diretta in un organismo di materiale ereditabile preparato al suo esterno, tra cui la macroiniezione e il microincapsulamento;
3. fusione cellulare (inclusa la fusione di protoplasti) o tecniche di ibridazione per la costruzione di cellule vive, che presentano nuove combinazioni di materiale genetico ereditabile, mediante la fusione di due o più cellule, utilizzando metodi non naturali.

Sono esclusi dalla definizione gli organismi ottenuti per mutagenesi o fusione cellulare di cellule vegetali di organismi che possono scambiare materiale genetico anche con metodi di riproduzione tradizionali, a condizione che non comportino l'impiego di molecole di acido nucleico ricombinante

Applicazioni biotecnologiche e settori

Gli OGM sono oggi utilizzati svariati settori nell'ambito dell'alimentazione, dell'agricoltura, della medicina, della ricerca, e dell'industria ed hanno permesso di ottenere innumerevoli vantaggi. In particolare le biotecnologie sono utilizzate nel settore agroalimentare per ottimizzare il ruolo dei microrganismi, conosciuto da secoli, nella produzione di alimenti comuni. La conoscenza più approfondita (a livello molecolare) dei processi fermentativi di vino e birra, nonché dei meccanismi di incrocio e selezione di varietà animali e vegetali ha portato negli ultimi decenni il settore agroalimentare ad essere sempre più influenzato dalle biotecnologie. Numerose sono anche le applicazioni nel campo del biorisanamento (trattamento, riciclo e bonifica di rifiuti attraverso microrganismi attivi), nella produzione di bioplastiche, di combustibili alternativi, della fitodepurazione. Microrganismi batterici o alcuni lieviti possono essere utilizzati per la sintesi di sostanze come ormoni, insulina, farmaci e antibiotici. In ambito medico un importante successo storico è rappresentato dalla produzione dall'insulina, attraverso sistemi biotecnologici, commercializzata a partire dal 1981. La Genentech, fondata da Herbert Boyer, è riuscita infatti a produrre in *E. coli* l'insulina umana (1978), il farmaco biotecnologico più noto. La commercializzazione dell'insulina ha segnato un cambiamento epocale per l'industria del farmaco, aprendo il settore biotecnologico (precedentemente confinato nei laboratori di ricerca) all'industrializzazione, e rivoluzionando il processo di drug discovery e lo sviluppo di nuove terapie non invasive. Prima di allora infatti l'insulina veniva estratta da pancreas di cadaveri, metodo non scevro da rischi sanitari oppure da suino, la cui minore omologia strutturale ne riduceva l'efficacia. Appare evidente il vantaggio di tale scoperta. Anche cellule di mammifero geneticamente

modificate sono ampiamente utilizzate nella biosintesi di farmaci. Promettenti nuove applicazioni sono legate alla biosintesi di farmaci attraverso organismi vegetali.

Recentemente è stata introdotta a livello internazionale la seguente classificazione per indicare i campi applicativi delle biotecnologie (fig. 4):

Le **Blue biotechnology** o biotecnologie marine, investono il settore della biologia molecolare applicata agli organismi marini e di acqua dolce. Gli obiettivi generali perseguiti da questo settore sono il miglioramento delle conoscenze in ambito ecologico, potenziando la produzione di alimenti derivati e la loro salubrità; proporre nuove soluzioni per il controllo della proliferazione di organismi acquatici dannosi per l'uomo e l'ambiente; ricercare nuove molecole con potenzialità farmaceutiche.

Le **Grey biotechnology** o biotecnologie ambientali si occupano della salvaguardia della biodiversità e la protezione dai contaminanti.

Le **Green biotechnology** o biotecnologie agroalimentari sono il settore delle biotecnologie che si occupa dei processi agricoli nonché di piante come sistema di espressione di molecole ad interesse per l'uomo. Le modificazioni biotecnologiche apportate ai vegetali non si fermano alla semplice introduzione di proteine ricombinanti (mais BT), esistono modifiche che intervengono su intere vie metaboliche in modo da incentivare la produzione di metaboliti secondari (golden rice o pomodori ricchi di antociani). Negli ultimi decenni le piante sono diventate dei veri e propri sistemi di produzione di proteine ad interesse medico o farmaceutico. In tal senso importante esempio è la recente messa a punto del vaccino contro il virus dell'ebola prodotto in pianta di tabacco. La patata Amflora, prodotta dalla multinazionale BASF, è invece un esempio di patata OGM utilizzata per produrre carta, quindi non per scopi alimentari. L'utilizzo in campo delle biotecnologie agroalimentari, se correttamente contestualizzata alle esigenze della società e del mondo agricolo, è importante per raggiungere incrementi di produttività soprattutto nelle aree dove gli eventi climatici avversi si verificano con intensità maggiore.

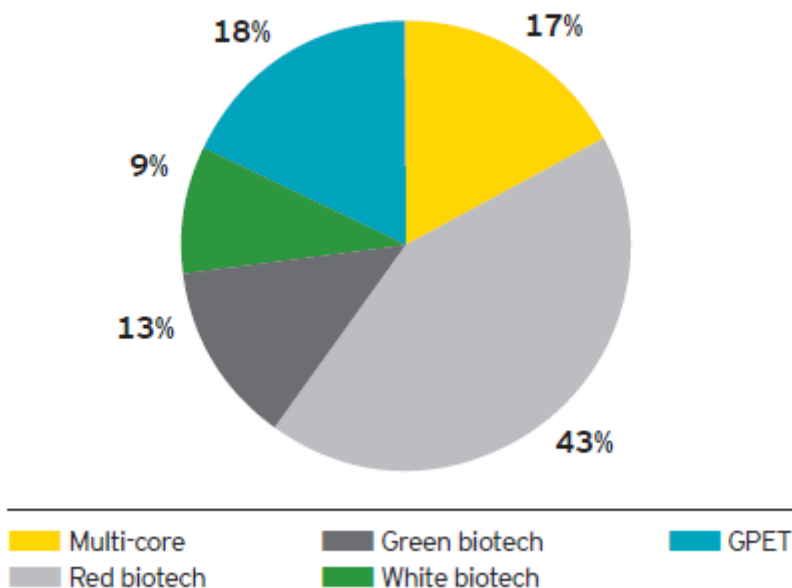
Le **Red biotechnology** o biotecnologie farmaceutiche è il settore che si occupa dei processi biomedici e farmaceutici. La nascita dei primi farmaci biotecnologici risale alla produzione di antibiotici con microrganismi, quali le penicilline prodotte da funghi del genere *Penicillium* e le cefalosporine prodotte da *Cephalosporium acremonium*.

Le **White biotechnology** o biotecnologie industriali trovano applicazione nell'ambito dei processi industriali.

Molte aziende italiane investono in ricerca e sviluppo in ambito biotecnologico, nella figura 4 sono riportati i principali settori. Nonostante l'importanza della crisi finanziaria il numero di compagnie biotecnologiche nell'ultimo anno è significativamente aumentato. Quasi la metà delle compagnie biotech sul territorio nazionale lavorano nell'ambito delle red biotech. Tale aspetto prova il peso predominante delle biotecnologie applicate alla salute dell'uomo. Infatti tale settore è attraente sia dal punto di vista scientifico che imprenditoriale, in quanto è basato su una crescente domanda di trattamenti terapeutici più efficaci per un ampio numero di patologie che hanno un impatto medico e sociale rilevante.

Fig. 4: Analisi dei campi di ricerca che coinvolgo le aziende biotecnologiche italiane.

Italian pure biotech companies: analysis by application field (Source: EY)



Applicazioni biotecnologiche vegetali

Da molte centinaia di anni le piante coltivate vengono modificate al fine di renderle sempre più adatte alle esigenze dell'uomo. I primi agricoltori miglioravano le colture semplicemente selezionando i semi delle piante che avevano i caratteri desiderati; in seguito gli agronomi hanno sviluppato degli schemi rigorosi di incroci fra piante al fine di introdurre e di mantenere determinati caratteri nelle linee incrociate. Tuttavia i metodi classici di incrocio delle piante sono lenti e incerti. L'introduzione di un gene desiderato o di un gruppo di geni tramite i metodi convenzionali richiede un incrocio sessuale tra due linee, seguito da ripetuti re-incroci fra la progenie ibrida e uno dei genitori finché non si ottenga una pianta con le caratteristiche volute. Tale processo, inoltre è limitato alle piante che possono ibridarsi sessualmente e in esso, fatalmente, verranno trasferiti altri geni assieme a quello desiderato.

Con l'avvento delle tecniche del DNA ricombinante si possono invece trasferire geni tra specie vegetali non incrociabili o introdurre nelle piante geni di organismi filogeneticamente lontani. Da un certo punto di vista, le tecnologie transgeniche non fanno altro che riproporre in forma più rapida e definitiva ciò che da sempre si cerca di fare con le piante: selezionare una caratteristica per darle vantaggio sulle altre.

Gli esperimenti di ingegneria genetica sono rivolti a conferire proprietà desiderabili ai prodotti agricoli ovvero ad ottenere il miglioramento di caratteri agronomicamente utili. Il trasferimento genico, però, può intervenire in maniera efficace soltanto su caratteri che possono essere governati da geni singoli, mentre i caratteri, come la resa dei raccolti, che dipendono da un numero elevato di geni e da svariati percorsi metabolici interconnessi sono estremamente difficili da trattare.

Le tecniche usate prevedono, come abbiamo già visto, il clonaggio e l'isolamento del gene di interesse, l'inserimento del gene in un vettore molecolare di espressione e la trasformazione delle cellule vegetali o dei protoplasti, a partire dai quali viene poi rigenerata la pianta intera. La manipolazione delle piante è meno complessa (e più economica) di quella degli animali. A tutt'oggi, infatti, sono state prodotte numerose piante transgeniche. Dall'inizio della loro applicazione le biotecnologie hanno portato allo sviluppo successivo di tre generazioni di piante GM, perlopiù transgeniche e xenogeniche, con vantaggi essenzialmente differenti e diretti a una diversa utenza (fig. 5).

A seconda della distanza genetica tra l'organismo donatore del carattere di interesse e l'organismo ricevente (si veda la tabella), le piante geneticamente modificate possono inoltre essere classificate anche come intrageniche, famigeniche, lineageniche, transgeniche, xenogeniche. Le ultime tre categorie richiedono l'impiego dell'ingegneria genetica e non sono ottenibili attraverso gli incroci tradizionali.

Figura 5: Classificazione delle piante geneticamente modificate in relazione alla distanza genetica tra donatore e ricevente

<i>Categoria</i>	<i>Derivazione gene esogeno</i>	<i>Distanza genetica</i>
Intragenici	All'interno dello stesso genoma (mutazione o ricombinazione)	Bassa
Famigenici	Specie affini nella stessa famiglia	
Lineagenici	Specie della stessa linea filogenetica	
Transgenici	DNA proviene da specie filogeneticamente lontane	
Xenogenici	DNA esogeno è costituito da geni artificiali	Alta

La prima generazione di piante GM, oggetto di grandi discussioni pubbliche, è stata autorizzata dalle autorità competenti americane a metà degli anni Novanta del secolo scorso e coltivata su scala commerciale. L'esempio più eclatante in tale senso è rappresentato dal mais BT, ossia il mais resistente alla piralide. La piralide è un insetto devastatore, principale parassita del mais, capace di causare perdite nella produzione che arrivano al 40%. Si tratta di un lepidottero minatore la cui forma larvale attacca la pianta entrando nel fusto dove mangia parte dell'interno e, oltre a danneggiare direttamente la pianta, crea condizioni favorevoli per l'attacco da parte di altri virus o funghi. Il mais Bt è in grado di sviluppare piante che esprimono la tossina del batterio *Bacillus thuringiensis* dentro le cellule. La tossina attiva inibisce l'azione delle cellule che ricoprono l'intestino dell'insetto, che muore per denutrizione in circa 72 ore. Il gene per la proteina Bt si trova su un plasmide di un batterio e codifica una proteina in forma inattiva, la quale si trasforma in attiva quando viene ingerita dalle larve di un insetto; gli enzimi digestivi dell'insetto modificano la struttura chimica della proteina trasformandola in un composto tossico. Un altro esempio di piante geneticamente modificate molto discusso è rappresentato dalle colture vegetali resistenti agli erbicidi: importanti sono la soia, la colza, il mais e la barbabietola. Al di là dell'opinione pubblica l'introduzione di queste varietà sul mercato americano ha consentito il risparmio di migliaia di tonnellate di erbicidi e una notevole riduzione dei carburanti utilizzati per l'applicazione dei diserbanti.

Gli erbicidi trovano vasta applicazione nella distruzione delle erbe infestanti che, crescendo tra le piante agricole, possono ridurre l'entità del raccolto di oltre il 10%. D'altra parte gli erbicidi non sono molto selettivi in quanto agiscono alterando i processi fisiologici caratteristici delle piante

(fotosintesi, biosintesi di aminoacidi essenziali). Il loro uso si basa, di solito, sulla captazione differenziale fra l'erba infestante e la pianta coltivata oppure sull'applicazione dell'erbicida prima che il campo venga seminato.

L'identificazione e il trasferimento di geni per la resistenza agli erbicidi nelle piante da raccolto ha dunque l'obiettivo di proteggere queste ultime dagli effetti dell'erbicida. Solitamente gli erbicidi disattivano specifici enzimi cellulari (ma per molti il meccanismo d'azione non è noto). Il glifosato (o glifosate), un composto a largo spettro d'azione, a bassissimo impatto ambientale e favorevole profilo tossicologico, attualmente molto diffuso, che uccide le piante inibendo la 5-enolpiruvato 3-fosfato sintasi (EPSP), un enzima necessario per la biosintesi degli aminoacidi aromatici presente nel cloroplasto.

La prima generazione di piante GM presenta caratteristiche (input traits) – quali, per esempio, la resistenza alla piralide e agli erbicidi – che si traducono essenzialmente in vantaggi di tipo agronomico.

La seconda generazione di piante GM offre un valore aggiunto, output traits, che non va a incidere sulla produttività della pianta stessa ma rappresenta un vantaggio per il consumatore. Un importante esempio, in questo senso, è il “Golden Rice”, una varietà di riso, *Oryza sativa*, in grado di produrre betacarotene nella parte edibile del riso. La pianta di riso è in grado di creare naturalmente il beta-carotene nelle sue foglie, dove è coinvolto nei processi fotosintetici. Tuttavia, la pianta normalmente non produce il pigmento nella endosperma, parte edibile e dove la fotosintesi non avviene. Il betacarotene del golden rice assunto con la dieta può essere convertito in vitamina A, micronutriente essenziale. La carenza di vitamina A nei bambini sotto ai 5 anni dei Paesi del terzo mondo è molto diffusa e responsabile di patologie oculari e di elevata mortalità. In tal senso il golden rice è stato sviluppato come strumento umanitario. Il golden rice, prima pubblicazione nel 2000, differisce dal suo ceppo parentale per l'aggiunta di geni che intervengono nella via biosintetica del beta-carotene. In particolare il gene psy (fitoene sintasi, ottenuto da *Narcissus pseudonarcissus*) e crtI (carotene desaturasi dal batterio del suolo *Erwinia uredovora*) sono inseriti nel genoma nucleare riso e posti sotto il controllo di un promotore specifico-endosperma, in modo che fossero espressi solo nel endosperma. Nel 2005, è stata prodotta una nuova varietà denominata Golden Rice 2, che produce fino a 23 volte più beta-carotene rispetto al golden rice originario. In questo caso, il gene responsabile della produzione di carotenoidi è stato prelevato dal mais, e si stima che 70 grammi di riso dovrebbero essere sufficienti per fornire la metà del fabbisogno giornaliero di vitamina A.

La terza generazione di piante GM è rappresentata, invece, dall'impiego delle piante come bioreattori per la produzione di proteine ad interesse medico od industriale. In tale ambito particolare importanza riveste il

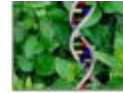
medical molecular farming, ossia quelle piante GM caratterizzate da medical traits, essenzialmente ascrivibili a geni che possono codificare per proteine terapeutiche ovvero indurre l'espressione o la sovraespressione di particolari metaboliti utili ai fini medici.

I metodi di trasformazione delle cellule vegetali

I protocolli di trasformazione delle cellule vegetali sono ormai standardizzati anche perché le piante sono dotate di alcune proprietà che in idonee condizioni ne facilitano la coltivazione: propagazione in vitro, embriogenesi somatica e micropropagazione (fig.6).

Fig.6: propagazione in vitro delle piante.

Propagazione in vitro delle piante



La **propagazione in vitro** delle piante permette di ottenere in tempi e in spazi ristretti un gran numero di individui uguali a quelli di partenza.

L'**embriogenesi somatica**, che rigenera embrioni a partire da qualsiasi tipo di cellula dei tessuti di una pianta, si basa sulla capacità dei vegetali di ricostruire l'intero organismo a partire da cellule somatiche.

La **micropropagazione** permette di ottenere individui uguali alla pianta di partenza: coltivati in brodo di coltura, i frammenti di organi di pianta posti in adatte condizioni di temperatura e umidità in presenza di alcuni ormoni vegetali formano un **callo**, ammasso di cellule indifferenziate.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Spazio Verde di
Cultura vegetale per la salute
Il Programma ricerca
e la Innovazione



Grazie a queste caratteristiche da un callo germinativo (fig. 7) ottenuto da espianti di tessuto vegetale posto in idonee condizioni colturali è possibile:

- Rigenerare l'intera pianta se messo in condizioni ambientali adeguate (micropropagazione).
- Essere trattato geneticamente e poi rigenerato (micropropagazione di piante transgeniche).
- Essere modificato con altri sistemi (fusione di cellule, mutazione) e poi rigenerato (micropropagazione di piante modificate).
- Essere messo in un fermentatore e produrre metaboliti utili all'uomo (farmaci, essenze, pigmenti).

Figura 7: callo germinativo ottenuto da espianti di *Nicotiana tabacum*.



Sono stati messi a punto diversi metodi per la trasformazione delle cellule vegetali: *Agrobacterium tumefaciens*, trasferimento mediato dal glicole polietilenico, vettori virali, Microiniezione, Elettroporazione dei protoplasti, Biolistico. A seguito verranno descritti i principali.

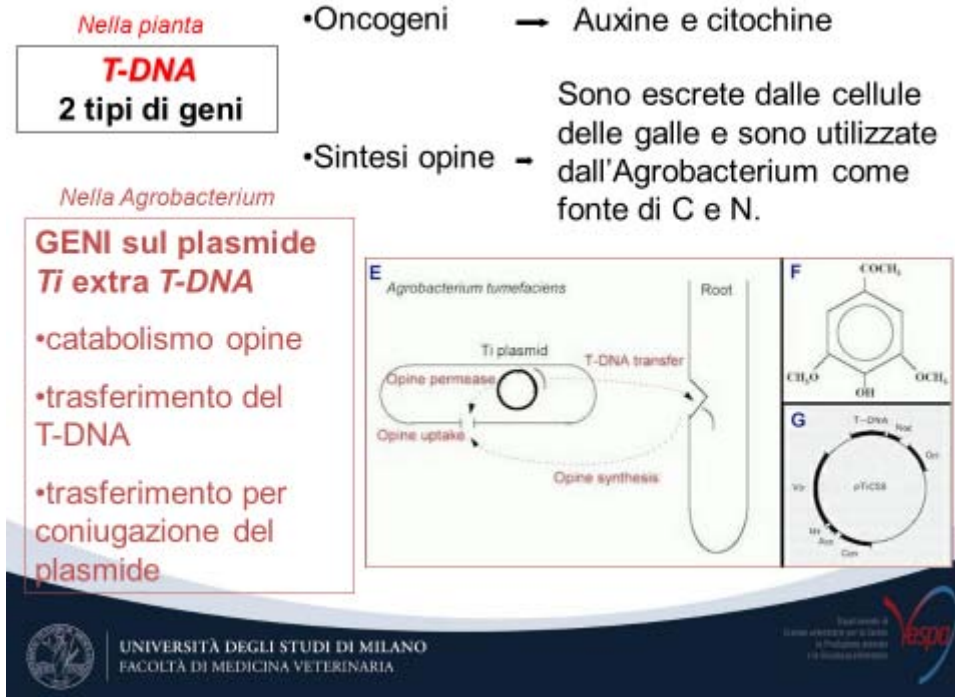
Agrobacterium è uno dei più utilizzati sistemi di espressione di proteine esogene nella pianta. Il ceppo selvaggio (wild type) di *Agrobacterium tumefaciens* infetta naturalmente le piante dicotiledoni ed è responsabile della formazione di tumori della pianta nel sito di infezione, detti Galle del colletto (cioè della parte di confine tra fusto e radici). *A. tumefaciens* è un batterio Gram-negativo, non-sporigeno e mobile. E' possibile isolare *Agrobacterium* sulla superficie della pianta in condizioni naturali: la maggior parte dei ceppi (più del 90%) trovati non sono patogeni, anche quando gli isolamenti vengono effettuati su piante malate. Gli "*Agrobacterium*" sono essenzialmente abitanti della rizosfera ma solo una piccola porzione di essi è in grado di essere patogena. Ceppi di *Agrobacterium* patogeni sono classificati in 3 biovarianti sulla base dell'utilizzo di diversi differenti carboidrati e di altri composti chimici. Le differenze tra le biovarianti sono determinate da geni presenti sull'unico cromosoma circolare. La patogenicità, sostanzialmente equivalente tra le biovarianti, invece risiede su un plasmide Ti (tumor inducing).

I plasmidi sono molecole di DNA circolare extracromosomico non strettamente necessari ai batteri, ma che apportano vantaggi. Conferiscono resistenza ad antibiotici, patogenicità, capacità di metabolizzare in nutrienti sostanze insolite, ecc. Sono trasmissibili sia verticalmente da un batterio alla progenie, che orizzontalmente da batterio a batterio.

Nell'ingegneria genetica sono usati come vettori per il trasporto di DNA. In condizioni naturali le cellule mobili di *A. tumefaciens* sono attratte da linee di ferita per chemotassi. I ceppi patogeni, contenenti il plasmide Ti rispondono agli stimoli chemiotattici in maniera più energica perché riconoscono i composti fenolici liberati dalle ferite della pianta come acetosyringone (10^{-7} M). Questa capacità è data dal plasmide Ti che presenta un gene codificante per uno specifico recettore chemiotattico che si va ad inserire nella membrana batterica ed è in grado di riconoscere le ferite. L'acetosyringone gioca un ruolo determinante anche nel processo di infezione poiché ad alte concentrazioni (da 10^{-5} a 10^{-4} M) attiva anche i geni di virulenza (Vir genes) sul plasmide Ti. Il meccanismo oncogenetico di *Agrobacterium tumefaciens* risiede nella sua abilità di trasferire un particolare frammento di DNA (T-DNA), del plasmide Ti, nel nucleo delle cellule che infetta. Il T-DNA si integra stabilmente nel genoma della cellula e viene trascritto in proteine oncogene che inducono una massiccia crescita cellulare e sono responsabili poi della formazione delle galle tumorali. La produzione di proteine oncogene viene mantenuta dopo l'infezione anche in assenza del batterio, poiché il meccanismo patogenetico dipende da un'integrazione stabile nel genoma vegetale di geni oncogeni che vengono espressi sfruttando i meccanismi di trascrizione e traduzione della cellula vegetale. Il processo di trasferimento del T-DNA è mediato da un'azione di cooperazione tra le proteine prodotte dal gene VIR del plasmide (fig.8). Il T-DNA che passa come

singolo filamento nella cellula vegetale in un processo simile alla coniugazione batterica. Il T-DNA successivamente entra nel nucleo e si integra col DNA cellulare in un sito casuale all'interno di un promotore genico e fuori da una sequenza codificante, di solito in copie multiple.

Figura 8: geni che sono coinvolti nel meccanismo patogenetico di *A.tumefaciens*.



Gli ormoni oncogeni (auxine e citochine) prodotti dalle piante infettate piante regolano l'equilibrio di crescita cellulare, guidano la formazione delle galle del colletto e creano un ambiente ricco di nutrienti per i batteri.

Le opine sono l'unico derivato aminoacidico, differenti dai normali prodotti della pianta e le agricinopine sono gli unici derivati da zuccheri fosforilati. Questi composti possono essere utilizzati dal batterio come fonte di carbonio ed energia perché sono assenti nella pianta normale. Inoltre essi forniscono all'*Agrobacterium* una risorsa di cibo che altri batteri non sono in grado di utilizzare. I fitormoni prodotti (auxine e citochinine) con vie metaboliche diverse rispetto a quelle utilizzate normalmente dalla pianta e che essa non può controllare sovvertono il metabolismo della cellula mettendola al servizio del suo sofisticato parassita genetico. Inoltre l'eccessiva produzione di fitormoni nelle cellule vegetali infettate causa una crescita abnorme dei tessuti infettati. Il T-DNA si esprime solo nella pianta e non ha alcuna funzione durante il processo di trasferimento.

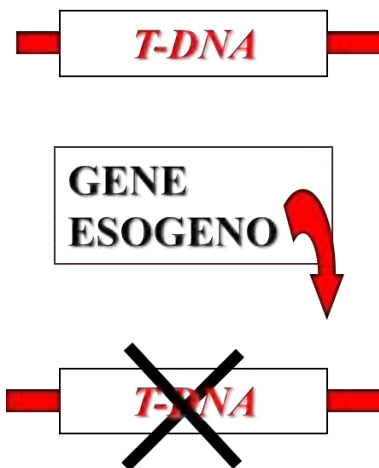


Figura 9: schema T-DNA

E' fiancheggiato da dei "bordes" di 25 bp ripetitive, che hanno un'azione di segnale per il complesso sistema di trasferimento genico. **Quindi in linea teorica qualunque gene esogeno tra i T-DNA borders può essere trasferito ed espresso all'interno della pianta, sfruttando questo complesso meccanismo oncogenetico (figura 9).** Questa è la base scientifica su cui si basa l'impiego di *A. tumefaciens* in ingegneria genetica. Ai fini della infezione il T-DNA originario non è importante, infatti i vettori di trasformazione agrobatterici usati in ingegneria genetica vengono detti "disarmati", in quanto il T-DNA originario è sostituito con i geni che si vogliono esprimere in pianta.

Per la trasformazione delle cellule vegetali mediante *Agrobacterium* attualmente si usano ceppi disarmati di *Agrobacterium tumefaciens*, quindi senza T-DNA, unitamente a dei plasmidi binari. Il vettore binario è semplicemente un plasmide, che mantiene l'origine di replicazione per *Agrobacterium* (in cui il gene esogeno viene inserito all'interno dei borders) che per *E. Coli*. Le fasi preliminari si effettuano tutte in *E. Coli* poi si introduce il vettore ricombinante in *Agrobacterium*. In questo modo il gene contenuto tra i borders del plasmide binario, inserito all'interno dei ceppi disarmati di *Agrobacterium tumefaciens* (che comunque è in grado di produrre le proteine dei geni vir) viene traslocato all'interno della cellula vegetale. Un'altra alternativa sarebbe quella di utilizzare un vettore definito cointegrato. In questo caso il costrutto di clonaggio viene fatto ricombinare con un plasmide Ti disarmato. In questo modo si ottiene un nuovo plasmide ricombinante del tutto competente per il trasferimento genico.

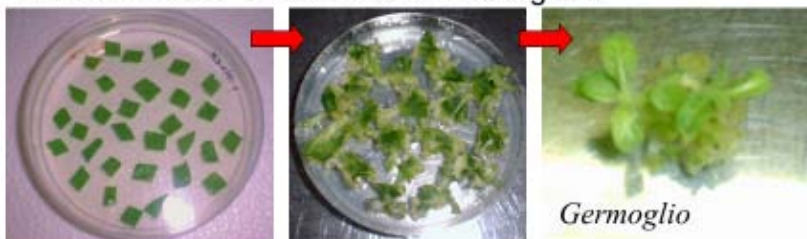
Per ottenere delle piante geneticamente modificate che esprimano all'interno del loro genoma il gene inserito in *A. tumefaciens* ricombinante (perché contiene il plasmide binario) è necessario indurre un'infezione sperimentale (figg. 10-11).

In particolare espianti fogliari vengono messi in contatto con terreno liquido in cui è cresciuto l'*Agrobacterium tumefaciens* ricombinante e successivamente trasferiti su un terreno solido per lo sviluppo del callo germinativo, necessario per rigenerare l'intera pianta.

Figura 10: colonizzazione batterica dei dischi fogliari e formazione del germoglio.

Processo di trasferimento del T-DNA di Agrobacterium nella pianta di tabacco: colture in vitro.

•Colonizzazione batterica dei dischi fogliari.



•Terreno idoneo per lo sviluppo di calli germinativi: Micro-macroelementi, vitamine, saccarosio e NAA (acido nafatlene acetico) - BAP (Benzilaminopurina).

•Trasferimento in nuovo terreno ogni 7-15gg.

Figura 11: trasferimento dei germogli in terreni idonei per la formazione delle radici.

Culture in vitro: processo di crescita delle piante di tabacco trasformate.



- I germogli sono trasferiti in terreno di radicazione.
- Le pianticole con radici sono trasferite in serra.



Dai calli germinativi si formeranno dei germogli, che verranno trasferiti in terreno di radicolazione e successivamente in terra. In tutto questo processo vengono solitamente utilizzati dei geni marcatori che permettono la crescita solo delle piante trasformate, che presenteranno nel loro genoma il gene esogeno integrato in maniera stabile.

Un'altra tecnica utilizzata per la creazione di importanti varietà geneticamente modificate è l'impiego del Cannone a particelle, metodo biolistico. Il DNA che si vuole trasferire nelle cellule vegetali viene precipitato su piccole particelle di metallo (1-2 μm di diametro), che funzionano da proiettili. Le particelle di metallo (oro o tungsteno), sottoposte ad una accelerazione elevata verso il tessuto vegetale (alla velocità di circa 430 m/s), possono penetrare nella parete delle cellule vegetali. I tessuti vegetali che possono essere trasformati con tale approccio sono colture in sospensione di cellule embrionali piastrate su filtri, foglie intatte e semi. Le cellule situate nella traiettoria diretta di tiro vengono uccise, ma c'è una zona concentrica in cui i proiettili penetrano senza uccidere la cellula. Le microlesioni della membrana si richiudono rapidamente. Tale sistema pur essendo semplice ed economico, realizzabile sia in tessuti che in piante non garantisce l'integrazione stabile del costrutto.

Sistemi transienti

Nei sistemi di espressione transiente il transgene non si integra nel genoma e quindi non è trasmesso alle generazioni successive. La tecnica di trasformazione transiente presenta diversi vantaggi rispetto alla trasformazione stabile. L'espressione transiente è spesso applicata nelle fasi preliminari, per valutare diversi costrutti, per ottimizzare le condizioni di accumulo proteico. Più recentemente le trasformazioni transienti sono state applicate sul larga scala come tecnologia di produzione di molecole farmaceutiche. Il principale vantaggio dei sistemi transienti risiede nella

flessibilità e nella velocità con cui si ottengono risposte e non è richiesta la rigenerazione dei tessuti vegetali. Tuttavia il livello di espressione delle proteine ricombinanti non sempre è molto elevato, per questo vengono spesso utilizzati approcci per migliorarne i livelli (promotori forti, tessuto-specifici o inducibili).

I principali sistemi di espressione transiente: metodo biolistico, infezione dei tessuti vegetali tramite vettori virali modificati e infiltrazione dei tessuti vegetali intatti mediante agrobatterio (agroinfiltrazione).

Il metodo biolistico raggiunge poche cellule e la trascrizione è limitata. I vettori virali infettano sistemicamente molte cellule e la trascrizione del gene d'interesse è amplificata anche dalla replicazione virale nel citoplasma, generando sempre più copie del trascritto, anche se è noto dalla letteratura che sono frequenti i fenomeni di ricombinazione che inducono ad un silenziamento genico. La tecnica dell'agroinfiltrazione, invece, infetta un elevato numero di cellule e la trascrizione del T-DNA avviene nel nucleo delle cellule infettate. Inoltre, *Agrobacterium* contenente il plasmide di interesse può essere conservato ed essere utilizzato successivamente per generare piante transgeniche. La tecnica di agroinfiltrazione può essere utilizzata facilmente in specie recalcitranti alla trasformazione stabile. Due sono le tecniche disponibili per la trasformazione transiente mediata da agrobatterio. La prima descritta da Kapila e collaboratori (1997), dove la sospensione batterica opportunamente indotta con acetosiringone, messa in contatto con i tessuti vegetali, è mantenuta sottovuoto per alcuni minuti. I tessuti vengono mantenuti in ambiente umido per un tempo che varia dai 3 ai 5 giorni e successivamente analizzati per verificare l'espressione della proteina o la presenza del trascritto di interesse. Un'altra metodica prevede l'infiltrazione della soluzione contenente l'agrobatterio indotto, direttamente, nell'epidermide delle foglie della pianta tramite l'uso di una siringa. Il vantaggio di quest'ultima risiede nel fatto che i tessuti da infettare rimangono attaccati alla pianta in modo che l'analisi dei tessuti agroinfiltrati si possa fare anche a distanza di 10-20 giorni dall'inoculo senza che i tessuti vegetali muoiano. In entrambi i casi, comunque, è possibile esprimere più geni contemporaneamente, semplicemente unendo due ceppi di agrobatterio contenenti ognuno un plasmide con il gene d'interesse. Un ulteriore vantaggio della trasformazione transiente è dato dalla possibilità di provare un gran numero di costrutti. E' possibile, infatti, indirizzare la proteina d'interesse in vari compartimenti cellulari in modo da verificare quale sia l'ambiente più adatto per un maggior accumulo, oppure confrontare i livelli di espressione di vari promotori.

Medical molecular farming e Vaccini edibili

L'impiego delle piante nella medicina è conosciuto da migliaia di anni. I primi documenti scritti che riportano l'uso di erbe medicamentose sono da ricondursi al papiro di Smith (3000 a.C.), seguito dal papiro di Ebers (1550 a.C.) il quale contiene più di 800 formule erboristiche basate sulla conoscenza di oltre 500 piante. Le erbe e le piante officinali, chiamate così perché impiegate nelle officine degli speziali, hanno accompagnato l'uomo per tutto il corso della sua storia poiché la conoscenza delle piante era fondamentale per la terapia medica antica. L'individuazione del primo principio attivo delle piante risale solo a circa 2 secoli fa per opera del farmacista tedesco Friedrich Serturmer il quale isolò la morfina dal *Papaverum somniferum*, metabolita secondario responsabile di effetti analgesici, ancora oggi estratta e utilizzata in terapia.

L'evoluzione biotecnologica degli ultimi anni ha permesso tuttavia di sviluppare un altro settore molto importante che vede nuovamente l'impiego delle piante per la medicina: la cosiddetta

medical molecular farming. In altri termini, piante geneticamente modificate (GM) possono essere utilizzate come piattaforme per la produzione di composti ad interesse medico o farmaceutico. Nel corso degli ultimi due decenni sono state applicate e ottimizzate diverse tecnologie “transgene-espressione” che consentono alle piante di produrre grandi quantità di proteine non native. Queste tecnologie rappresentate essenzialmente da trasformazioni nucleari stabili, trasformazioni plastidiali, colture di cellule vegetali in sospensione nonché sistemi di espressione transiente (agroinfiltrazione, gene gun, infezioni virali ecc.) hanno costituito la base di strategie produttive future. Queste applicazioni hanno portato all’espressione di migliaia di proteine biofarmaceutiche di origine vegetale, tra cui anticorpi, vaccini, prodotti del sangue umano, ormoni e regolatori di crescita, alcune delle quali commercializzate.

Le piante possono anche essere utilizzate come biofabbrica di molecole naturalmente presenti ma espresse in maniera significativamente superiore rispetto alle specie wild type (morfina, acido acetilsalicilico ecc.). In questo senso gli approcci adottati sono mirati alla regolazione dei geni che intervengono nelle vie biosintetiche dei metaboliti secondari della pianta.

Il medical molecular farming rappresenta un approccio innovativo e vantaggioso in quanto offre prospettive interessanti per la produzione su larga scala di farmaci ricombinanti per la terapia o la prevenzione di un ampio spettro di patologie sia in medicina umana sia in medicina veterinaria. Fino ad oggi, tra i sistemi più utilizzati per la produzione di molecole di interesse farmaceutico, vi sono i microorganismi, come *Escherichia coli*, che è largamente utilizzato nelle industrie per la produzione di proteine su larga scala, in quanto è un sistema economico e flessibile. Il sistema batterico, rappresentato da organismi procarioti, però ha lo svantaggio di non poter esprimere proteine che necessitano di modificazioni post-traduzionali come la glicosilazione o la formazione di ponti disolfuro, che in alcuni casi sono necessari per il corretto funzionamento delle proteine. In alternativa ai sistemi batterici è possibile utilizzare i lieviti. I vantaggi di questo sistema sono dati dalla facile propagazione delle colture cellulari, dalla grande quantità di proteina ricombinante che si riesce ad ottenere e dal corretto assemblamento delle proteine espresse. Il maggior problema risiede nell’espressione delle proteine che necessitano di glicosilazione, che in cellule di lievito non avviene correttamente. Livelli qualitativi superiori di espressione si ottengono con cellule in coltura di mammifero. Infatti, queste colture cellulari hanno il vantaggio di assemblare correttamente le proteine ma lo svantaggio di avere sia un costo elevato e quindi l’impossibilità di avviare una produzione su larga scala, sia di possibili contaminazioni con patogeni che potrebbero risultare dannosi per l’uomo. Questi sistemi non vegetali, oltre a richiedere accurati controlli produttivi e personale specializzato, hanno bisogno di elevate misure di sicurezza legate al rischio di contaminazione delle colture con patogeni. Le piante, invece, oltre a essere sicure in termini di possibili contaminazioni da patogeni animali, in quanto fino ad oggi non sono mai stati individuati patogeni comuni fra piante ed animali, sono organismi eucarioti, in grado quindi di sintetizzare molecole complesse con il corretto folding (fig.12).

Diversi studi hanno dimostrato che le piante, rispetto a sistemi di espressione microbici o di cellule di mammifero, offrono minori costi di produzione, un scale up più semplice e la possibilità di produrre molecole nuove in risposta al mercato farmaceutico. Infatti, sebbene per la coltivazione di piante occorre assicurare luce e acqua, non sono richieste condizioni di sterilità e di monitoraggio del medium. Inoltre è possibile indirizzare le proteine di interesse in particolari distretti tissutali della pianta. Il costo stimato per la produzione delle proteine ricombinanti in pianta è pari al 3-10% dei costi fermentativi microbici e allo 0,1% dei costi delle colture di cellule di mammifero. Daniell et al. (2001) hanno stimato il costo di 1 grammo di Immunoglobuline umane

(IgA) prodotte in diversi sistemi cellulari. E' stato osservato un notevole abbattimento dei costi di produzione utilizzando il vegetale come sistema di produzione.

La maggiore voce di costo nel processo produttivo delle proteine ricombinanti in pianta è rappresentata dalla fase di estrazione, a sua volta condizionata dal livello di purezza richiesto del prodotto finale. Tali costi possono essere significativamente abbattuti se le proteine sono fatte accumulare nell'endosperma dei semi dal quale le proteine possono essere facilmente estratte. Per questa ragione, soprattutto per i farmaci somministrati per via orale, molte ricerche si stanno orientando verso prodotti parzialmente purificati o su piante edibili e somministrabili tal quali. In altri termini il costo della purificazione può essere completamente abbattuto se la proteina d'interesse viene espressa in piante eduli; in questo caso la proteina non deve essere più estratta dai tessuti vegetali, ma può essere somministrata direttamente dopo semplici processi di concentrazione e dosaggio.

Fig.12: confronto schematico tra vari sistemi di espressione (da Fisher et al.,2000)

Factor	Transgenic plants	Plant cell cultures	Bacteria	Yeast	Mammalian cell culture	Transgenic animals
<i>Costs</i>						
production costs	low	medium	low	medium	high	high
time effort	high	medium	low	medium	high	high
scale-up costs	low	high ¹	high ¹	high ¹	high ¹	high ¹
propagation	easy	easy	easy	easy	limited	possible
productivity	high	medium	medium	medium	medium	high
<i>Quality</i>						
product quality and homogeneity	high	high	low	medium	high	high
glycosylation	authentic ²	authentic ¹	absent	incorrect	authentic ²	authentic ²
contamination risk	no	no	yes ³	no	yes ⁴	yes ⁴
<i>Practical application</i>						
data monitoring	difficult	easy	easy	easy	easy	difficult
ethical concerns	medium	low	low	low	medium	high
GMP ⁵ conformity	difficult	possible	possible	possible	possible	possible
storage	cheap/room temperature	cheap/-20°C	cheap/-20°C	cheap/-20°C	expensive/N ₂	expensive/N ₂

La fattibilità di manipolazioni genetiche precise delle cellule vegetali, gli elevati livelli di espressione delle proteine ricombinanti, la facile conservazione delle materie prime e la ridotta preoccupazione di contaminazione con agenti patogeni umani o animali durante la lavorazione sono stati gli elementi chiave che hanno orientato la ricerca scientifica degli ultimi anni e le industrie biotecnologiche verso questo settore.

Inoltre, attraverso l'impiego di promotori specifici, l'espressione della proteina di interesse può essere indirizzata in diversi distretti tissutali laddove si ritiene più utile: foglie, semi, radici, fiori, ecc..

Questa considerazione impone ovviamente una corretta progettazione della pianta come sistema di produzione di proteine eterologhe a seconda dell'uso e dell'esigenza o meno di estrazione del prodotto finale. Inoltre, le piante sono in grado di attivare il processo di N-glicosilazione, aspetto che deve essere considerato e ottimizzato attraverso l'accurato controllo degli eventi

trascrizionali, al fine di ottenere un'efficace produzione di proteine ricombinanti. La corretta glicosilazione è considerata un importante attributo di qualità, immunogenicità, farmacocinetica ed efficacia. Ogni molecola infatti richiede uno studio specifico e perciò ogni processo produttivo deve essere ottimizzato alle esigenze.

Un altro settore particolarmente promettente nell'ambito del medical molecular farming è rappresentato dai vaccini edibili: piante commestibili possono essere ingegnerizzate per la produzione di antigeni vaccinali. Diversi studi hanno infatti dimostrato che in alcuni casi queste piante, somministrate per via orale, sono state in grado di evocare una risposta immunitaria mucosale protettiva all'infezione sperimentale.

I progressi tecnici di questo settore hanno migliorato le metodiche di trasferimento genico, la produzione delle proteine ricombinanti e i processi di purificazione e le piante possono essere utilizzate come vantaggioso sistema di produzione di molecole farmaceutiche. Nella figura 13 sono riportati alcuni importanti successi ottenuti nell'ambito del medical molecular farming.

Fig. 13: produzione di molecole farmaceutiche in pianta (Daniel et al., 2001 modificata).

Applicazioni potenziali	Pianta	Proteina	Livelli di espressione
Proteine umane			
Anticoagulante	Tabacco	Proteina C	<0,01% PST
Antitrombina III	Colza	Irudina	0,3% proteine del seme
Neutropenia	Tabacco	Fattore stimolante	n.d.
Ormone della crescita	Tabacco	Somatropina	7,0% PST (cloroplasto)
Anemia	Tabacco	Eritropoietina	<0,01% PST (nucleo)
Analgesico per narcosi	Arabidopsis	Encelalite	0,1% proteine del seme
Cicatrizzante, attivatore tissutale	Tabacco	Proteina epidemica	<0,01% PST
Epatite C e B	Riso, rapa, tabacco	Interferone α Interferone β	n.d. <0,01% peso fresco
Cirrosi epatica	Tabacco	Siero albumina	0,02% PST
Sostituto del plasma nelle trasfusioni	Tabacco	Emoglobine α e β	0,05% proteine del seme
Collagene	Tabacco	Collagene	<0,01% peso fresco
Fibrosi cistica, malattie del fegato	Riso	α_1 antitripsina	n.d.
Inibitore della tripsina nei trapianti	Mais	Aprotina	n.d.
Antimicrobico	Patata	Lattoferina	<0, 1% PST
Proteine non umane			
Iperensione	Tabacco, pomodoro	Enzima di conversione della angiotensina	n.d.
Terapia contro l'HIV	Tabacco	α -tricosantina	2,0% PST
Malattia di Gaucher	Tabacco	Glucocerebrosidasi	1-10% PST

PST = proteina solubile totale (n.d., non determinato).

Nella progettazione di una piattaforma vegetale di produzione di biofarmaci è necessario tenere in considerazione tutte le fasi del processo produttivo che portano alla massimizzazione dell'espressione e della attività in vivo di proteine ricombinanti a interesse medico o farmaceutico.

Vaccini edibili

Lo sviluppo di vaccini efficaci, sicuri e facili da somministrare è un obiettivo importante nella prevenzione delle forme enteriche degli animali di allevamento. La vaccinazione prevede l'inoculazione in un soggetto sano di una preparazione antigenica costituita da un microrganismo (o parti di esso) verso il quale si vuole proteggerlo. Il vaccino induce una risposta immunitaria (produzione di anticorpi) che lo proteggerà in futuro dall'aggressione del patogeno verso cui è stato vaccinato. Il vaccino può essere allestito in forma viva attenuata oppure in forma uccisa o inattivata. Nel primo caso il vaccino è ottenuto da microrganismi vivi che per mutazioni subite hanno perso la loro patogenicità, diventando non virulenti, ma hanno conservato integra la loro capacità immunogena. Il materiale così allestito richiede condizioni di conservazione speciali e presenta il rischio di rivirulentazione. Il vantaggio di questi vaccini risiede nel fatto che è necessaria la somministrazione di un'unica dose. La seconda classe di vaccini è rappresentata da microrganismi uccisi completamente con elevate temperature o a seguito di trattamento con particolari sostanze. Si tratta di vaccini maggiormente sicuri perché i microrganismi così trattati difficilmente riacquistano patogenicità, ma la risposta immunitaria innescata è più debole. Negli ultimi anni lo sviluppo di vaccini a subunità, basato sulla somministrazione di porzioni proteiche del batterio o del virus in grado di indurre una risposta immunitaria, ha permesso di ridurre il rischio di reazioni avverse rispetto all'utilizzo dei patogeni interi attenuati. Vaccini allestiti in questo modo risultano essere più sicuri poiché solo una parte del patogeno è somministrata e possono essere prodotti anche in forma ricombinante. L'inconveniente è che richiedono somministrazioni multiple e l'uso di adiuvanti per ottenere un'immunizzazione efficace. In tale ambito l'uso della tecnologia del DNA ricombinante ha semplificato e rivoluzionato la produzione delle subunità vaccinali fornendo mezzi di protezione più efficaci e sicuri contro batteri, virus e parassiti.

Nel caso dei virus animali non esistono alternative alla vaccinazione poiché non sono disponibili farmaci antivirali di utilizzo in campo e quindi la produzione di vaccini è l'unica strategia attuabile per il controllo delle patologie virali.

I vaccini tradizionali presentano alcuni rischi: possibile presenza di virus contaminanti nelle colture per il patogeno, possibile presenza di virus virulento residuo, elevata presenza di acidi nucleici che possono causare eventi indesiderati (ipersensibilità). Inoltre esiste sempre un rischio elevato nella produzione di elevate quote di vaccini che prevedono la moltiplicazione di agenti ad elevata patogenicità (v. rabbia, poliomelite...). Dopo lo sviluppo dei primi vaccini in medicina umana l'ottenimento di nuovi prodotti è stato sporadico.

La tecnologia del DNA ricombinante, con la possibilità di produrre antigeni in ospiti eterologhi ha dato la possibilità di verificare l'espressione e l'immunogenicità di proteine derivanti da diversi patogeni. La dissezione dei patogeni nelle loro varie componenti ha permesso lo sviluppo di una nuova classe di vaccini che oltre ad essere efficaci sono più sicuri rispetto ai vaccini costituiti dai patogeni interi.

La vaccinazione è di rilevante importanza anche in ambito veterinario e zootecnico, dove uno dei principali obiettivi è la ricerca di approcci innovativi per il controllo delle malattie infettive, che evitino la diminuzione delle produzioni, tenendo in considerazione sia il benessere degli animali stessi, sia il rapporto costo/beneficio e che soprattutto consentano di diminuire l'impatto ambientale dovuto al consumo di grandi quantità di farmaci e alla presenza di residui nei prodotti derivati (Floss et al., 2007).

Il largo impiego di antimicrobici al di fuori del campo di applicazione della medicina umana è stato motivo di preoccupazione e vera e propria emergenza alla luce della registrazione di fenomeni di resistenza acquisita da batteri patogeni anche per l'uomo. I problemi connessi alla possibilità che l'impiego dei promotori di crescita antibiotici nelle specie animali d'interesse zootecnico potesse, in qualche modo, favorire la comparsa di antibiotico resistenza da parte di batteri patogeni per l'uomo, hanno innescato un processo di "messa al bando" che si è concretizzato nel 2006 con la proibizione dell'uso di antibiotici come promotori della crescita nell'allevamento animale (UE, Reg. 1831/2003). Inoltre l'impiego in campo delle molecole antimicrobiche spesso si traduce in insuccesso a causa dell'acquisizione di resistenza multipla anche da parte degli stessi patogeni animali; la pressione selettiva connessa ai trattamenti antibiotici massivi infatti ha determinato la comparsa di ceppi multiresistenti attraverso il trasferimento di plasmidi codificanti anche per altre caratteristiche quali la fermentazione del lattosio o la capacità di persistenza in ambito intestinale. Queste caratteristiche favoriscono la natura epidemica dell'infezione, aumentano il potenziale patogenico dei batteri e rendono difficoltosa la diagnostica della malattia. Infatti la somministrazione di un antibiotico ad un batterio resistente determina un aggravamento della sintomatologia clinica poiché l'antibiotico somministrato oltre a non essere attivo verso il patogeno elimina il pool di microflora intestinale che per competizione potrebbe limitare la colonizzazione enterica del patogeno.

Uno degli obiettivi della vaccinologia moderna è quello di ottenere vaccini immunogenici che possono essere somministrati via mucosa, andando a stimolare le difese immunitarie a livello locale, laddove il patogeno entra.

Le mucose hanno un sistema immunitario specializzato ed indipendente, rispetto al sistema immunitario umorale, e attualmente studiato come tessuto linfoide associato alla mucosa (MALT) che porta alla produzione di anticorpi del tipo IgAs.

Il network operante a livello delle mucose esterne consiste di diverse porzioni: a livello gastroenterico per esempio si trova il GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue), mentre nel tratto respiratorio il BALT (Bronchoepithelium Associated Lymphoid Tissue). Altri sistemi di questo tipo sono associati alle vie aeree superiori, al tratto genitale ed infine alla ghiandola mammaria (Ogra et al., 2001). Un sito altamente esposto a questo rischio è il tratto gastrointestinale che, anche in situazioni fisiologiche, rappresenta quotidianamente la via di accesso all'organismo per numerosi antigeni estranei veicolati dal cibo. Per questo motivo il sistema immunitario del tratto gastrointestinale si è evoluto in modo da evitare un'eccessiva risposta immunitaria nei confronti degli antigeni alimentari ma, d'altra parte assicurare la cattura e l'uccisione degli organismi patogeni (Janaway et al., 2005). Inoltre gran parte dell'intestino è colonizzato da microrganismi commensali che vivono in simbiosi con l'individuo offrendo per esempio protezione verso altri batteri patogeni e sintesi di vitamine.

Uno dei siti principali deputati alla risposta immunitaria all'interno della mucosa intestinale è rappresentato dalle Placche di Peyer. All'interno di tali strutture sono presenti dei follicoli contenenti cellule epiteliali specializzate, le cellule M (multifenestrated o microfold cell). Rispetto agli enterociti queste cellule sono meno prominenti e non sono in grado di produrre muco ma sono in grado di interagire direttamente con le molecole presenti all'interno del lume intestinale. Le cellule M sequestrano le molecole attraverso endocitosi o fagocitosi e le trasportano alla parte basale della membrana cellulare da dove sono rilasciate nello spazio extracellulare. Tale processo è noto come transitosi. Presso la superficie basale della membrana cellulare, le cellule M sono in stretta comunicazione con linfociti, cellule dendritiche e APC (Antigen Presenting Cells) che

recuperano il materiale trasportato e lo processano per la presentazione dell'antigene alle altre cellule del sistema immunitario, tra cui i linfociti B che produrranno anticorpi. La principale classe anticorpale presente a livello mucosale è rappresentata dalle IgA; la struttura base dell'IgA è un monomero di circa 150 kDa, anche se normalmente è secreta in forma dimerica grazie alla presenza della catena J.

Questi anticorpi sono sintetizzati in tutto l'intestino dalle plasmacellule localizzate nella lamina propria alla base delle cripte intestinali. Le IgA prodotte si legano al recettore polimerico delle immunoglobuline presente sulla superficie basolaterale delle cellule intestinali e vengono trasportate a livello apicale dove infine sono rilasciate nel muco attraverso il taglio proteolitico a livello del dominio extracellulare del recettore. Durante questo fenomeno una porzione del recettore rimane attaccata all'anticorpo formando le IgA secretorie. Tale porzione secretoria svolge diverse funzioni: lega le IgA allo strato mucosale, fornisce protezione contro le proteasi intestinali ed infine è in grado di agire direttamente contro batteri e tossine che raggiungono l'intestino. Le IgA secrete prodotte dal MALT impediscono l'adesione della cellula batterica alla mucosa legando le proteine che mediano il processo di adesione oppure inattivando le sostanze tossiche rilasciate dai batteri stessi senza indurre una risposta infiammatoria. Il sistema mucosale ha un ruolo centrale nella prevenzione della colonizzazione batterica e nei primi stadi dell'infezione. La maggior parte dei patogeni infatti compromette le mucose per instaurare l'infezione o entrare nell'organismo (Brandtzaeg 2007). La stimolazione prolungata del MALT ad un particolare sito determina una produzione continua di IgA; alcune migrano quindi verso altre mucose innescando la loro sintesi anche in altri distretti e nel latte materno. I neonati infatti sono molto suscettibili alle infezioni, non essendo ancora stati esposti ai microrganismi tipici dell'ambiente in cui si trovano; per questo le IgA sono secrete anche nel latte materno per essere trasferite all'intestino del neonato. Ciò garantisce una prima difesa, nell'attesa che il sistema immunitario inizi a sintetizzare i propri anticorpi protettivi.

La somministrazione orale è particolarmente efficiente nello stimolare una risposta immunitaria mucosale, il cui sistema come è noto è distinto ed indipendente rispetto al sistema immunitario umorale. La più recente innovativa tecnica per la produzione di vaccini, sia in medicina umana che veterinaria, è rappresentata dalla possibilità di generare piante transgeniche che esprimono a livello di semi o di altra struttura (foglie, frutti, tuberi, ecc.) le proteine immunizzanti di origine virale o batterica. Pertanto attraverso le piante vaccino, somministrate come alimenti è possibile indurre una produzione immunitaria soprattutto a livello delle mucose gastroenteriche e respiratorie, che rappresentano la principale via di ingresso dei patogeni più pericolosi per gli animali.

Mediante le tecniche dell'ingegneria genetica sono stati quindi prodotti diversi tipi di vaccini ricombinanti la maggior parte dei quali è stata allestita clonando in una cellula procariota o eucariota il gene del microrganismo che codifica per la principale proteina immunogena, cioè la proteina che induce nell'ospite la produzione di anticorpi protettivi in elevate quantità. Tali vaccini sono costituiti, pertanto, da specifiche sub-unità di una proteina del microrganismo; nei vaccini virali si tratta in genere di una proteina del guscio proteico (capside) o della membrana limitante esterna (envelope), mentre nei vaccini batterici si tratta di proteine di adesione (antigeni delle fimbrie) o di specifiche tossine modificate. Il primo approccio dell'espressione in pianta di un antigene utile per un vaccino umano risale al lavoro di Mason et al. (1992) sull'espressione dell'antigene di superficie del virus dell'epatite B in tabacco, ma con bassi livelli di espressione. Altri autori hanno riportato l'espressione in pianta dell'enterotossina di E. coli in piante di patata (Mason et al., 1998; Tacket et al., 1998) confermando l'immunogenicità e protezione quando

somministrata oralmente. Anche l'antigene della proteina capsidica del virus Norwalk è stata espressa dal gruppo di Mason et al. (1996) in piante transgeniche di tabacco e dal gruppo di Tacket et al. (2000) in piante transgeniche di patata con livelli di espressione di circa lo 0,23% e lo 0,37% rispettivamente.

Risultati interessanti sono stati ottenuti producendo una pianta transgenica con la proteina S del virus della Gastroenterite Trasmissibile ed è stata successivamente utilizzata come vaccino a sub-unità. (ProdiGene, patent US 5.914.123).

La somministrazione per via orale di patate che esprimevano questa proteina ha determinato una riduzione della morbilità (46%) e della mortalità (40%) dopo conseguente challenge col virus selvaggio.

I sistemi di vaccinazione orale consentirebbero di proteggere gli organismi dall'infezione di diversi agenti microbici che entrano nell'organismo ospite attraverso le superfici mucose. I vaccini orali presentano vantaggi relativi alla maggiore sicurezza e alla facile somministrazione, tuttavia nella pratica bisogna superare alcuni inconvenienti legati essenzialmente alla necessità di fare pervenire a livello intestinale una quantità di antigene sufficiente a stimolare la risposta immunitaria locale. E' noto infatti che il filtro gastrico, la degradazione proteolitica sono grossi ostacoli che la preparazione vaccinale per essere efficace deve superare durante il transito gastroenterico.

I sistemi utilizzati per la produzione di questi antigeni richiedono accurati processi fermentativi e di purificazione. In tale senso le piante, soprattutto quelle edibili, si sono dimostrate un sistema produttivo semplice in quanto non richiedono particolari sistemi produttivi e riducono drasticamente i costi di purificazione. Sono stati prodotti con successo in patata multimeri della subunità B della tossina colerica e tremolabile di E. Coli. L'applicazione orale di questi tuberi si è dimostrata efficiente nel determinare una efficiente protezione al challenge con i corrispondenti patogeni (Lauterslanger et al.,2001). Molti vaccini derivati da piante edibili hanno dimostrato essere in grado di indurre la produzione di anticorpi IgG sieriche e le IgA mucosali sia nei topi che nell'uomo.

L'uso di piante per l'espressione e lo sviluppo di proteine ricombinanti è un'attraente alternativa nello sviluppo dei vaccini (fig.14). Un importante vantaggio di vaccini derivati da piante è che queste costituiscono parte integrante della dieta. Inoltre i complessi processi di purificazione per rimuovere i contaminanti virali non è necessario poiché i virus vegetali non sono in grado di infettare gli animali o l'uomo. In medicina umana è stato dimostrato che l'immunizzazione orale dei topi Balb-c con pomodori che esprimevano la proteina F, una glicoproteina dell'envelope del virus respiratorio sinciziale è in grado di indurre la produzione di anticorpi sierici e mucosali contro l'antigene RSV-F (Sandhu et al.2000). Thanavala et al. hanno osservato che l'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBV) estratto da piante di tabacco ingegnerizzate è in grado di indurre una risposta immunitaria nei topi qualitativamente simile a quella indotta in seguito all'immunizzazione con la stessa derivata da lievito (attuale vaccino commerciale).

Figura 14: principali vantaggi nell'impiego di piante GM per la produzione di farmaci

Vantaggi delle piante come sistemi di produzione di proteine rispetto ai metodi tradizionali:

1. le piante sono ingegnerizzate per l'espressione solo di una piccola parte del virus o del batterio eliminando l'innata capacità patogena o tossica degli stessi.
2. non sono fino ad ora conosciuti patogeni in grado di danneggiare contemporaneamente uomo e piante.
3. la capacità di sintesi di proteine eterologhe nelle specie vegetali è risultata molto elevata.
4. la produzione di proteine può essere indirizzata nei tessuti naturali dei vegetali di stoccaggio delle proteine, massimizzandone la stabilità e la possibilità di conservazione.
5. la formulazione di vaccini multicomponenti è possibile semplicemente miscelando semi ingegnerizzati per proteine differenti.
6. la somministrazione diretta della pianta come alimento e vaccino è possibile se la pianta è destinata al normale uso alimentare.

Le piante ingegnerizzate per l'espressione di antigeni permettono di combinare il normale uso delle piante come nutrimento in alimentazione animale ed umana. Inoltre consentono una notevole riduzione dei costi di produzione: basti pensare che il recipiente di una preparazione vaccinale costa da 100 a 1000 volte di più rispetto la dose di antigene presente (Streatfield et al., 2001).

Numerose specie vegetali sono state trasformate con successo fino ad oggi. Il tabacco rappresenta la specie su cui si stanno mettendo a punto molte delle tecnologie d'interesse, in quanto ben si presta a tutte le tecniche di coltura in vitro, ha una grande biomassa verde e produce una grande quantità di semi. Questo uso alternativo del tabacco ha permesso di rivalutare l'uso di questa specie, non più per uso epicureo, ma per la produzione di molecole utili per la salute umana. In questa specie sono state espresse numerose proteine a scopi terapeutici. Inoltre recenti studi, portati avanti presso il nostro Dipartimento, hanno messo in evidenza la possibilità di utilizzare il seme di tabacco, che a differenza delle foglie non contiene alcaloidi come la nicotina, nell'alimentazione animale. E' stato osservato infatti che suinetti alimentati con una dieta contenente semi di tabacco, in parziale sostituzione della soia, non presentavano differenze statisticamente significative rispetto ai controlli per le performance di crescita e i principali parametri metabolici. L'appetibilità di tale materia prima ne garantisce la possibilità di includerlo nell'alimentazione.

Altre specie sono state utilizzate con successo per la produzione di sostanze utili, come la lattuga, la soia, il riso, la patata, arapidopsis, gli spinaci, il pomodoro e mais. Utilizzando piante edibili si elimina la fase di estrazione della proteina dai tessuti vegetali, con il conseguente vantaggio che la proteina potrebbe essere somministrata oralmente dopo semplici processi di concentrazione e dosaggio. Il riso, oltre a presentare questi vantaggi, riveste grande interesse nei paesi in via di sviluppo nei quali è molto utilizzato a scopo alimentare.

Il seme come sede di espressione degli antigeni vaccinali

I semi sono considerati come perfetto organo di conservazione dei prodotti di riserva della pianta, per questa ragione sono stati presi in considerazione come sede di espressione di proteine eterologhe. Attraverso l'uso di sequenze specifiche, promotori, si possono esprimere e far accumulare nei semi le proteine d'interesse. I vantaggi dell'espressione nei semi consiste nell'assenza di composti fenolici presenti invece nei tessuti fogliari, nella possibilità di avere una grande quantità di proteina in poco volume e nella estrema facilità di trasportare i semi senza bisogno di refrigerazione, abbattendo l'uso di costose "catene del freddo".

Il seme rappresenta in assoluto l'organo vegetale più utilizzato dall'uomo e questo per la facilità di conservazione dello stesso e, ovviamente, per i suoi apporti calorici e proteici. Il seme consiste nell'embrione della pianta avvolto da tessuti di riserva che forniscono energia ed azoto durante la germinazione. Normalmente è l'endosperma ad avere prevalentemente la funzione di tessuto di riserva, ma nei legumi come ad esempio nella soia, i cotiledoni si sviluppano notevolmente ed acquisiscono questa funzione. La funzione di riserva, per la componente azotata, viene svolta da proteine particolari accumulate nei corpi proteici, all'interno di compartimenti nei sistemi di endomembrane cellulari. La quantità di proteine presenti nel seme varia da circa 10-15% nei cereali e circa il 25-35% nelle leguminose (Shewry et al.,1995). Le proteine di riserva di tutti i vegetali sono accomunate da alcune caratteristiche funzionali e fisiologiche: la loro sintesi è regolata in base alle esigenze nutrizionali durante la maturazione del seme e sono conservate in corpi proteici. Le classi principali di proteine di riserva delle leguminose sono due: le globulina e le lectine. Le globulina sono proteine di riserva più diffuse, essendo presenti non solo nelle leguminose, ma anche nelle monocotiledoni e in altre dicotiledoni. La classe delle globulina è a sua volta divisa in due sottoclassi: le legumine (proteine esameriche 11S) e le viciline (proteine trimeriche 7S). alla sottoclasse delle viciline appartiene anche la proteina globulina basica 7S, i cui elementi di regolazione sono stati utilizzati nel presente lavoro di ricerca (Shewry et al.,1995).

Per poter indirizzare l'espressione ai semi o ad altri compartimenti cellulari è di estrema importanza la scelta del promotore, da cui dipendono la specificità del tessuto e delle cellule di espressione e la concentrazione finale della proteina tradotta. Il promotore più utilizzato è il 35S del cavolfiore (35S CaMV35S): si tratta di un promotore molto forte e costitutivamente espresso ma che non permette la regolazione mirata dell'espressione, quindi per indirizzare l'espressione a compartimenti specifici, devono essere scelti altri promotori. Diversi promotori derivanti dai geni di stoccaggio delle proteine nei semi sono stati utilizzati per confinare l'espressione in una zona specifica, per esempio il promotore GLOB. Si tratta di un promotore naturalmente presente nei semi di soia e responsabile dell'espressione della globulina basica 7S, una proteina dei semi sintetizzata in elevate quantità (3% delle proteine totali) e localizzata in vacuoli intracellulari racchiusi dalla lamella mediana e dalla membrana plasmatica. GLOB si è dimostrato efficace anche in piante diverse dalla soia, come il tabacco; è stato utilizzato da Reggi et al., nel 2005 per trasformare piante di tabacco per l'espressione dell'enzima β glicosidasi (GCase), molecola fondamentale per la cura sintomatica della Gaucher disease (GD).

La globulina basica 7S è una proteina di riserva del seme di soia ricca di metionina e cisterna. Come la b-conglicina, anche la globulina basica 7S (Bg) è accumulata nel seme in grandi quantità (3% delle proteine totali presenti nel seme). E' costituita da due subunità codificate dallo stesso mRNA, una di 27KDa e l'altra di 16KDa, legate da ponti disolfuro. La Bg è sintetizzata come un

unico polipeptide precursore, consistente in un putativo segnale peptidico e nelle due subunità. Tale polipeptide precursore, viene processato per dare la proteina dimerica matura. Il gene Bg è presente nel genoma in circa quattro copie (Watanabe e Hirano,1994). Questa proteina è prevalentemente localizzata nei tessuti embrionali del seme e il suo pattern di espressione è strano per una proteina di riserva. Infatti una parte di Bg si accumula negli spazi intercellulari del parenchima dei cotiledoni, mentre a livello intracellulare si accumula in corpi proteici sulla lamella mediana della parete cellulare e nella membrana plasmatica (Watanabe et Hirano, 1994). Questa localizzazione suggerisce che la Bg non sia una semplice proteina di riserva, ma abbia anche altre funzioni. Dati più precisi sulla localizzazione e sul periodo di espressione della Bg in soia non sono fino ad ora disponibili. Solo recentemente è stato verificato che il meccanismo di espressione sito e tempo-specifica è conservato in altre specie vegetali trasformate (Fogher et al., 1998).

Vaccini edibili contro ceppi di *Escherichia coli* verocitotossico del suino

Presso il nostro dipartimento da anni ci stiamo occupando di piante geneticamente modificate per il controllo di alcune patologie enteriche del suino.

Qui brevemente descritto un progetto che ha portato ottimi risultati focalizzato sull'impiego di semi di tabacco vaccinali contro ceppi verocitotossici di *Escherichia coli*.

Nell'allevamento suinicolo intensivo, di cui la Lombardia rappresenta l'area produttiva più importante in ambito nazionale, le patologie sostenute da ceppi di *Escherichia coli* verocitotossico rappresentano un ingente problema nella fase post-svezzamento e sono causa di notevoli perdite economiche. I sierotipi di *Escherichia coli* verocitotossici (VTEC) sono responsabili di enterotossiemie che si manifestano con differenti forme cliniche tra le quali la Malattia degli Edeemi. Nella patogenesi giocano un ruolo fondamentale fattori di virulenza come la fimbria adesiva F18 e la tossina Shiga-like o verocitotossina che determina danni endoteliali sistemici. La pericolosità della circolazione di ceppi verocitotossici, causa di serie foodborne diseases, è stata ampiamente discussa a seguito della recente emergenza legata al ceppo di *Escherichia coli* O104 H4 che dal 2 maggio al 14 giugno ha causato la morte di 13 pazienti in Europa. Attualmente non essendo disponibili vaccini, l'unico metodo di controllo è rappresentato dagli antibiotici, da considerarsi strumenti di primaria importanza nel contesto di ampie strategie sanitarie, ma che sono sottoposti a restrizioni d'uso per i noti problemi di farmaco-resistenza, per trasferimento plasmidico, che coinvolgono anche batteri patogeni per l'uomo (UE, 1831/2003). Inoltre a seguito delle frequenti resistenze batteriche nell'allevamento intensivo le terapie di massa con molecole antibiotiche si traducono spesso in un insuccesso, anche per eliminazione del pool di microflora intestinale benefica che, per competizione, limita la colonizzazione enterica del patogeno. In tale contesto i vaccini rappresentano uno strumento ad elevata valenza sanitaria prevenendo la comparsa della malattia e creando condizioni immunitarie nella popolazione tali da preludere ad un controllo più efficace e radicale con l'eliminazione dell'infezione. In tale ambito le piante, possiedono un considerevole potenziale e rappresentano una promettente alternativa per la produzione di molecole biofarmaceutiche (Medical Molecular Farming) e per la produzione di vaccini edibili, in relazione alla loro capacità di esprimere con il corretto folding proteine derivanti sia da organismi eucarioti che procarioti. Le piante, come vaccini orali, si sono dimostrate in grado di indurre specifiche risposte immunitarie soprattutto a livello mucosale. La stimolazione di una risposta immunitaria protettiva locale, generata attraverso l'esposizione diretta a livello mucosale degli antigeni, prerequisito essenziale per una strategia vaccinale orale, garantisce la produzione di

anticorpi specifici proprio nel sito di ingresso di numerosi patogeni enterici. Le “piante vaccino” presentano inoltre molti potenziali vantaggi in termini di costi produttivi minori, maggiore sicurezza, semplicità di stoccaggio e trasporto nonché a livello di allevamento possono essere somministrate nell’alimento senza indurre stress agli animali e senza alcuna necessità di contenimento.

Presso il nostro Dipartimento, in collaborazione con il Prof. Fogher dell’università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza e con laboratori Plantechno s.r.l., piante di tabacco sono state ingegnerizzate per l’espressione seme specifica di proteine antigeniche derivanti da ceppi wild type di *Escherichia coli verocitotossico*. In particolare i semi esprimevano la fimbria adesiva F18 e della subunità B della tossina VT2e.

La fimbria adesiva F18 (precedentemente chiamata F107) è coinvolta nell’adesione del batterio alle cellule intestinali. I batteri responsabili dell’infezione colonizzano la parete dell’intestino grazie alla fimbria F18 che riconosce e lega uno specifico recettore (GP3) sulla cellula epiteliale. In seguito viene prodotta la tossina Vt2e che, assorbita dal sistema cardiovascolare, è trasportata ai tessuti bersaglio dove agisce determinando danni agli endoteli vasali con necrosi arteriolare. L’entità del danno dipende dalla quantità di tossina assorbita e dal numero o distribuzione dei recettori. Tutte le tossine della classe Shiga hanno una struttura definita A1B5 poiché si tratta di eteroesameri in cui una subunità A è associata non covalentemente con il pentamero della subunità B. La porzione A, formata a sua volta da 2 parti (A1 e A2), è dotata dell’attività enzimatica tossica che le consente di tagliare una specifica adenina dal rRNA 28S e quindi bloccare la sintesi proteica della cellula bersaglio. La subunità B invece si lega a specifici recettori sulla membrana cellulare permettendo l’internalizzazione della tossina per endocitosi di vescicole rivestite di clatrina.

Le due proteine antigeniche espresse in semi di tabacco, la subunità B della tossina Shiga-like di *E. coli* (VTe2B o Stx2eB) e la fimbria F18 (F18), sono considerate importanti fattori di patogenicità dei ceppi wild type. Per tale ragione la produzione di anticorpi diretti verso queste due componenti del batterio selvaggio potrebbe ridurre la patogenicità.

I semi sono stati prodotti e valutati, presso il nostro Dipartimento, per la loro capacità immunogena, attraverso somministrazione intraperitoneale e orale su modello murino.

La valutazione sul suino ha messo in evidenza una maggiore attivazione del sistema immunitario locale nei soggetti che sono stati alimentati con semi di tabacco vaccinale.

I trattati rispetto ai controlli hanno inoltre presentato una maggiore lunghezza dei villi, profondità delle cripte ed estensione delle placche di Peyer, indice di una maggiore attività delle cellule deputate alla produzione della risposta immunitaria.

La somministrazione orale di semi di tabacco geneticamente modificati, per l’espressione di antigeni vaccinali contro i ceppi verocitotossici di *Escherichia coli*, ha dimostrato un effetto protettivo nei confronti dei ceppi wild type di *E. coli* verocitotossici.

Original Article

Expression of verocytotoxic *Escherichia coli* antigens in tobacco seeds and evaluation of gut immunity after oral administration in mouse model

Luciana Rossi^{1,4}, Alessia Di Giancamillo¹, Serena Reggi², Cinzia Domeneghini¹, Antonella Baldi¹, Vittorio Sala¹, Vittorio Dell'Orto¹, Annelies Coddens³, Eric Cox⁴, Corrado Fogher⁵

¹Università di Milano, Department of Health, Animal Science and Food Safety, 20134 Milan, Italy

²Plantechno S.r.l., 26040 Picososcano, Cremona, Italy

³Università di Milano, Department of Animal Pathology, Hygiene and Veterinary Public Health, 20133 Milan, Italy

⁴Laboratory of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, 9020 Mellebeke, Belgium

⁵Catholic University, Institute of Agronomy, Genetics and Field Crops, 29100 Piacenza, Italy

Open Journal of Veterinary Medicine, 2013, 3, 75-78
doi:10.4236/ojvm.2013.31012 Published Online March 2013 (<http://www.scirp.org/journal/ojvm>)



Tobacco Seeds By-Product as Protein Source for Piglets

Luciana Rossi¹, Eleonora Fusi¹, Gianluca Baldi¹, Corrado Fogher¹,
Federica Chelli¹, Antonella Baldi¹, Vittorio Dell'Orto¹

¹Department of Health, Animal Science and Food Safety, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

²Institute of Agronomy, Genetics and Field Crops, Catholic University, Piacenza, Italy

Email: Luciana.rossi@unimi.it

Received December 28, 2012; revised February 1, 2013; accepted March 2, 2013

2

Not Run Common
DOI:10.1007/s11229-013-0583-0

ORIGINAL ARTICLE

Protective effect of oral administration of transgenic tobacco seeds against verocytotoxic *Escherichia coli* strain in piglets

Luciana Rossi • Vittorio Dell'Orto • Simona Vagni •
Vittorio Sala • Serena Reggi • Antonella Baldi

Bibliografia

Badillo, J., Newell, C., and Gray J. (2005) Expression of HIV-1 p24 in chloroplasts of transplastomic tobacco plants. Plant-Based Vaccines & Antibodies. PBVA 2005 – 8-10 June 2005, Prague, Czech Republic.

Biemelt, S., Sonnewald, U., Galmbacher, P., Willmitzer, L., Muller, M. (2003) Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virol*, 77, 9211-9220.

Daniell, H., Khan, M.S. and Allison, L. (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci*, 7, 84-91.

Daniell, H., Streatfield, S.J. and Wycoff, K. (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci*, 6, 219-226

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 (5451): 303–5. doi:10.1126/science.287.5451.303. PMID 10634784.

Fischer, R. and Emans, N. (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res*, 9, 279-299; discussion 277.

Florin, L., Sapp, C., Streeck, R.E. and Sapp, M. (2002) Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol*, 76, 10009-10014.

Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., Carter, A. (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol* 18, 1151-1155.

Haq, T.A., Mason, H.S., Clements, J.D. and Arntzen, C.J. (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*, 268, 714-716.

Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179-180.

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

Koscińska, E., Kalantidis, K., Wypijewski, K., Sadowski, J. and Tabler, M. (2005) Analysis of RNA silencing in agroinfiltrated leaves of *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol*, 59, 647-661.

Koya, V., Moayeri, M., Leppla, S.H. and Daniell, H. (2005) Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infect Immun*, 73, 8266-8274

- Ma, J.K., Barros, E., Bock, R., Christou, P., Dale, P.J., Dix P.J., Fischer, R., Irwin, J., Mahoney, R., Pezzotti, M., Schillberg, S., Sparrow, P., Stoger, E. and Twyman, R.M. (2006) Molecular farming for new drugs and vaccines. *Embo Rep* 6, 592-599.
- Mason, H.S., Ball, J.M., Shi, J.J., Jiang, X., Estes, M.K. and Arntzen, C.J. (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 5335-5340.
- Mason, H.S., Haq, T.A., Clements, J.D. and Arntzen, C.J. (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine*, 16, 1336-1343.
- L. Rossi, S. Reggi, S. Vagni, C. Fogher, A. Baldi. (2011) Evaluation of gastric degradability of antigenic protein expressed in tobacco seeds. *Italian Journal of animal Science* 2011, 10, suppl. 1: 19. ISSN 1594-40 eISSN 1828-051X.
- S. Vagni, L. Rossi, C. Polidori, F. Saccone, L.G. Alborali, V. Dell'Orto (2011). *Italian Journal of animal Science* 2011, 10, suppl. 1: 7. ISSN 1594-40 eISSN 1828-051X
- L. Rossi, S. Vagni, C. Polidori, G.L. Alborali, A. Baldi, V. Dell'Orto. (2012). Experimental induction of *Escherichia coli* diarrhoea in weaned piglet. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2: 1-8; ISSN
- L. Rossi, A. Baldi, V. Dell'Orto, S. Reggi, C. Fogher (2012) Expression of flgk flagellin from *Salmonella Typhimurium* in tobacco seeds. *IOSR Journal of Pharmacy* ISSN: 2250-3013, 2,5, Sep-Oct: 19-22
- L. Rossi, A. Di Giancamillo, S. Reggi, C. Domeneghini, A. Baldi, V. Sala, V. Dell'Orto, C. Fogher. "Expression of porcine verocytotoxic *Escherichia coli* antigens in tobacco seeds and evaluation of gut immunity after oral administration in mouse model" *Journal of Veterinary Science* 2013 Sep;14(3):263-270.
- L. Rossi, E. Fusi, G. Baldi, C. Fogher, F. Cheli, A. Baldi, V. Dell'Orto. Tobacco Seeds By-Product as Protein Source for Piglets. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2013, 3, 73-78
- L. Rossi, L. Pinotti, A. Agazzi, V. Dell'Orto, A. Baldi. Plant bioreactors for the antigenic hook-associated flgK protein expression. *Italian Journal of animal science* (accepted October 2013).
- L. Rossi, V. Dell'Orto, S. Vagni, V. Sala, S. Reggi, A. Baldi. Protective effect of oral administration of transgenic tobacco seeds against verocytotoxic *Escherichia coli* strain in piglets. *Veterinary Research Communication*. 19 November 2013, DOI 10.1007/s11259-013-9583-9.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanford, J. (1990) Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant.* 79, 206-209. Streatfield, S.J., Jilka, J. M., Hood, E. E., Turner, D. D., Bailey, M. R., Mayor, J. M.,
- Woodard, S. L., Beifuss, K. K., Horn, M. E., Delaney, D. E., Tizard, I. R., Howard, J. A. (2001) Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine*, 19, 2742-2748

Warzecha, H., Mason, H. S., Lane, C., Tryggvesson, A., Rybicki, E., Williamson, A. L., Clements, J. D., Rose, R. C. (2003) Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virol*, 77, 8702-8711

Zhang, G.G., Rodrigues, L., Rovinski, B., White, K. A. (2002) Production of HIV-1 p24 protein in transgenic tobacco plants. *Mol Biotechnol*, 20, 131-136.

Zhang, W., Carmichael, J., Ferguson, J., Inglis, S., Ashrafian, H. and Stanley, M. (1998) Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Escherichia coli*: denaturation, renaturation, and self-assembly of virus-like particles in vitro. *Virology*, 243, 423-431.